



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE**



**PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - SBFIS**

CAMILA DUTRA BARBOSA

**Avaliação do papel da serotonina na resposta de macrófagos
murinos inoculados com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia
coli***

Vitória da Conquista, BA
2022

CAMILA DUTRA BARBOSA

Avaliação do papel da serotonina na resposta de macrófagos murinos inoculados com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas/Sociedade Brasileira de Fisiologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador (a): Prof. Dr. Lucas Miranda Marques

Coorientadores: Prof.^a Dr.^a Clarissa Leal Silva e Souza
Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco

Vitória da Conquista, BA
2022

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira - UFBA

Barbosa, Camila Dutra

Avaliação do papel da serotonina na resposta de macrófagos murinos inoculados com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* / Camila Dutra Barbosa. - 2022.
68 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Miranda Marques.

Coorientadores: Prof^a. Dr^a. Clarissa Leal Silva e Souza, Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas / Sociedade Brasileira de Fisiologia, 2022.

1. Serotonina. 2. Resposta inflamatória. 3. Potencial anti-inflamatório. I. Universidade Federal da Bahia. Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Marques, Lucas Miranda. III. Souza, Clarissa Leal Silva e. IV. Branco, Guilherme de Siqueira. V. Título

CDU: 604.4

CAMILA DUTRA BARBOSA

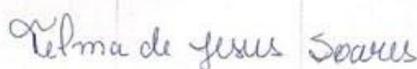
Avaliação do papel da serotonina na resposta de macrófagos murinos inoculados com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de mestre em Ciências Fisiológicas e aprovada em sua forma final pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal da Bahia.

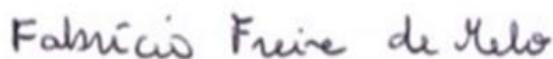
Vitória da Conquista – BA, 16 de dezembro de 2022.



Prof. Dr. Lucas Miranda Marques (Orientador)
Universidade Federal da Bahia - UFBA/IMS



Profª Drª. Telma de Jesus Soares (Examinadora)
Universidade Federal da Bahia - UFBA/IMS



Prof. Dr. Fabrício Freire de Melo (Examinador)
Universidade Federal da Bahia - UFBA/IMS

AGRADECIMENTOS

À Deus, tudo em minha vida é graças a ti, Senhor! Sou eternamente grata por Teu amparo, proteção e amor.

À minha família, em especial ao meu pai Gerson (*in memoriam*) e a mãe Maria das Graças por todo amor, proteção, acolhimento e colo; sou imensamente grata por todo incentivo e apoio. Aos meus irmãos Cleber e Cleiton por todo incentivo e a minha irmã Cristiane por todo carinho e incentivo – desde muito cedo você me mostrou que devemos sempre buscar o conhecimento, sem dúvidas foi fundamental para que esse caminho fosse trilhado da melhor forma possível. Aos meus amigos (as) pelo incentivo, torcida e apoio. Gratidão!

Ao meu orientador Prof. Dr. Lucas Miranda Marques, sou imensamente grata pela confiança, compreensão e paciência. Aprendi e evolui muito durante todo esse processo, seus ensinamentos foram preciosos. Gratidão!

À minha co-orientadora Prof^a. Dr^a Clarissa Leal pela orientação e suporte. Ao Projeto Micro, essencial na minha formação; em especial à Mari, Manoel que foram fundamentais para o desenvolvimento do meu experimento e a Bruna por todo o suporte. A Thiago, pelo auxílio em minhas análises, muito obrigada por toda disponibilidade!

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco por todo suporte, apoio e orientação; agradeço de todo o coração a confiança em disponibilizar o seu laboratório para realização dos meus experimentos. A todos do laboratório de fisiologia da USP/Ribeirão Preto: Bruna, Luís, Júnia, Patrícia, Thaís, Katiuscia e Célia por todo o auxílio e acolhimento durante toda a minha estadia em Ribeirão. Sou muito grata a todos vocês!

Aos camundongos utilizados, protagonistas do meu trabalho, que foram essenciais para realização da minha dissertação.

Aos componentes da banca: titulares, Telma, Fabrício, e suplentes Lilianny e Rafaela, por terem aceitado o convite.

À FAPESB pelo auxílio financeiro, viabilizando a realização desse trabalho.

Aos docentes e funcionários da UFBA, meu muito obrigada!

RESUMO

BARBOSA, C.D. **Avaliação do papel da serotonina na resposta de macrófagos murinos inoculados com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***. 2022. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, BA. 2022.

A Serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) modula respostas imunológicas em células imunes, sendo que essa ação ocorre por meio do sistema serotoninérgico. Este neurotransmissor monoaminérgico atua sobre as células imunes, coordenando as respostas imunológicas de macrófagos, células Natural killer (NK), células dendríticas e linfócitos, seja inibindo-as ou estimulando-as, porém não são conhecidos os efeitos da 5-HT especificamente sobre diferentes estímulos imunes, em tecidos específicos. Com isso o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da 5-HT, na resposta imunológica induzida por inoculação de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, em cultura de macrófagos peritoneais e esplênicos de camundongos tratados ou não com a serotonina. Para isso, foram utilizados camundongos da linhagem C57BL6. O primeiro grupo foi o de animais tratados com 5-HT *in vivo*, onde foi administrado a serotonina via intracerebroventricular e após 30 minutos foi injetado via intraperitoneal o LPS, no intuito de induzir uma inflamação local. O segundo grupo de animais sham, realizou a cirurgia ICV, no entanto, foi administrado apenas ácido ascórbico 0,1% (veículo) e não passou pelo processo de indução inflamatória. Após a cirurgia, os macrófagos peritoneais e esplênicos foram extraídos dos animais, utilizando protocolo específico, e seguiram para incubação durante 24 horas. O grupo sham foi dividido em dois subgrupos: macrófagos tratados com 5-HT *in vitro* e os macrófagos não tratados. Os macrófagos tratados *in vitro* receberam diferentes dosagens de 5-HT (10^{-3} M, 10^{-6} M e 10^{-8} M) e foram novamente incubados por 24 horas, enquanto o subgrupo de macrófagos não tratados não passou por nenhum tipo de contato com 5-HT. Após o período de respectiva incubação, os macrófagos tratados *in vivo*, *in vitro* e os não tratados foram infectados com *E. coli* e *S. aureus* (controle positivo) ou salina (controle negativo) e incubados novamente por 3 horas. Após a coleta, foi realizado a expressão gênica das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 nas células, bem como a dosagem de peróxido de hidrogênio e de óxido nítrico do sobrenadante. De maneira geral, macrófagos obtidos de animais tratado *in vivo* com 5-HT e macrófagos tratados *in vitro* com 10^{-3} M e 10^{-6} M de 5-HT apresentaram menores expressões de marcadores inflamatórios quando comparado com macrófagos sem nenhum tipo de tratamento, nas infecções utilizando *E. coli* e *S. aureus*, especialmente 10^{-3} que registrou essa queda em todas as análises realizadas. O mesmo efeito não foi observado com o tratamento *in vitro* utilizando 10^{-8} M de 5-HT. Portanto, os resultados do presente estudo nos levam a conclusão que a serotonina pode estar envolvida na inibição de componentes que regulam a inflamação de acordo ao tipo de infecção ao qual este estiver exposto. Além disso, a modulação da serotonina na resposta inflamatória indica um possível potencial anti-inflamatório do 5-HT. No entanto, mais estudos necessitam ser realizados para avaliar profundamente os mecanismos envolvidos nesse processo.

Palavras chaves: 5-HT. Serotonina. IL-1. IL6. TNF- α . *in vivo*. *in vitro*

ABSTRACT

BARBOSA, C.D. **Evaluation of the role of serotonin in the response of macrophages obtained from mice inoculated with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.** 2022. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, BA. 2022.

Serotonin (5-hydroxytryptamine or 5-HT) modulates immune responses in immune cells, and this action occurs through the serotonergic system. This monoaminergic neurotransmitter acts on immune cells, coordinating the immune responses of macrophages, Natural killer (NK) cells, dendritic cells and lymphocytes, either inhibiting or stimulating them, but the effects of 5-HT specifically on different immune stimuli in specific tissues. Thus, the present study aimed to evaluate the effect of 5-HT on the immune response induced by inoculation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in cultures of peritoneal and splenic macrophages from mice treated or not with serotonin. For this, mice of the C57BL6 lineage were used. The first group consisted of animals treated with 5-HT *in vivo*, where serotonin was administered intracerebroventricularly and after 30 minutes LPS was injected intraperitoneally, in order to induce local inflammation. The second group of sham animals underwent ICV surgery, however, only 0.1% ascorbic acid (vehicle) was administered and did not go through the inflammatory induction process. After surgery, peritoneal and splenic macrophages were extracted from the animals, using a specific protocol, and were incubated for 24 hours. The sham group was divided into two subgroups: macrophages treated with 5-HT *in vitro* and untreated macrophages. *In vitro* treated macrophages received different dosages of 5-HT (10⁻³ M, 10⁻⁶ M and 10⁻⁸ M) and were again incubated for 24 hours, while the subgroup of untreated macrophages did not undergo any type of contact with 5-HT. After the respective incubation period, macrophages treated *in vivo*, *in vitro* and untreated were infected with *E. coli* and *S. aureus* (positive control) or saline (negative control) and incubated again for 3 hours. After collection, the gene expression of the cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6 in the cells was carried out, as well as the dosage of hydrogen peroxide and nitric oxide in the supernatant. In general, macrophages obtained from animals treated *in vivo* with 5-HT and macrophages treated *in vitro* with 10⁻³ M and 10⁻⁶ M of 5-HT showed lower expressions of inflammatory markers when compared to macrophages without any type of treatment, in infections using *E. coli* and *S. aureus*, especially 10⁻³ which recorded this drop in all analyzes performed. The same effect was not observed with the *in vitro* treatment using 10⁻⁸ M 5-HT. Therefore, the results of the present study lead us to the conclusion that serotonin may be involved in the inhibition of components that regulate inflammation according to the type of infection to which it is exposed. Furthermore, modulation of serotonin in the inflammatory response indicates a possible anti-inflammatory potential of 5-HT. However, more studies need to be carried out to deeply evaluate the mechanisms involved in this process.

Keywords: 5-HT. Serotonina. *IL-1*. *IL6*. *TNF- α* . *in vivo*. *in vitro*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 Serotonina	10
2.2 Inflamação	13
2.3 Resposta imunológica versus serotonina	17
2.4 <i>Escherichia coli</i>	19
2.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	21
3 OBJETIVO GERAL	24
3.1 Objetivos Específicos	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Animais	25
4.2 Inóculo	25
4.3 Cirurgia Intracerebroventricular (ICV) e tratamento com 5-HT in vivo	26
4.4 Extração de Macrófago Peritoneais e Esplênicos de Camundongos	26
4.5 Plaqueamento dos macrófagos esplênicos e peritoneais	28
4.6 Divisão Geral dos Grupos	29
4.7 Expressão gênica de citocinas por RT- qPCR	30
4.8 Dosagem de Óxido Nítrico	31
4.9 Dosagem Peróxido de Hidrogênio	31
4.10 Análise estatística	31
5 RESULTADOS	33
5.1 Avaliação da inoculação	33
5.2 Análise da produção de Óxido Nítrico	33
5.3 Análise da produção de Peróxido de Hidrogênio	33
5.4 Análise da expressão gênica da citocina IL-1 β	37
5.5 Análise da expressão gênica da citocina IL-6	37
5.6 Análise de expressão gênica da citocina TNF- α	37
6 DISCUSSÃO	42
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXOS	64

1 INTRODUÇÃO

A 5-hidroxitriptamina (5-HT), ou também conhecida como serotonina, é uma molécula biológica neurotransmissora que foi descoberta há mais de 80 anos (DAVID; GARDIER, 2016) e pertence à família das monoaminas. Essas moléculas eram conhecidas por atuar somente no sistema nervoso central (SNC), como neurotransmissor (MITTAL *et al.*, 2017). Porém, ao longo dos anos foi observado que essas monoaminas contribuem também na regulação de diversas funções do corpo, dentre elas então as atividades neurais e intestinais (MITTAL *et al.*, 2017). As principais monoaminas existentes são as catecolaminas (dopamina, norepinefrina e epinefrina), que são originadas a partir da tirosina, da histamina, derivada da histidina e da serotonina, que tem derivação a partir da triptamina. Cerca de 98% da serotonina está presente na periferia onde são encontradas em células do trato gastrointestinal, especificamente nas células enterocromafins, que são as responsáveis pela sua síntese (DUERSCHMIED, 2019). Uma menor proporção atua no SNC onde é ligada a diversas regulações importantes, como os comportamentos alimentares, termorregulação, depressão, entre outras (DAVID; GARDIER, 2016). Além de todos os seus papéis conhecidos no funcionamento do nosso organismo, a serotonina é apontada com um hormônio imunomodulador. Atua no sistema imunológico, seja inato ou adaptativo, e modula respostas em diversas células imune, como macrófagos, linfócitos T e B, neutrófilos e células natural killer (NK) (MAMMADOVA-BACH *et al.*, 2018). As células do sistema imune apresentam receptores de serotonina 5-HT e de seu transportador (SERT), além de enzimas para a síntese da serotonina (TPH) (HERR; BODE; DUERSCHMIED, 2017). Os receptores presentes nas membranas promovem a ligação com essa molécula e ativa sua ação moduladora e, por conseguinte, desempenha papel importante na expressão da resposta

imune (SHAJIB; KHAN, 2014). A serotonina está ligada também ao processo de cicatrização, uma vez que se a serotonina pode interferir de forma não atípica nessa atividade, e pode gerar falhas no processo de regeneração em meio ao dano tecidual (MAMMADOVA-BACH et al., 2018).

Um estudo mostrou que 5-HT intensificou atividades pró-inflamatórias em camundongos elevando o número de mortalidade e contribuindo com aumento de choque séptico nos animais, que conseqüentemente apresentaram lesões importantes em vários órgãos, promovendo uma expressão significativa das citocinas, fator de necrose tumoral do tipo alfa (TNF- α) e interleucina do tipo 6 (IL-6) (ZHANG et al., 2017). Baseado nesses dados, este estudo tem como questão norteadora: qual o efeito da 5-HT na resposta imunológica induzida por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em cultura de macrófagos de camundongos?

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Serotonina

O triptofano apresenta diversas funções no nosso sistema, importante na formação de proteínas e de componentes que atuam na regulação fisiológica, como o crescimento celular (CERVENKA; AGUDELO; RUAS, 2017). Estima-se que cerca de 2% de triptofano adquirido pelo consumo alimentício é destinado a produção de serotonina, também chamada de 5-hidroxitriptamina (5-HT) (ARREOLA et al, 2015; CASAS-ENGEL et al., 2014). Os especialistas indicam que adultos consumam diariamente cerca de 5mg/kg de triptofano, sendo os grãos uma ótima indicação nessa situação, uma vez que em sua maioria apresentam grande parte desse aminoácido (STRASSER; GOSTNER; FUCHS, 2016).

A atuação do triptofano como conversor de serotonina é fundamental para o desempenho de funções cognitivas essenciais, como a memória e aprendizagem, e ainda está interligada com várias regiões no SNC realizando papéis fundamentais em diversas regulações, como o humor, sono, apetite e temperatura (STRASSER; GOSTNER; FUCHS, 2016; JENKINS et al., 2016), além de funções cardíacas, hepática, intestinal, pulmonar e óssea (HERR; BODE; DUERSCHMIED, 2017). A biossíntese de serotonina é iniciada com a conversão do triptofano em 5-HT e nesse processo inicial, a enzima triptofano hidroxilase (TPH) é essencial, uma vez que o L-triptofano é convertido em 5-hidroxi-1-triptofano (5-HTP), pela oxidação na posição 5 do anel pirrol (MAFFEI, 2020; CASAS-ENGEL et al., 2014). Além disso, na fase final da pré-conversão do hormônio, um importante aminoácido também atua na produção da serotonina, o AADC, que é um aminoácido aromático descarboxilase, que promove a descarboxilase de 5-HTP, o convertendo em 5-HT (MAFFEI, 2020; CASAS-ENGEL et al., 2014).

A triptofano hidroxilase é a responsável por sintetizar a serotonina na região do tronco encefálico e nos tecidos periféricos. No entanto, para isso ocorrer, também é necessária a atuação da enzima o qual será modificada por dois genes importantes, o Triptofano hidroxilase 1 (TPH1) e triptofano hidroxilase 2 (TPH2) que codificam a triptofano hidroxilase e, portanto, promovem a produção de 5-HT (EL-MERAHBI et al., 2015). Cada um é destinado a uma região diferente, sendo TPH1 na região periférica e TPH2 no sistema nervoso central (EL-MERAHBI et al., 2015).

A serotonina é uma monoamina amplamente conhecida, importantíssima no controle neuronal. Atua como neurotransmissor no sistema nervoso central (SNC) e na região periférica desempenha função hormonal (VLEGELS; VERLINDEN; BROECK, 2015). No SNC, essas aminas são utilizadas no processo sináptico, durante a sinapse química, onde ocorre todo o processo de comunicação sináptica decorrente das vias de sinalizações, de modo que, quando presentes na fenda sináptica se ligam aos seus receptores específicos (VLEGELS; VERLINDEN; BROECK, 2015). Esses neurotransmissores são levados via axônio até o terminal pré-sináptico e as enzimas presentes na região promovem a sua liberação, uma vez que elas atuam nas vesículas onde estão contidas o neurotransmissor, assim se torna possível que esses mensageiros sejam lançados na fenda sináptica e posteriormente possam se ligar ao neurônio pós-sináptico, realizando esse processo de comunicação (CAIRE; VARACALLO, 2022).

A serotonina está armazenada no cérebro, no trato digestivo e também nas plaquetas (STRASSER; GOSTNER; FUCHS, 2016). Dentro dos neurônios da rafe no tronco cerebral é realizada a síntese de serotonina no SNC, cerca de 5% do total corporal é produzido nessa região (JENKINS et al., 2016). As células sintetizadoras de serotonina no intestino, as enterocromafins, dispõe de uma extensão considerável, uma vez que a junção dessas células formam o maior tecido endócrino do corpo (MARTIN et al., 2017).

O 5-HT atua como um hormônio parácrino, além de estar envolvido na digestão e absorção de nutrientes ingeridos, conforme vai havendo um aumento da sua liberação na região, um aumento na secreção de enzimas importantes nesse processo vai se estabelecendo. (MARTIN et al., 2017).

Existem ao menos quinze subtipos de receptores para a serotonina, são eles o 5-HTR1A, 5-HTR1B, 5-HTR1D, 5-HTR1E, 5-HTR1F, 5-HTR2A, 5-HTR2B, 5-HTR2C, 5-HTR3A, 5-HTR3B, 5-HTR4, 5-HTR5A, 5-HTR5B, 5-HTR6 e 5-HTR7, uma informação importante sobre eles é que apenas o 5-HTR3 apresenta canal iônico controlado por ligante, os demais são conhecidos por pertencerem a uma grande família que comportam receptores acoplados à proteína G (KARMAKAR; LAL, 2021).

O SERT pertence à família portadora de soluto 6, apresenta um papel fundamental na atuação de 5-HT, uma vez que promove a entrada da molécula que está no meio extracelular para o meio intracelular, ou seja, atua como um transportador presente na membrana das células, realizando essa regulação dos níveis serotoninérgicos na circulação (ARREOLA et al, 2015). O processo de captura do hormônio consiste em algumas etapas, depois de sintetizada por células enterocromafins a serotonina se liga ao receptor SERT, presente na membrana da célula, que captura esse hormônio e o armazena nas plaquetas, posteriormente esse hormônio vai sendo liberado durante o processo de coagulação sanguínea. (HERR; BODE; DUERSCHMIED, 2017). Logo após a inserção do 5-HT nas plaquetas, o hormônio segue para as regiões subcelulares, onde ficam contidos ou podem ser metabolizadas, e a enzima responsável por realizar esse procedimento é a enzima monoamina oxigenase (MAO) (DUERSCHMIED, 2019).

A serotonina exerce diretamente influência em vários processos metabólicos, evidenciando que a serotonina presente na região periférica tem ação fundamental em diversas ações fisiológicas, dentre elas estão a regulação hepática lipídica e também da

glicose (EL-MERAHBI et al, 2015). No ano de 1967, foi descoberto que esse hormônio regula ações nas células adiposas, além de atuar no sistema trato gastrointestinal ele também é descrito como um imunoregulador importante, desempenhando esse papel principalmente em células pró-inflamatórias (EL-MERAHBI et al, 2015). A sua interferência nessas células varia de acordo ao tipo de célula e também a resposta que esse hormônio pode mediar, isso porque cada uma destas vai apresentar um subtipo de receptor diferente (WAN et al., 2020).

Quando analisamos o sistema nervoso e o sistema imune é possível notar semelhanças, principalmente na organização de cada sistema, pois ambos dispõem de mecanismos celulares que captam sinalizações vindas de vários estímulos, sejam internos ou externos (MONDANELLI; VOLPI, 2021). Outro fator que eles compartilham é a memória, a sua rápida associação a uma situação que ocorreu permite que as respostas sejam mais ativas e efectoras (MONDANELLI; VOLPI, 2021).

2.2 Inflamação

A etimologia da palavra inflamação vem do latim *Infammo* e sua tradução se assemelha a palavra “incêndio”, ao observar os sinais flogísticos: calor, dor, rubor, edema e perda de função, que são causados por esse processo inflamatório, fica evidente o porquê de tal associação (STEWART; BEART, 2016). A inflamação é um componente da resposta imune inata que pode ser estimulada por diversas agressões ao organismo como traumas, danos teciduais, infecções, dentre outros. Esse processo promove alterações celulares, que promovem vasodilatação, o aumento da permeabilidade celular e do fluxo sanguíneo, onde através disso, proteínas, leucócitos e outros componentes do sistema imune podem ser levados ao local lesado e promover o reparo (SINGH et al, 2019; ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012).

A imunidade inata é composta por um grande conjunto de barreiras protetoras, que podem ser definidas como: anatômica, formada pela pele e também por mucosas, fisiológicas, que envolve pH e temperatura, e por fim endócrinas e fagocíticas. Essa última, é representada por células que apresentam receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e permitem a identificação de tais patógenos (por conta dos padrões moleculares associados aos patógenos – PAMPs - presentes na parede celular da bactéria), facilitando a captura desses organismos estranhos (MARSHALL et al., 2018). Além das PAMPs, existem os padrões moleculares associados a danos (DAMPs) que também são responsáveis por sinalizar possíveis danos ou mesmo um estágio mais avançado da lesão (necrose) (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012). Após a identificação, do patógeno ou do dano, pelos receptores de reconhecimento de padrões (RRPs), como os receptores Toll-Like (TLR) promovem a ação de NF- κ B, que após transdução de genes, estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012).

O sistema imune inato realiza esse recrutamento das células imune como macrófagos, neutrófilos, células NK, células dendríticas, para a zona de inflamação, por conta da produção de quimiocinas e citocinas nesses sítios. Essas moléculas têm papel fundamental no que diz respeito a comunicação celular, e que por consequência estão envolvidos na sinalização de diversos mecanismos importantes nessa ação inicial (TAMMA et al., 2020; MARSHALL et al., 2018). Macrófagos, em especial, são células que além de compor essa ação protetora nos momentos iniciais de defesa contra o invasor, são conhecidos pela sua plasticidade, uma vez que podem se diferenciar de modo especial em cada tecido, e apresentam um arsenal de receptores para quimiocinas e citocinas, bem como outras ferramentas envolvidas nesse processo (CASAS-ENGEL; CORBÍ, 2014).

As citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e interleucina do tipo 1 (IL-1), bem como as quimiocinas, exercem atividade coestimuladora. São as principais citocinas

a serem expressas nessa fase inicial inflamatória e são importantes na sinalização dos mecanismos de defesa, na indução da inflamação local e também na morte do invasor, além de estarem envolvidas no desenvolvimento de alguns sintomas típicos da inflamação, em especial a febre (MARSHALL et al., 2018; FIRINU et al., 2016). TNF- α é uma citocina que cumpre diversas ações no sistema imune, seja na proliferação, diferenciação e morte celular, e é secretado por células que exercem esse papel pró-inflamatório (SINGH et al., 2019). IL-6 apresenta funções na inflamação e hematopoiese e é secretada por diversas células, dentre elas, monócitos e macrófagos (SINGH et al., 2019). IL-1 desempenha um papel importante na inflamação, onde durante esse estágio tem ações moduladoras típicas de uma citocina inflamatória, envolvidos na sinalização, liberação de agentes pró-inflamatórios e também no processo de cicatrização, além de apresentar um papel importante na transcrição gênica de fatores inflamatório e quimioatrativos (FIELDS; GÜNTHER; SUNDBERG, 2019; MARTIN, 2016). Logo após sua secreção pode ligar-se aos seus respectivos receptores e iniciar a sua sinalização.

Como descrito no início desse tópico, tais citocinas pró-inflamatórias são ativas graças ao fator nuclear- κ B (NF- κ B), que atua como um componente direto na sinalização desse sistema e está envolvido na ativação de genes pró-inflamatórios em células pertencentes ao sistema imune inato e adaptativo (LIU et al., 2017). Além das citocinas, as quimiocinas, também têm papel importante no recrutamento de células imunológicas, particularmente os leucócitos. Todo esse processo é bem estimulado e definido de acordo a produção de todas essas moléculas (EDLMANN et al., 2017).

Outro fator envolvido nesse processo inflamatório são as espécies reativas de oxigênio (ERO), que estão intimamente ligadas ao sistema imunológico em ambas as respostas (inata e adquirida). Presentes nas células imunológicas, esse papel se configura no momento do combate ao patógeno, uma vez que os altos níveis de ROS produzido *in*

loco é uma forma de proteção logo nos primeiros momentos da defesa (ALFADDA; SALLAM, 2012). Essa produção de ROS ocorre por conta do aumento na expressão oxidativa vinda dos fagócitos durante a inflamação (ALFADDA; SALLAM, 2012). Neutrófilos e macrófagos são responsáveis pela produção de altos níveis de ROS via NOX2 (um dos produtos das atividades enzimáticas da NADPH oxidase), principalmente durante a explosão oxidativa (LUGRIN et al., 2014). Um outro componente importante nessa parte defensiva é o ânion superóxido, que está envolvido dentre outras coisas na função da célula imunológica, além de estar ligado na sinalização redox celular onde estão envolvidas a produção de espécies reativas de oxigênio, com o prolongamento e alta produção de superóxido. Quando a sinalização redox é cessada, todos esse processo culmina no estresse oxidativo, pois não há um balanço equilibrado entre ROS e óxido nítrico (NO) (ZOLLBRECHT et al., 2016).

A produção de óxido nítrico ocorre nos dois tipos de resposta imunológica, a inata e a adaptativa. Na adaptativa, o NO influencia na ativação e diferenciação das células T (GARCÍA-ORTIZ; SERRADOR, 2018). Durante as respostas imune, o NO é produzido em resposta a infecção e sua ação está associada em como os seus níveis serão desenvolvidos. O ideal é que sejam em micromolares, assim o seu êxito seja como regulador ou tóxico no sistema imune será mais extenso (PALMIERI et al., 2020). Em indivíduos septicêmicos, a produção de NO é mais elevada e isso pode acarretar no desenvolvimento de quadros graves no paciente, como hipotensão e falência dos órgãos. Além disso, está envolvido com regulações fisiológicas importantes, como débito cardíaco e por consequência ligado a regulação da pressão sanguínea (EL-HAJ; BESTLE, 2017).

2.3 Resposta imunológica versus serotonina

A serotonina tem ação tanto na imunidade inata, quanto na adquirida (HERR; BODE; DUERSCHMIED, 2017). Dentre as suas funções, ela é conhecida por modular respostas imunológicas por meio da atuação do seu sistema serotoninérgico (MERCADO; KILIC, 2010; SHAJIB; KHAN, 2014). As células imunes apresentam uma particularidade na forma como respondem ao 5-HT, uma vez que o grau de sensibilidade a esse hormônio dita como tais células irão se expressar. Essa diferença é explicada principalmente pela ação dos componentes desse sistema que atuam diretamente na resposta dessas células (ARREOLA et al, 2015). Esse hormônio imunomodulador, permite que macrófagos, células NK, células dendríticas e linfócitos sejam regulados, de modo que, essas células respondam a esse hormônio de forma estimulante ou supressora.

Isso é possível por conta dos diversos receptores serotoninérgicos presentes na membrana das células que ao se ligar a molécula de 5-HT permitem que esses efeitos responsivos sejam expressos (CASAS-ENGEL et al. 2014). A presença de subtipos de receptores 5-HT nas células imunes fazem com que cada ação tenha sua especificidade, uma vez que estes estão designados a um tipo de função diferente. Em macrófagos e mastócitos o receptor 5-HT_{1A} ativam respostas imunológicas pró-inflamatórias, assim como o 5-HT₄ presente nas células dendríticas desempenham ação inflamatória através das quimiocinas (SCHOENICHEN; BODE; DUERSCHMIED, 2019). Além do SERT, que é um receptor muito ativo nessas vias de sinalização celular, os macrófagos ainda apresentam o TPH1 e a enzima MAO que estão envolvidos nessa ação moduladora (HERR; BODE; DUERSCHMIED, 2017).

O receptor 5-HT₇ estão presentes em diversas células, inclusive as que não tem relação com sistema imunológico. Estudo *in vitro* revelou que o receptor 5-HT₇ desempenha um efeito importante nas células imunes. No entanto, muitas lacunas ainda

não foram preenchidas, mas é notado que sua atuação não segue um padrão específico em todas as células, uma vez que através da sua sinalização as células dendríticas expressam citocinas pró-inflamatórias, assim como os linfócitos que também segue esse perfil inflamatório, principalmente na proliferação celular. Nos macrófagos é observado uma variação nas respostas, podem se apresentar de forma anti-inflamatória ou pró-inflamatória (QUINERO-VILLEGAS; VALDÉS-FERRER, 2019).

Os macrófagos do tipo M1 quando ativados apresentam respostas pró-inflamatórias, expressando citocinas com o mesmo perfil, são elas a IL-6, IL-12 e TNF α , enquanto que macrófagos M2 dispõe de um perfil anti-inflamatório, atuando na expressão de citocinas que expressam esse mesmo tipo de resposta, como por exemplo IL-10 (YUNNA et al., 2020). A serotonina em meio inflamatório, induzido via LPS interfere e modula a resposta imune promovendo a alta expressão de genes que estão ligados ao perfil M2 (macrófagos anti-inflamatórios) e reduzindo a expressão dos genes que estão ligados ao perfil M1 (macrófagos pró-inflamatórios) (ROUMIER; BÉCHADE; MAROTEAUX, 2019).

Em situações convencionais, onde as células imunes são expostas a algum tipo de patógeno, algum dano celular, ou inoculadas *in vitro* com LPS, e dentre outras situações, é notado que estas se comportam de forma pró-inflamatória, pois a via de sinalização do NF- κ B é ativada, devido ao TLR4, resultando na expressão de citocinas pró-inflamatórias, liberação de NO e a expressão de IL-1 β , e IL-6 (VALÍČEK; LOJEK; ČÍŽ, 2020). Entretanto, a literatura mostra que a serotonina pode bloquear essa ação pró-inflamatória, uma vez que na presença de 5-HT esse comportamento tende a não seguir esse padrão, mostrando essa influência supressora em células que provavelmente teriam uma atividade inflamatória, com a modulação da serotonina produziram uma resposta anti-inflamatória expressiva, através da baixa expressão de citocinas TNF- α e IL-6

(VAĽÍĀEK; LOJEK; ĀÍŹ, 2020).

Foi elucidado que um conjugado de serotonina-ácido graxo, o docosa-hexail-serotonina (DHA-5-HT) promoveu uma baixa expressão gênica na resposta imune inata e atenuou a cascata de sinalização de IL-23-IL-17 quando macrófagos inoculados com LPS foram expostos ao DHA-5-HT (POLAND et al., 2016). Outro estudo evidenciou que macrófagos alveolares tratados com 5-HT e inoculados com LPS apresentam uma baixa na secreção de algumas citocinas, como TNF- α e IL-12 e um aumento na expressão de citocinas como IL-10, óxido nítrico e prostaglandina-E2 (ARREOLA et al, 2015). Em macrófagos foi mostrado que, quando tratados com a serotonina, as citocinas pró-inflamatórias foram inibidas e, em casos de reparo celular o aumento de fibroblasto e proliferação celular foram realizados, no intuito de reparar a lesão tecidual (CASAS-ENGEL et al. 2014).

A relação entre macrófagos e serotonina também é discutida no âmbito psiquiátrico, isso por que estudos mostraram que a 5-HT pode estar envolvido no desenvolvimento de diversos transtornos psíquicos, visto que há indícios principalmente na regulação de importantes componentes do sistema imune no cérebro, em especial os macrófagos (CASAS-ENGEL et al. 2014). No entanto, essa relação ainda não é muito elucidada, mas pode ser um indicativo desse envolvimento da 5-HT nas respostas psíquicas x imunológicas, principalmente em funções que envolvem estímulos sensoriais e que refletem ações comportamentais modificadas por conta dessa interação(CASAS-ENGEL et al. 2014).

2.4 *Escherichia coli*

E. coli é uma bactéria gram-negativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, que apresenta um formato de bacilo quando vista em sua forma microscópica (JANG et

al., 2017). Esse microrganismo pode dispor de flagelos que facilitam sua movimentação ou pili que permite a adesão do mesmo nas superfícies (EPLER BARBERCHECK; BULLITT; ANDERSSON, 2018; BLOUNT, 2015). Sua fisiologia é descrita como aeróbio facultativo, ou seja, pode sobreviver na presença ou ausência de oxigênio (BLOUNT, 2015). No entanto, em ambientes hostis a sua sobrevivência pode ficar comprometida, como em situações de temperaturas ou pH extremos (BLOUNT, 2015). Em meio ricos e específicos para o seu crescimento, a sua duplicação pode ocorrer a cada 20 minutos (ROSANO; MORALES; CECCARELLI, 2019).

A sua virulência pode propiciar o desenvolvimento da sepse. De forma geral alguns elementos propiciam esse acontecimento, como lipopolissacarídeo (LPS), cápsula de polissacarídeo, flagelos, vesículas da membrana externa, pili, proteínas da membrana externa (OMPs). Essas estruturas são consideradas fatores de virulência (TERLIZZI et al., 2017; VILA et al., 2016). Um estudo evidenciou que cepas patogênicas, do grupo filogenéticos B2 e D, que apresentam diversos desses fatores de virulência, exercem uma atividade patogênica exacerbada (CHAKRABORTY et al., 2015).

E. coli pode causar infecções extra-intestinais, infecções na pele, osteomielite, meningite e epidídimo-orquite (VILA et al., 2016). Além disso, infecções uropatogênicas por *Escherichia coli* (UPEC) são frequentes em UTIs, bem como, infecções na vagina, bexiga, colonização renal, danos em tecidos e elevada ocorrência de bacteremia são associadas a este patógeno (TERLIZZI et al., 2017). Esse microrganismo também pode causar uma série de infecções em gestantes e intra-amniótica, além de sepse neonatal. A sua transmissão ocorre após a ruptura da membrana na passagem do bebê pelo canal vaginal, promovendo essa colonização e instalando essa infecção prematura no neonato (VILA et al., 2016; GUIRAL et al., 2010).

Foi descoberto que os biofilmes produzidos pela *E. coli* são responsáveis por

causar vários tipos de infecções intestinais (SHARMA et al., 2016). O biofilme é descrito como um aglomerado de microrganismo viventes em um ambiente úmido e estável, como cateteres, ventiladores, lente de contato. À medida que se instalam na superfície, os microrganismos começam a secretar substâncias que ajudam a prolongar essa sobrevivência (SHARMA et al., 2016). As cepas de *E. coli* que apresentavam biofilme foram descritas como resistentes a diversos antibióticos, como ampicilina, amoxicilina, norfloxacin, cefuroxima, e ceftriaxona. No entanto, as que não apresentavam formação de biofilme, não tinham adquirido essa resistência (SHARMA et al., 2016).

E. coli é um microrganismo que por ter sido muito estudado, apresenta uma gama de informações que proporciona uma maior facilidade para quem deseja trabalhar com essa bactéria, visto que não necessita de oxigênio para o crescimento e tem a sua sequência genômica completa (ALLOCATI et al., 2013). A sua resistência a diversos antibióticos evidencia que existem genes que são responsáveis por essa mudança e isso compromete o tratamento de diversas doenças humanas e animais (POIREL et al., 2018). A produção de vacinas contra o *E. coli* são discutidas no meio científico, muitas delas são de cepas atenuadas. Dentre as recomendações, foram listados alguns pré-requisitos, como a promoção de desempenho seguro, alta expressão de antígenos, imunogenicidade melhorada, dentre outros (NESTA; PIZZA, 2018).

2.5 *Staphylococcus aureus*

S. aureus é classificado como cocos, gram-positivo, que apresenta formato esférico, e geralmente ficam dispostos em formato de “cachos de uva”. A virulência em clones de *Staphylococcus aureus* está diretamente ligada a um aumento da presença da toxina Leucocidina de Pantón-Valentine (PVL), bem como, a capacidade de formação de biofilmes (LEE et al., 2018; NORIEGA; SEAS, 2010). Essa bactéria também dispõe de

um aparato de virulência que inclui toxinas, enzimas, adesinas e uma série de proteínas específicas de superfície que ajudam esses organismos a se estabelecerem mesmo em condições não favoráveis, além de ajudá-lo na invasão tecidual (FRIERI; KUMAR; BOUTIN, 2017).

São comumente encontrados em fossas nasais de indivíduos saudáveis, entretanto, se essa bactéria alcançar a corrente sanguínea ou mesmo os tecidos internos pode causar algumas infecções e gerar doenças mais graves (TAYLOR; UNAKAL, 2018). Dentre essas doenças estão o desenvolvimento de choque séptico, doença infecciosa aguda, endocardite, pneumonia, empiema ou infecções ósseas e articulares complicadas por tromboflebite séptica, além de foliculite, furúnculos, carbúnculos, celulite (TONG et al., 2015). *S. aureus* é um dos principais agentes infecciosos relacionados a sepse (PEDRO; MORCILL; BARACAT, 2015; PINTO *et al.*, 2017; WEISS *et al.*, 2015). Os fatores de virulência presentes em *S. aureus* podem interferir no processo responsivo da sepse, seja nas respostas imunes, na coagulação ou também no endotélio. Além disso, quando essa bactéria está na corrente sanguínea pode levar a endocardites, pois pode ocorrer infecção nas válvulas cardíacas e dano endotelial (KWIECINSKI; HORSWILL, 2020).

Os primeiros relatos de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) foram na década de 60, onde ocorreram os primeiros relatos de resistência a meticilina. No entanto, esse não foi o primeiro antibiótico a apresentar essa resistência, uma vez que a resistência no combate de infecções usando penicilina também não estava sendo tão eficaz (TURNER et al., 2019; LOBANOVSKA; PILLA, 2017). As cepas resistentes ao antibiótico invadiram de forma persistente diversos hospitais e a população, que se infectou em uma velocidade preocupante ao longo dos anos (LOBANOVSKA; PILLA, 2017). A resistência à meticilina nessa bactéria promove também a resistência a grande parte de antibióticos β -lactâmicos (PATERSON; HARRISON; HOLMES, 2014). Além disso,

diversas cepas de *S. aureus* também têm sido descritas como portadoras de mais um tipo de resistência. A vancomicina, que é um medicamento importante no combate as infecções causadas por MRSA, uma vez que ele tem um alto poder efetivo no combate de algumas infecções, é um exemplo de resistência que tem surgido em concomitância com a resistência a metilina (TURNER et al., 2019).

As bactérias *S. aureus* e *E. coli* foram utilizadas durante os experimentos do presente estudo, no intuito de analisar a ação da serotonina em diferentes tipos de infecção, uma vez que estes microrganismos estão sendo utilizados pela primeira vez em um estudo onde é analisado a modulação da serotonina em diversos tipos de análises imunológicas via resposta pró-inflamatória.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da serotonina em macrófagos peritoneais e esplênicos de camundongos inoculados com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, através de análises específicas para alguns efeitos pró-inflamatórias.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I) Avaliar a expressão gênica de citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 induzida por inoculação de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em cultura de macrófagos peritoneais e esplênicos de camundongos tratados ou não com 5-hidroxitriptamina;

II) Analisar os níveis de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio induzidos por inoculação de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em cultura de macrófagos peritoneais e esplênicos de camundongos tratados ou não com 5-hidroxitriptamina;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Para o desenvolvimento do projeto foram utilizados 13 camundongos machos da linhagem C57BL/6, com idade entre seis e oito semanas. Os animais foram divididos em gaiolas com até cinco animais, que foram mantidas em ambiente, com a temperatura controlada em torno de 23° C, controle de 12 horas claro e 12 horas escuro e acesso livre a água e ração. Esse estudo foi realizado após aprovação do Comitê de Ética de Animas (CEUA) da Universidade Federal da Bahia, protocolo nº 090/2020.

4.2 Inóculo

Para o inóculo foram utilizadas a cepa clínica de *S. aureus* que foi isolada em um estudo prévio realizado pelo grupo, esta apresenta genes *norA*, *mecA* e *blaZ*, respectivamente resistente a fluoroquinolona e beta-lactâmicos (CARVALHO *et al.*, 2017) e a cepa ATCC 57897 de *E. coli* (cepa bacteriana uropatogênica resistente a carbapenêmicos). As bactérias foram reativadas em caldo BHI por 24 horas e, após esse período, foram semeadas em BHI ágar pela técnica de semeadura por estrias e incubadas por 24h a 37° C. As diluições de 1 a 3 colônias em solução salina 0,9% estéril foram realizadas, sendo que uma alíquota do tubo foi transferida a uma cubeta de quartzo para leitura no espectrofotômetro com os seguintes parâmetros: 0,135_{Abs} (660 nm), equivalente a 1×10^8 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) (OLIVEIRA, 2013). Foi utilizado 100ng/mL de lipopolissacarídeos (LPS - Lipopolissacarídeos da *E. coli* O111: B4, Sigma-Aldrich, Brasil).

4.3 Cirurgia Intracerebroventricular (ICV) e tratamento com 5-HT *in vivo*

A necessidade da cirurgia ICV para administração do hormônio é essencial ao experimento, principalmente no grupo de animais que foram tratados *in vivo*. Para que o tratamento seja efetivo a escolha da região cerebral ao qual será administrada a substância é de extrema importância. Para isso é utilizado o estereotáxico para roedores que tem a função de posicionar com exatidão a região do ventrículo lateral direito no animal (local escolhido), usando as seguintes coordenadas: A/P: -0,4 mm, M/L: +1,0 mm e D/V: -2,3 mm (Kim et al, 2017). Delimitada a região, torna-se possível a aplicação das injeções com o hormônio.

Todos os animais realizaram a cirurgia intracerebroventricular (ICV). Para realização do procedimento os camundongos foram anestesiados (xilazina 10 mg/kg e cetamina 100 mg/kg) e posicionados no estereotáxico para roedores. O primeiro grupo que realizou o procedimento, foram o de animais tratados com a serotonina, ou seja, o grupo *in vivo* que recebeu o hormônio 5-HT via ICV (1mg/1mL) (MOTA et al., 2017). Finalizada a cirurgia os camundongos foram realocados em suas gaiolas e monitorados por um tempo determinado, após 30 minutos de tratamento foi administrado na região peritoneal o LPS e após 90 minutos da indução inflamatória, os animais foram eutanasiados. O segundo grupo a passar por esse procedimento foram os camundongos Sham que não receberam o hormônio *in vivo*, mas sim, ácido ascórbico (0,1%) via ICV, após 30 minutos os animais foram eutanasiados.

4.4 Extração de Macrófago Peritoneais e Esplênicos de Camundongos

Para a obtenção dos macrófagos peritoneais murinos (MPMs), o meio tioglicolato a 3% foi injetado no peritônio de todos os animais 72 horas antes do experimento, no intuito de induzir o recrutamento de macrófagos para a região. Após esse período, os

animais passaram pelo mesmo procedimento de extração dos macrófagos. Foi feita uma lavagem no peritônio dos camundongos usando meio RPMI simples, para realizar a extração dos macrófagos peritoneais. Para os animais tratados *in vivo*, antes da lavagem peritoneal, foi realizada inoculação peritoneal contendo LPS (100 ng/mL), citado no tópico anterior, no intuito de induzir uma inflamação local, pois a própria serotonina poderia impedir esse processo de migração (MOTA et al., 2017). Os animais Sham não passaram pela indução de inflamação.

Os macrófagos esplênicos foram extraídos através da maceração do baço. As células foram isoladas baseado no protocolo de Lu, Varley e Munford, (2013) e Jorge e Castro (2000), respectivamente. Após a extração, os macrófagos foram quantificados utilizando câmara de Newbauer.

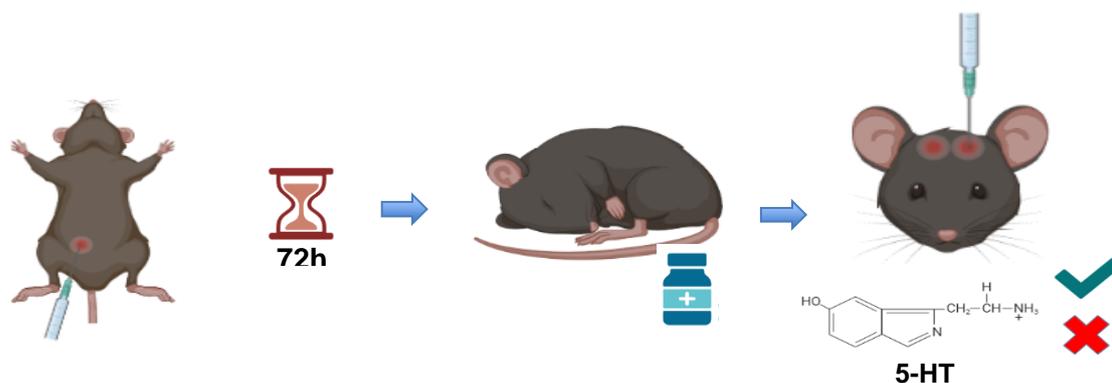


Figura 1. Todos os animais receberam injeção intraperitoneal contendo tioglicolato a 3%. Após 72 horas, esses animais foram anestesiados e assim foi possível realizar a cirurgia ICV, no intuito de administrar a serotonina, ou seu veículo. Imagens: BioRender

4.5 Plaqueamento dos macrófagos esplênicos e peritoneais

Foram depositados 500 µL de células (diluídas a 2×10^5 células/mL) em cada poço de placa contendo 24 poços para processo de adesão e diferenciação das células (SANTOS JUNIOR; MARQUES; TIMENETSKY, 2022). As placas foram incubadas em estufa de CO₂, a 37°C, onde ocorreu a diferenciação de macrófagos. Após esse período, foram realizadas trocas de meio, onde as células não aderidas foram retiradas e novamente incubadas. No grupo tratado *in vitro*, antes da inoculação bacteriana, foi adicionado o hormônio 5-HT em diferentes concentrações: 10^{-3} M, 10^{-6} M, 10^{-8} M (VAŠÍČEK; LOJEK; ČÍŽ, 2020), seguido de uma nova incubação por 24h (PRIYADARSHINI; PRADHAN; AICH, 2018). Após a incubação todos os grupos do experimento passaram pela inoculação bacteriana (*S. aureus* ou *E. coli*) e controle negativo (salina). Finalizado a infecção, os poços de macrófagos tratados *in vitro* (grupos que vão verificar a ação da serotonina diretamente no macrófago), *in vivo* (grupo do modelo experimental que verifica a ação neuroimune do hormônio) e também os não tratados (grupo controle do experimento) voltaram novamente para incubação em estufa de CO₂, a 37°C por 3 horas. O sobrenadante de cada poço foi coletado e guardado em microtubos. As células ressuspensas em 1mL de RNAlater. Todo material foi armazenado a -70 °C. Com isso, forma os seguintes tipos de tratamento:

Grupo de macrófagos tratados *in vivo*: Macrófagos peritoneais ou esplênicos de camundongos tratados com a serotonina (1mg/1mL) *in vivo* via cirurgia intracerebroventricular.

Grupo de macrófagos tratados *in vitro*: Macrófagos peritoneais ou esplênicos de camundongo Sham tratados com serotonina efetivamente nas células, em dosagens diferentes, são eles: 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-8} .

Grupo de animais Sham sem tratamento: Macrófagos esplênicos ou peritoneais

de animais Sham que não foram tratados com o hormônio.

4.6 Divisão geral dos grupos

Cada tratamento foi subdividido em três tipos de inoculações (*S. aureus*, *E. coli*, ou salina), que totalizou 30 subgrupos (todos realizados em, no mínimo, quadruplicata) (Figura 2).

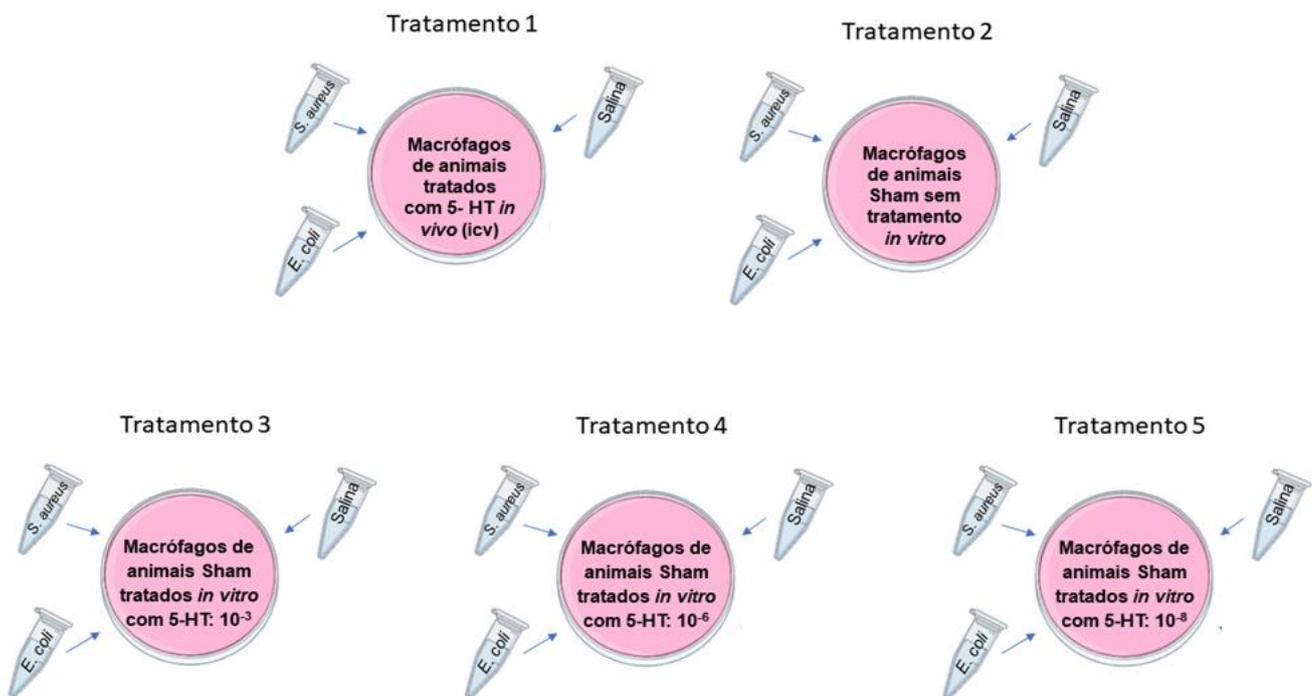


Figura 2: Cinco grandes grupos de macrófagos esplênicos ou peritoneais e 30 subgrupos correspondentes a cada inoculação (*S. aureus* e *E. coli*) e controle negativo (salina).

4.7 Expressão gênica de citocinas por RT- qPCR

Para extração de RNA foi utilizado o protocolo do TRIzol® Plus RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific). As amostras que foram armazenadas em RNAlater foram centrifugadas a 10.000rpm por 5 minutos. Após seguir o protocolo escolhido, a concentração de RNA foi dosada pelo Espectrofotômetro Nanodrop. Foi utilizado o kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen- Life Technologies) para síntese de cDNA. Foram adicionados um mix A aos mRNAs e água livre de RNase (para um volume final de 12µL). Posteriormente esse material foi incubado a 60°C por 1 minutos. Terminado o procedimento, foi feita uma centrifugação de 14000 rpm por 30 segundos. Em seguida foi adicionado o mix B (1µL de tampão 10X First-Strand, 2µL de DTT, 1 µL de RNaseOUT™, 1µL de SuperScript™ III RT) e as amostras foram incubadas em termociclador a 50 °C por 60 minutos e 70 °C por 15 minutos. Posteriormente o cDNA foi armazenado a -70 °C para análise da expressão gênica.

A expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias foi avaliada pelo RT - qPCRarray. Foi utilizado o ensaio de expressão gênica SYBR® PCR Master Mix (AppliedBiosystems™) para os genes-alvos: TNF- α , IL-1 β , IL-6, genes endógenos (GAPDH) e genes controle. A amplificação foi feita pelo termociclador StepOne Plus, com os seguintes ciclos: 50 °C por 10 minutos, 95 °C por 10 minutos, 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Depois dessa amplificação foi avaliada a curva de Melting. Os dados foram analisados pelo método comparativo ($2^{\Delta\Delta Ct}$) e a normalização foi realizada com base na expressão do gene de GAPDH de acordo com as orientações do fabricante do kit.

4.8 Dosagem de Óxido Nítrico

A concentração de óxido nítrico foi dosada seguindo o método de Griess. Em placas de 96 poços foram adicionados 50 μ L da amostra dos sobrenadantes, em seguida foram adicionados 50 μ L de sulfanilamida, posteriormente as placas com a mistura foram incubadas por 10 minutos a 25°C. A solução naftiletilenodiamina foi adicionada aos poços (50 μ L). Ao final, as placas seguiram novamente para a incubação por mais 10 minutos. A absorbância foi medida a 560nm usando um leitor de microplacas.

4.9 Dosagem Peróxido de Hidrogênio

Para a realização da análise foi utilizado o o kit Amplex Red de peróxido de hidrogênio/peroxidase, seguindo as instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific). A priori foram feitas alíquotas de 50 μ L das amostras de curva padrão controles e amostras experimentais foram adicionadas em poços individuais em uma placa de 96 poços. Após isso a solução A do reagente Amplex Red/HRP (50 μ L) foi adicionada em todos os poços, posteriormente essa placa seguiu para a incubação durante 30 min em temperatura ambiente, longe da luz. Por fim foi medida a sua absorbância a 550 nm usando um leitor de microplacas e assim foi possível construir uma curva padrão e medir a concentração de H₂O₂ (μ M) do sobrenadante de cultura.

4.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad-Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA-EUA). Os resultados foram expressos como média mais ou menos o desvio padrão da média (DPM). As diferenças nos valores entre dois grupos com distribuição normal e homogeneidade de variâncias foram determinadas pelo teste t de Student. Foi realizado o teste ANOVA e o pós teste de Bonferroni. As diferenças

estatísticas serão consideradas significativas quando $p < 0,05$, com intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da inoculação

A Figura 1 mostra a comparação das respostas de macrófagos obtidos de animais sham controle e inoculados os microrganismos. Foi observado que a infecção foi efetiva, onde em todos os grupos que foram inoculados com as bactérias *S. aureus* e *E.coli* apresentaram maiores produções de óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e altas expressões das citocinas em comparação ao grupo controle (sem bactéria). Em anexo estão disponíveis as figuras correspondentes aos demais grupos tratados *in vivo* (ICV) ou *in vitro* com 10^{-3} M, 10^{-6} M, 10^{-8} M de 5-HT (Figuras S1, S2, S3 e S4), onde também foram observadas infecções efetivas.

5.2 Análise da produção de Óxido Nítrico

Foi observada uma diminuição na concentração de óxido nítrico em ambos os grupos de macrófagos (peritoneais e esplênicos) infectados e tratado com 5-HT *in vivo* (ICV) e de animais sham tratados *in vitro* com 5-HT nas concentrações de 10^{-3} M e de 10^{-6} M independentemente do tipo de inoculação realizadas (Figuras 2A, 2B, 2C, 2D). No entanto, o mesmo não foi observado com a concentração de 10^{-8} M.

5.3 Análise da produção de Peróxido de Hidrogênio

A produção de peróxido de hidrogênio foi reduzida significativamente em ambos os grupos de macrófagos oriundo de animais sham (peritoneais e esplênicos) infectados com *S. aureus* e tratados *in vitro* com serotonina a 10^{-3} M (Figuras 3B e 3D). No entanto, não foi observado para *E. coli*, em nenhum tipo de tratamento, uma modulação do 5-HT sobre a produção de H_2O_2 (Figuras 3A e 3C).

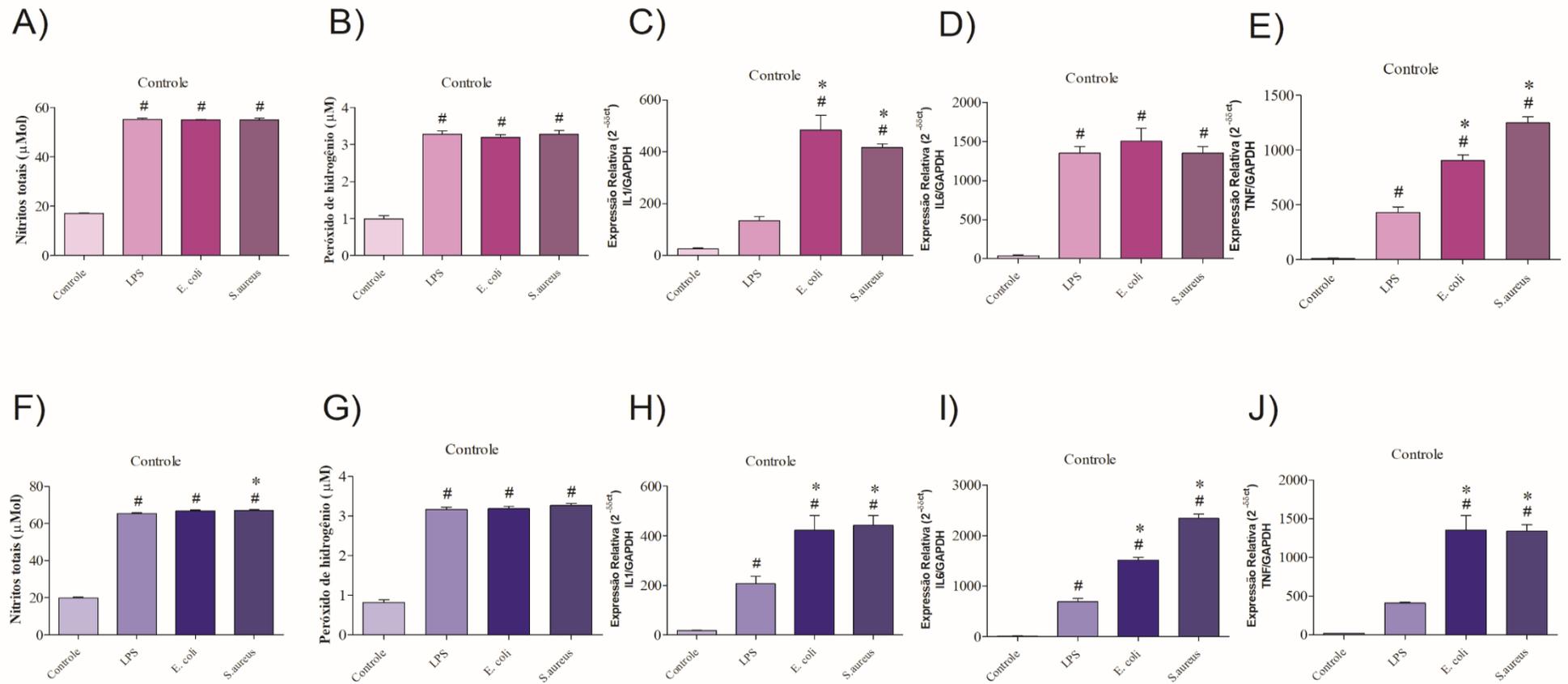


Figura 1. Análises de Óxido Nítrico (A e F), Peroxido de Hidrogênio (B e G), Expressão Gênica das citocinas IL-1 (C e H), IL-6 (D e I) e TNF- α (E e J) referente a cultura de macrófagos esplênicos (A, B, C, D, E) e peritoneais (F, G, H, I, J) de murinos (2×10^5 células) do grupo controle Sham. A primeira coluna representa o grupo controle (sem infecção), seguida dos grupos com as inoculações com Lipopolissacarideo (LPS), *E. coli* e *S. aureus*. Dados expressos como média \pm EPM. *Diferença estatística em relação ao grupo LPS ($p < 0,005$); # Diferença estatística em relação ao controle negativo ($p < 0,005$).

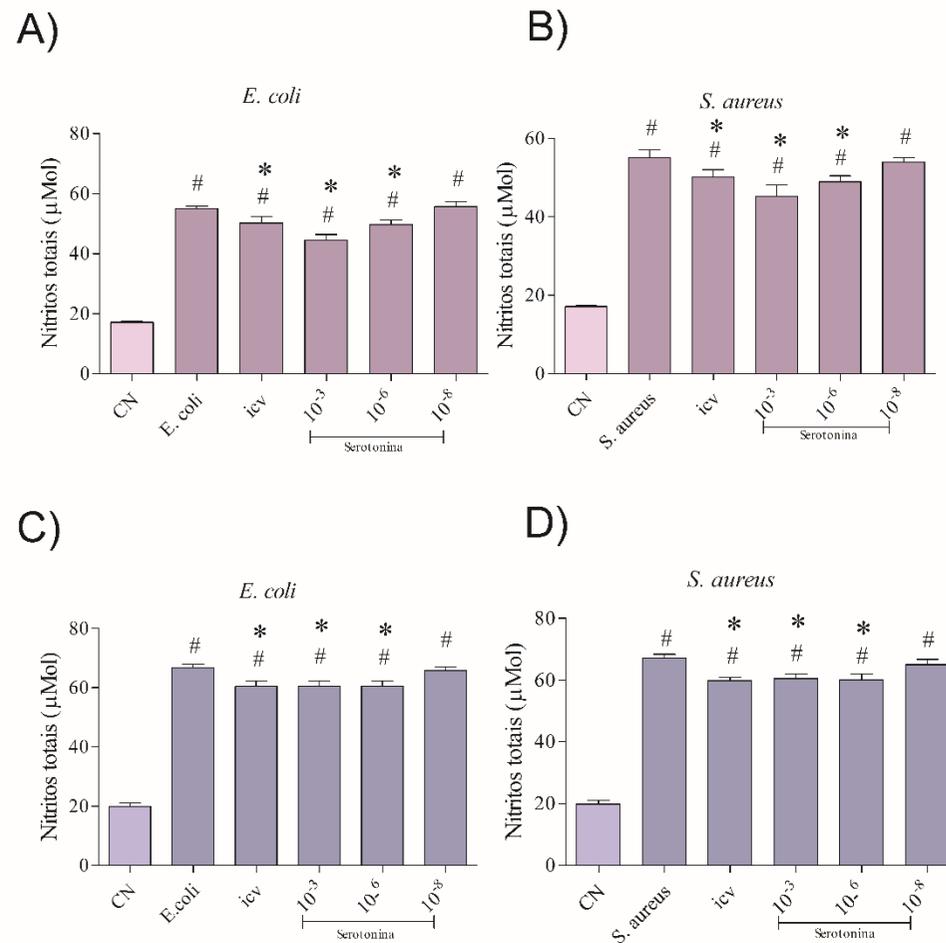


Figura 2. Análise da produção de óxido nítrico em culturas de macrófagos (2×10^5 células) peritoneais (em azul) e esplênicos (em roxo). Comparação entre os grupos inoculados com *E. coli* (A e C) e *S. aureus* (B e D) tratados ou não com serotonina (5-HT). Grupo CN: controle negativo - grupo de animais Sham sem nenhum tratamento); Grupo *E. coli* e *S. aureus*: Controle positivo (Grupo Sham com inoculação de *E. coli* ou *S. aureus*); Grupo ICV: grupo de animais tratado *in vivo* com 5-HT (1mg/1mL) e inoculação de *E. coli* ou *S. aureus*. Grupos 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-8} : Grupos de animais sham que foram tratados *in vitro* com as respectivas concentrações de 5-H e inoculação de *E. coli* ou *S. aureus*. Após 3 horas de incubação (pós inoculação) a 37°C , o sobrenadante foi coletado e a produção de óxido nítrico foi dosada. Dados expressos como média \pm EPM. *Diferença estatística em relação ao controle positivo ($p < 0,05$); # Diferença estatística em relação ao controle negativo ($p < 0,05$).

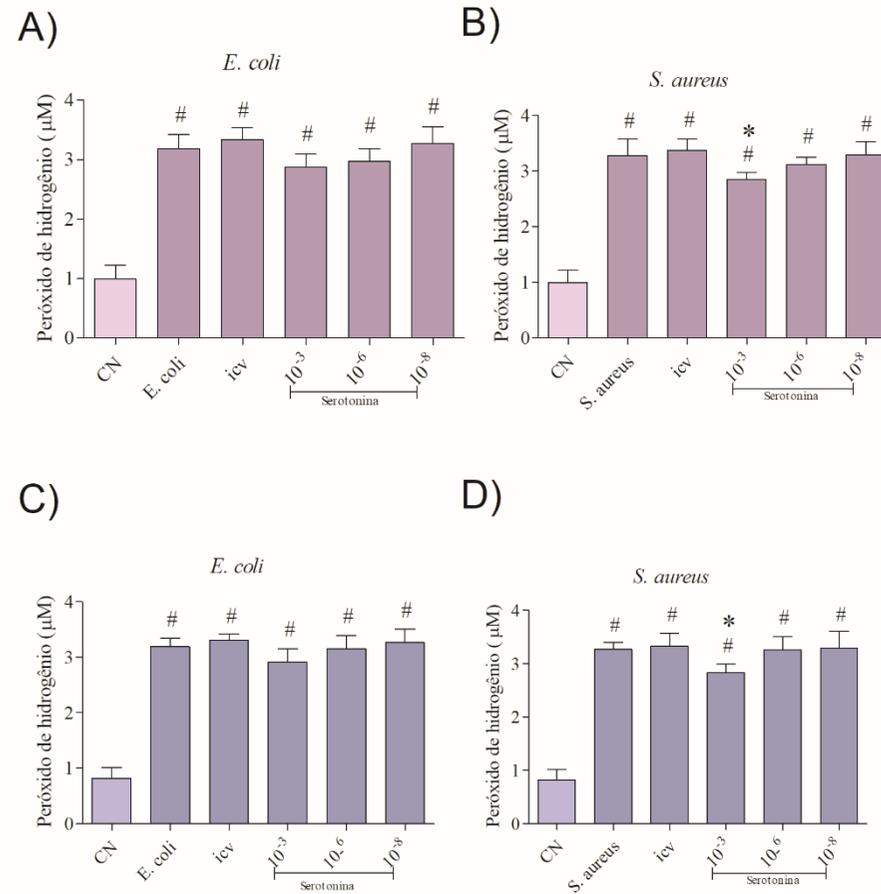


Figura 3. Produção de peróxido de hidrogênio em culturas de macrófagos (2×10^5 células) peritoneais (em azul) e esplênicos (em roxo). Comparação entre os grupos inoculados com *E. coli* (A e C) e *S. aureus* (B e D) tratados ou não com serotonina (5-HT). Grupo CN: controle negativo - grupo de animais Sham sem nenhum tratamento); Grupo *E. coli* ou *S. aureus*: Controle positivo (Grupo Sham com inoculação de *E. coli* ou *S. aureus*); Grupo ICV: grupo de animais tratado *in vivo* com 5-HT (1mg/1mL) e inoculação de *E. coli* ou *S. aureus*. Grupos 10⁻³, 10⁻⁶ e 10⁻⁸: Grupos de animais sham que foram tratados *in vitro* com as respectivas concentrações de 5-H e inoculação de *E. coli* ou *S. aureus*. Após 3 horas de incubação (pós inoculação) a 37°C, o sobrenadante foi coletado e a produção de óxido nítrico foi dosada. Dados expressos como média±EPM. *Diferença estatística em relação ao controle positivo (p<0,05); # Diferença estatística em relação ao controle negativo (p<0,05).

5.4 Análise da expressão gênica da citocina IL-1 β

O tratamento com a serotonina foi capaz de reduzir a expressão de IL-1 β nos macrófagos peritoneais e esplênicos inoculados com *E. coli* e *S. aureus* oriundo de animais sham tratados *in vitro* nas concentrações de 10⁻³M e 10⁻⁶M (Figuras 4A, 4B, 4C e 4D). Para o grupo de macrófagos oriundo de animais tratados *in vivo*, esse efeito foi observado para as inoculações com *E. coli* e *S. aureus*. Nos macrófagos oriundo também de animais tratados *in vivo* e inoculados *E. coli* (Figuras 4A e 4C), houve uma redução exacerbada, que não foi possível verificar diferença em relação ao controle negativo. Não foram observados efeitos supressores na expressão de IL-1 β utilizando o 5-HT na concentração de 10⁻⁸M em nenhuma inoculação utilizada.

5.5 Análise da expressão gênica da citocina IL-6

Macrófagos peritoneais e esplênicos oriundo de animais sham tratados *in vitro* com 5-HT nas concentrações de 10⁻³M e 10⁻⁶M e oriundos de animais tratados *in vivo* tiveram reduzidas expressões da citocina IL-6 nas inoculações com *S. aureus* e *E. coli* (Figuras 5A, 5B, 5C e 5D). O tratamento *in vitro* com o hormônio na concentração 10⁻⁸M não induziu efeitos significativos.

5.6 Análise de expressão gênica da citocina TNF- α

Os dados obtidos para a citocina TNF- α foram variáveis conforme o tipo de inoculação. Em *E. coli*, foi observada uma baixa expressão de TNF- α , induzida pela serotonina nos macrófagos, independente da origem, tratados *in vitro* nas concentrações de 10⁻³M e 10⁻⁶M e tratados *in vivo* (Figuras 6A e 6C). Especificamente em macrófagos peritoneais dos grupos *in vivo* e 10⁻³M (Figura 6C), houve uma expressão tão reduzida,

que não foi observado diferença estatística com o grupo controle. Para *S. aureus*, a serotonina induziu uma redução na expressão de TNF- α em todos os grupos de macrófagos que passaram pelo tratamento, independentemente do tipo (Figuras 6B e 6D).

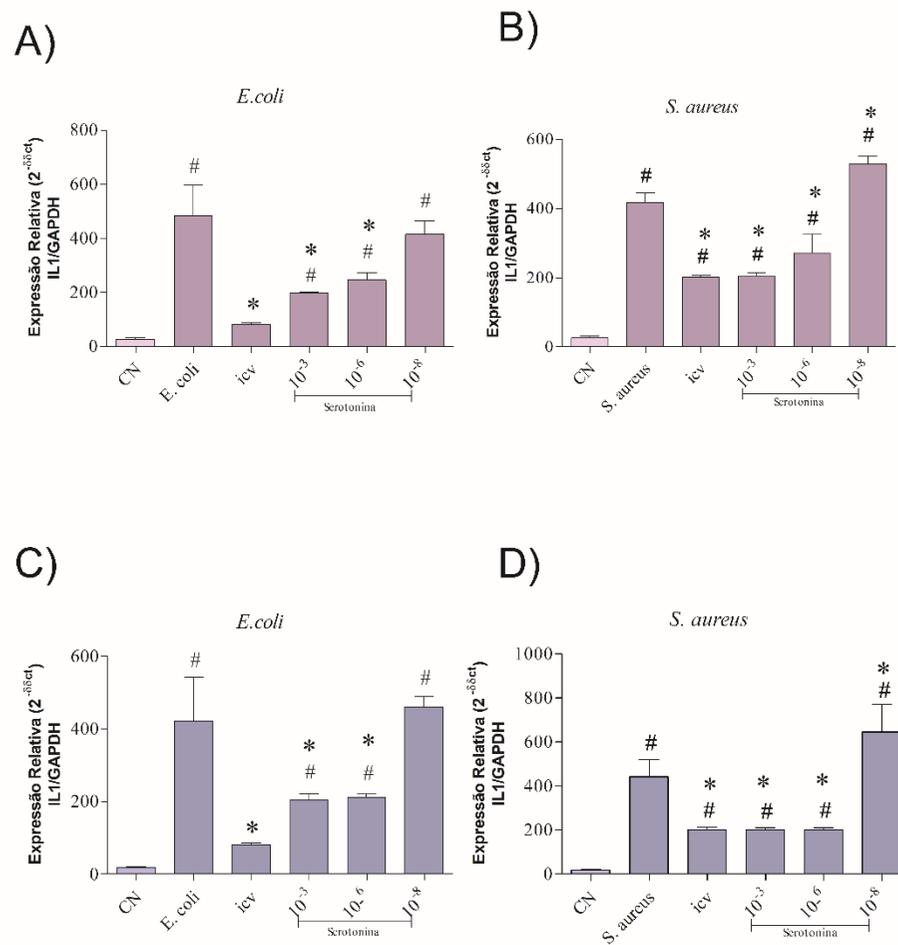


Figura 4. Expressão gênica da citocina IL-1 α em culturas de macrófagos (2×10^5 células) peritoneais (em azul) e esplênicos (em roxo). Comparação entre os grupos inoculados com *E. coli* (A e C) e *S. aureus* (B e D) tratados ou não com serotonina (5-HT). Grupo CN: controle negativo - grupo de animais sham sem nenhum tratamento); Grupo *E. coli* ou *S. aureus*: Controle positivo (Grupo Sham com inoculação de *E. coli* ou *S. aureus*); Grupo ICV: grupo de animais tratado *in vivo* com 5-HT (1mg/1mL) e inoculação de *E. coli* ou *S. aureus*. Grupos 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-8} : Grupos de animais sham que foram tratados *in vitro* com as respectivas concentrações de 5-H e inoculação de *E. coli* ou *S. aureus*. Após 3 horas de incubação (pós inoculação) a 37°C , o sobrenadante foi coletado e a produção de óxido nítrico foi dosada. Dados expressos como média \pm EPM. *Diferença estatística em relação ao controle positivo ($p < 0,05$); # Diferença estatística em relação ao controle negativo ($p < 0,05$).

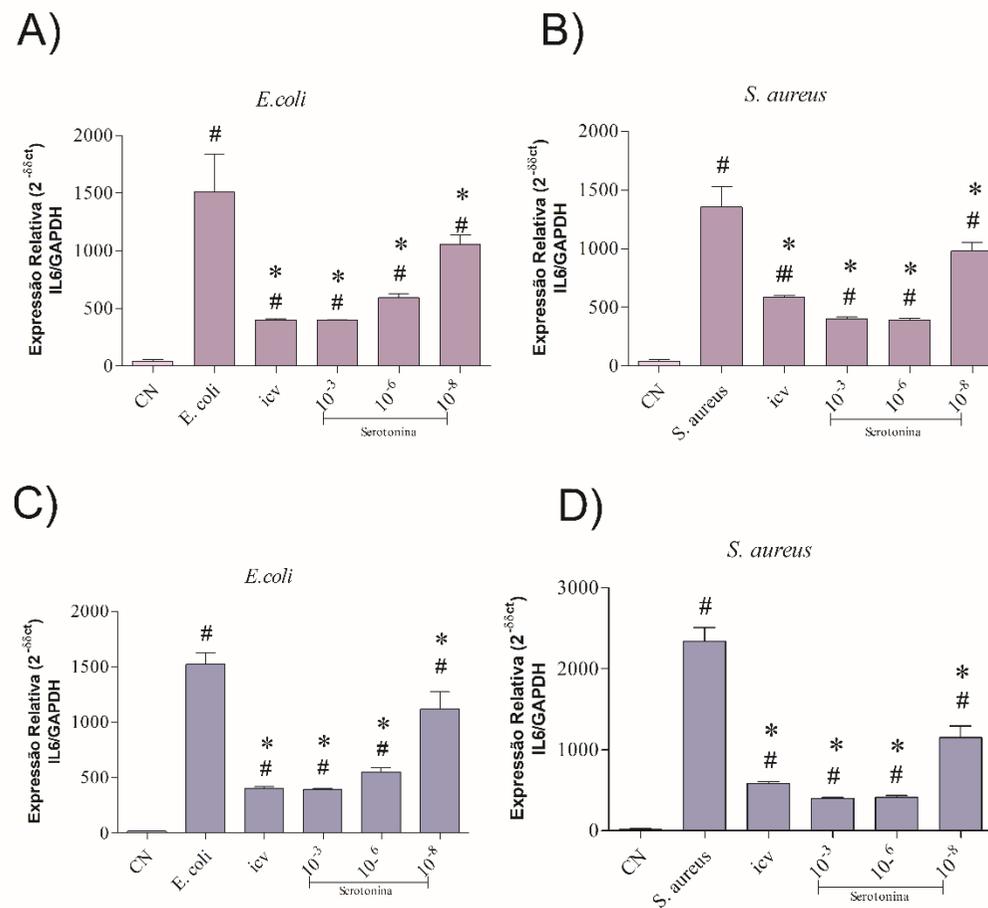


Figura 5. Expressão gênica da citocina IL-6 em culturas de macrófagos (2×10^5 células) peritoneais (em azul) e esplênicos (em roxo). Comparação entre os grupos inoculados com *E. coli* (A e C) e *S. aureus* (B e D) tratados ou não com serotonina (5-HT). Grupo CN: controle negativo - grupo de animais sham sem nenhum tratamento); Grupo *E. coli* ou *S. aureus*: Controle positivo (Grupo sham com inoculação de *E. coli* ou *S. aureus*); Grupo ICV: grupo de animais tratado *in vivo* com 5-HT (1mg/1mL) e inoculação de *E. coli* ou *S. aureus*. Grupos 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-8} : Grupos de animais sham que foram tratados *in vitro* com as respectivas concentrações de 5-H e inoculação de *E. coli* ou *S. aureus*. Após 3 horas de incubação (pós inoculação) a 37°C , o sobrenadante foi coletado e a produção de óxido nítrico foi dosada. Dados expressos como média \pm EPM. *Diferença estatística em relação ao controle positivo ($p < 0,05$); # Diferença estatística em relação ao controle negativo ($p < 0,05$).

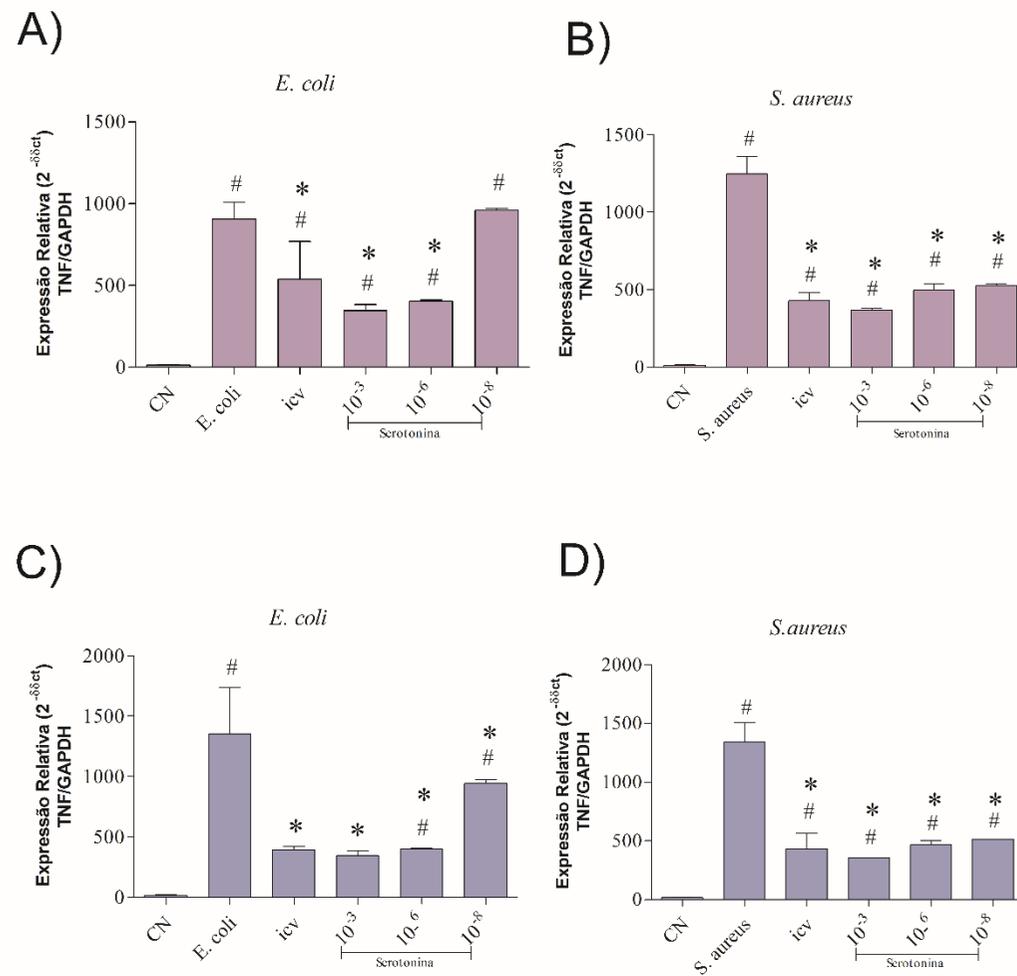


Figura 6. Expressão gênica da citocina TNF- α em culturas de macrófagos (2×10^{-5} células) peritoneais (em azul) e esplênicos (em roxo). Comparação entre os grupos inoculados com *E. coli* (A e C) e *S. aureus* (B e D) tratados ou não com serotonina (5-HT). Grupo CN: controle negativo - grupo de animais sham sem nenhum tratamento); Grupo *E. coli* ou *S. aureus*: Controle positivo (Grupo Sham com inoculação de *E. coli* ou *S. aureus*); Grupo ICV: grupo de animais tratado *in vivo* com 5-HT (1mg/1mL) e inoculação de *E. coli* ou *S. aureus*. Grupos 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-8} : Grupos de animais sham que foram tratados *in vitro* com as respectivas concentrações de 5-H e inoculação de *E. coli* ou *S. aureus*. Após 3 horas de incubação (pós inoculação) a 37°C , o sobrenadante foi coletado e a produção de óxido nítrico foi dosada. Dados expressos como média \pm EPM. *Diferença estatística em relação ao controle positivo ($p < 0,05$); # Diferença estatística em relação ao controle negativo ($p < 0,05$)

6 DISCUSSÃO

A participação da 5-HT na relação neuro-imune vem sendo estudada no meio científico por meio de experimentos, que visam demonstrar a deste hormonal na periferia. A ação direta da serotonina nas células imunes durante o processo inflamatório é fruto da atuação de diversos elementos que dispõe, ora atenuando respostas inflamatórias, ora potencializando essa resposta. Em macrófagos, foi mostrado que o hormônio demonstra uma ação reguladora sobre a célula imune, bem como na expressão de citocinas (SCHOENICHEN; BODE; DUERSCHIMIED, 2019). O presente estudo buscou investigar, pela primeira vez, a ação desse hormônio em diferentes tipos de infecções. A ação da serotonina frente as bactérias *E. coli* e *S. aureus* resultou na supressão das respostas inflamatórias nos diferentes grupos experimentais.

A dosagem de óxido nítrico indicou que os grupos $10^{-3}M$, $10^{-6}M$ e ICV apresentaram menor concentração de nitrito via tratamento 5-HT. Essa situação mostra que a serotonina não induziu, nessas concentrações, uma resposta pró-inflamatória típica, que em condições normais, ou seja, sem a interferência do hormônio, promoveria o aumento de NO. O resultado corrobora com o estudo de Mota et al (2019), no qual foi observado uma redução nos níveis de NO em camundongos tratados com a serotonina. Da mesma maneira, em um estudo usando DHA-5-HT também foi observado a redução das concentrações de nitritos em macrófagos RAW264.7 (POLAND et al., 2016). Essa baixa concentração de nitrito pós infecção, revela algum tipo de interferência direta na expressão da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), visto que em condições normais a enzima é responsável por altas produções de NO em processos inflamatórios (CINELLI et al., 2019). Jeon e colaboradores (2016) ao utilizar o NA-5-HT em cultura de macrófagos infectados com LPS mostrou que proteína iNOS foi suprimida. NA-5-HT foi

capaz de promover ação anti-inflamatória, fruto da inativação da fosforilação de componentes pertencentes ao NF- κ B, através da supressão da via IKK/NF γ e Akt e fomentam a hipóteses de que o NA-5HT está ligado a baixa expressões de MAPKs/AP-1 ou da via PI3K/Akt.

No presente estudo, os níveis de estresse oxidativo, *in vivo* e *in vitro*, também foram reduzidos nos grupos tratados com 5-HT apenas na concentração de 10^{-3} M. A interferência da serotonina nessa concentração suprimiu a expressão de peróxido de hidrogênio de forma significativa. Em um experimento similar, utilizando as mesmas dosagens de hormônio *in vitro* (10^{-3} M, 10^{-6} M e 10^{-8} M), evidenciou que o tratamento com serotonina e N-acetylserotonina foi capaz de reduzir a produção de H₂O₂. No entanto, o maior efeito foi também verificado no tratamento na concentração de 10^{-3} M (VAŠÍČEK; LOJEK; ČÍŽ, 2020). Schuff-Werner e colaboradores (1995) evidenciaram no estudo que a 5-HT atua no processo inflamatório local como um antioxidante, reduzido os níveis de espécies reativas de oxigênio. A literatura mostra que a serotonina promove a redução da produção de ROS, através do receptor 5-HT₂ em fagócitos humanos (DUERSCHMIED, 2019). Um experimento em cultura de macrófagos tratados com NA-5HT evidenciou que a substância promove a elevação de produção de enzimas antioxidantes, uma vez que modula a via JNK/MAPK/Nrf2 e também PI3K/ Akt/Nrf2 (JEON et al., 2016).

A expressão da citocina IL-1 foi atenuada com 5-HT nas dosagens *in vitro* 10^{-3} M, 10^{-6} M e *in vivo*. Essa resposta segue o mesmo padrão encontrado na produção de NO e ROS, uma vez que esses grupos tratados com 5-HT reduziram as ações inflamatórias de forma efetiva. A baixa expressão da citonina IL-1 β foi igualmente observada em células da glia tratadas com 5-HT (YANG et al., 2022). Em contraste, células mononucleares do sangue periférico humano estimuladas com LPS e tratadas com o hormônio aumentaram a expressão de IL-1 β (CLOEZ-TAYARANI, 2003). Assim como diversos estudos que

apontam que a 5-HT estimula a produção IL-1 (IDZKO et al., 2004; WILCOX; DUMIN; JEFFREY, 1994), a atenuação da resposta inflamatória está ligada a atuação dos receptores de 5-HT presente nos macrófagos, que estão associados a supressão de respostas imunes, especialmente 5-HTR2B e 5-HT7R, que apresentam perfil anti-inflamatório, uma vez que são expressos por macrófagos M2 (M-CSF) (CASAS-ENGEL et al., 2013). Estão ligados a expressão gênica dessa célula, uma vez que após o tratamento com 5-HT em macrófagos ocorreram alteração nos níveis de mRNA e os dois receptores citados estão envolvidos nesse processo (DE LAS CASAS-ENGEL; CORBÍ, 2014).

A expressão reduzida da citonina IL-6 nas concentrações *in vitro* $10^{-3}M$, $10^{-6}M$ e *in vivo*, evidencia, mais uma vez, a ação anti-inflamatória que a serotonina possui. Um estudo que corrobora com o achado, revela a baixa expressão dessa citocina em células dendríticas derivadas de monócitos moduladas com o 5-HT (SZABO et al., 2018). Da mesma maneira, Kubera e colaboradores (2005) também observaram uma baixa expressão de IL-6. A citocina também apresentou redução significativa quando animais inoculados com LPS foram tratados via ICV com 5-HT (MOTA et al., 2017). A inibição da resposta pró-inflamatória em células tratadas com a serotonina pode ser explicada também pelo eixo 5-HTR7-PKA, que promove em macrófagos, um perfil anti-inflamatório e pró-fibrótico, culminando conseqüentemente com a baixa expressão de citocinas inflamatórias (DOMÍNGUEZ-SOTO et al., 2017). Esse estudo revelou em seus resultados transcricionais que o receptor 5-HT7R atua sobre o PKA e estabelece uma resposta não inflamatória. A ação anti-inflamatória é favorecida através da atuação de PKA que propicia a ativação do CREB e possibilita que o perfil M2 seja estabelecido, por meio da expressão genética (RUFFELL et al., 2009).

Os tratamentos *in vitro* e *in vivo* com a serotonina também foram efetivos na modulação negativa da citocina TNF- α em praticamente todos os grupos analisados

(exceto LPS no grupo ICV). Da mesma maneira, essa citocina foi a única que sofreu modulação na sua expressão em todas as concentrações *in vitro*. Esse resultado evidencia que, independentemente da concentração, a ação do 5-HT na expressão de TNF- α induz esse perfil anti-inflamatório. A baixa expressão de TNF- α em camundongos tratados com 5-HT via ICV também foi relatada no trabalho de MOTA e colaboradores (2019). Assim com a baixa expressão da citocina em monócitos tratados com 5-HT (DÜRCK et al., 2005). A literatura mostra que a quimiocina CCL2 está envolvida no aumento de produção de citocinas anti-inflamatória e na redução da produção de citocinas pró-inflamatórias. (SIERRA-FILARDI et al., 2014). Essa ação negativa na produção de citocinas inflamatórias podem ter a interferência de 5-HT, potencializando a expressão de quimiocina, uma vez que um estudo com macrófagos alveolares que apresentam o receptor 5-HT_{2C} evidenciaram a interferência da serotonina na expressão de CCL2 (MIKULSKI et al., 2010) A baixa expressão de genes que propiciam a atividade pró-inflamatória de macrófagos com perfil M1 (GM-CSF) em macrófagos tratados com 5-HT também foram evidenciadas, essa redução foi comprovada nos genes INHBA, CCR2, MMP12, SERPINE1, CD1B, ALDH1A2 (CASAS-ENGEL et al., 2013).

Os nossos resultados apontam que os grupos *in vivo* e *in vitro* apresentaram baixas expressões frente a diferentes infecções. Os resultados semelhantes mostram que mesmo em condições de tratamento distintos, o perfil de resposta permanece similar. Um experimento *in vitro* usando N-Araquidonoil Serotonina em células RAW264.7 promoveu a baixa expressão de NO, TNF- γ , IL-1 γ ou IL-6 quando infectado com LPS (JEON et al., 2016). Do mesmo modo, um estudo utilizando N-octadecanoil-5-hidroxitriptamida (C₁₈-5HT) evidenciou em experimentos *in vitro* e *in vivo* que tal substância reduziu ações pró-inflamatórias (GIORNO et al., 2021). Com já visto, essas ações anti-inflamatórias ou pró-inflamatória estão ligadas aos diversos tipos de receptores

que a serotonina dispõe, parece implícito dizer que as células tratadas, seja *in vivo* ou *in vitro*, predispõe de um perfil de respostas semelhantes, pautado por mecanismos semelhantes ou componentes similares a ambas as células. Estudos *in vivo* e *in vitro* (células musculares lisas) utilizando agonista do receptor 5-HT_{2A}, o (R)-1-(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-aminopropano [(R)-DOI], promoveu a redução da inflamação via TNF- α . A ação específica desse agonista potencializou a ativação do 5-HT_{2A} que prontamente atuou como inibidor do processo inflamatório (NAU et al., 2013; YU et al., 2008)

As diferentes respostas das concentrações de serotonina *in vitro* foram evidenciadas nos diferentes gráficos. 5-HT a 10^{-3} M e 10^{-6} M apresentaram menores expressões frente as infecções, enquanto 10^{-8} apresentou um número menor de diferenças estatísticas quando comparado ao controle positivo. Um estudo usando macrófagos RAW264.7 apresentaram resultados semelhantes, uma vez que os níveis de NO, IL-6 e TNF foram reduzidos nas concentrações de 5-HT a 10^{-3} M e 10^{-6} M, enquanto 10^{-8} M não apresentou diferença estatísticas (VAŠÍČEK; LOJEK; ČÍŽ, 2020). A ação de inibição da serotonina também foi registrada na expressão de TNF, em diferentes concentrações de 5-HT, especialmente na concentração de 10^{-3} M (ARZT et al., 1991). Esses resultados revelam que o hormônio atua de acordo a sua concentração, uma vez que os níveis de 10^{-3} M, nesse quesito, é o que apresenta maior concentração de serotonina, e em diversos resultados foi apontado como o grupo tratado com menor expressão no quesito inflamatório, em contrapartida 10^{-8} M não causou o mesmo efeito. A literatura mostra que a 5-HT podem modular as expressões de citocina de forma dose dependente, uma vez que em concentrações fisiológicas pode aumentar as expressões das citocinas IL-6 e TNF α , e em concentrações maiores tendem a reduzir a expressões das citocinas pró-inflamatórias citadas (KUBERA et al., 2005).

As culturas de macrófagos peritoneais e esplênicos apresentaram respostas bem similares. No entanto, algumas oscilações utilizando concentrações *in vitro* e *in vivo* foram observadas. Os resultados revelam que macrófagos peritoneais (em movimento livre) e esplênicos (vinculado a um tecido) podem apresentar sinalizações semelhantes quando exposto à 5-HT. Da mesma forma, pesquisadores revelaram resultados similares ao atual estudo, evidenciando que a serotonina suprime a expressão de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos peritoneais e esplenócitos (VOLLMAR et al., 2008). Em contrapartida Ghia e colaboradores (2009) relataram que macrófagos peritoneais estimulados e tratados com 5-HT registram altos níveis de IL-1 β e IL-6. Os macrófagos esplênicos e peritoneais têm potencial de polarizar fenótipos M1 e M2, e a potência nessa polarização pode estar ligada às respectivas regiões, no entanto o aumento de um fenótipo não enfraquece outro em condições normais (ZHAO et al., 2017). Essa versatilidade mostra que a plasticidade dessas células se molda em diferentes situações, mesmo em circunstâncias que as potencializem.

As infecções do estudo mostraram que de forma geral as bactérias *E. coli* e *S. aureus* apresentaram resultados semelhantes, principalmente na expressão das citocinas, salvo algumas exceções. Essas oscilações evidenciam que existem mais de um fator que implica em como as citocinas vão ser expressas, através de seus diferentes mecanismos que serão regidos pela modulação da 5-HT na célula. O NF- κ B e MAPK podem sofrer interferência de vários componentes no seu sistema, como o *I κ B α* , *p65*, *p38*, *Erk* que ao serem suprimidos, especialmente no seu processo de fosforilação, promovem a inibição NF- κ B e MAPK e por conseguinte a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Essa supressão foi relatada em um estudo usando uma substância que atenuou a fosforilação dos componentes citados, em células infectadas com *S. aureus* e conseqüentemente promoveu a baixa expressão de células pró-inflamatórias (WANG et al., 2018). Um estudo revelou

o efeito inibitório de citocinas inflamatórias em macrófagos infectados com LPS, por meio da utilização de um composto específico que interrompeu o processo de fosforilação de p38 e JNK que estão ligados diretamente com a expressão de citocinas inflamatórias (XIE et al., 2012). Esses componentes estão envolvidos com a intensidade da resposta de citocinas inflamatórias, que podem sofrer de alguma forma a interferência da 5-HT, induzindo a fosforilação dessas peças ou suprimindo-as nos diferentes tipos de células, em processos inflamatórios distintos.

Conclui-se que esse hormônio pode estar envolvido na inibição de componentes que regulam a inflamação, de maneira dose dependente e de acordo ao tipo de infecção ao qual este estiver exposto. Além disso, o estudo comparativo feito com as diferentes bactérias trouxeram informações novas, a respeito de como a serotonina atua na resposta imunológica em macrófagos infectados com *S. aureus* e *E. coli*. Em suma, esse estudo reforça a ação negativa que a serotonina causa nas diferentes expressões pró-inflamatórias, especificamente na dosagem de serotonina 10^{-3} que apresentou baixas expressões inflamatórias em todas as análises feitas no estudo. Tais resultados evidenciam um possível potencial anti-inflamatório da serotonina, no entanto mais estudos devem ser realizados para que os mecanismos envolvidos nesse processo sejam mais detalhados.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A modulação da serotonina na resposta inflamatória indica um possível potencial anti-inflamatório;
- Níveis reduzidos de NO nos grupos *in vivo* e *in vitro* (10^{-3} M e 10^{-6} M) demonstram a modulação desse hormônio durante os estágios iniciais da inflamação;
- 5-HT está diretamente envolvida com a supressão das expressões de TNF- α , IL-1 e IL-6 de forma dose dependente;
- A concentração 10^{-3} M é a que apresenta, dentre as demais dosagens desse estudo, maior ação negativa na expressão de agentes inflamatórios, pois foi a única dosagem que reduziu a expressão de NO, ROS e demais citocinas;
- Ao longo dos resultados *E. coli* e *S. aureus* demonstraram similaridades nas expressões, no entanto ocorreram algumas divergências. Nessas condições, pode haver sinalizações e atuações distinta do hormônio em questão, frente aos vários componentes inflamatórios que as bactérias possuem;
- Além disso, o estudo comparativo feito com as diferentes bactérias trouxeram informações novas, a respeito de como a serotonina atua na resposta imunológica em macrófagos infectados com *S. aureus* e *E. coli*.
- Em suma, esse estudo reforça a ação negativa que a serotonina causa nas diferentes expressões pró-inflamatórias, demonstrando que a serotonina pode ser uma substância com potencial anti-inflamatório. No entanto, mais estudos necessitam ser realizados para avaliar a interferência de outros mecanismos envolvidos nesse processo.

REFERÊNCIAS

ALFADDA, A. A.; SALLAM, R. M. Reactive Oxygen Species in Health and Disease. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–14, 2012.

ALLOCATI, N. et al. Escherichia coli in Europe: An Overview. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 12, p. 6235–6254, 25 nov. 2013.

ARREOLA, RODRIGO et al. Immunomodulatory effects mediated by serotonin. **Journal of immunology research**, [s.l.] , abril 2015.

ARZT, E. et al. Serotonin inhibition of tumor necrosis factor- α synthesis by human monocytes. **Life Sciences**, v. 48, n. 26, p. 2557–2562, 1 jan. 1991.

ASHLEY, Noah T.; WEIL, Zachary M.; NELSON, Randy J. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 43, n. 385, p. 2012, 2012.

BLOUNT, Zachary D et al. The unexhausted potential of E. coli. **Elife**, [s.l.], v. 4, 25 mar. 2015. ELife Sciences Publications, Ltd.

CAIRE MJ, REDDY V, VARACALLO M. **Physiology, Synapse**. 2022.

CARVALHO, Suzi P. de et al. Draft Genome Sequences of Two Clinical Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strains Isolated from Healthy Children in Brazil. **Genome Announcements**, v. 5, n. 15, p.1-2, 13 abr. 2017. American Society for Microbiology.

CASAS-ENGEL, M. DE LAS et al. Serotonin Skews Human Macrophage Polarization through HTR2B and HTR7. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 5, p. 2301–2310, 1 mar. 2013

CASAS-ENGEL, Mateo de Las et al. Serotonin Modulation of Macrophage Polarization: inflammation and beyond. : Inflammation and Beyond. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, [s.l.], p. 89-115, 2014. Springer International Publishing.

CERVENKA, I.; AGUDELO, L. Z.; RUAS, J. L. Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health. **Science** (New York, N.Y.), v. 357, n. 6349, p. eaaf9794, 2017.

CHAKRABORTY, A. et al. Characterization of Escherichia coli Phylogenetic Groups Associated with Extraintestinal Infections in South Indian Population. **Annals of Medical and Health Sciences Research**, v. 5, n. 4, p. 241–246, 21 jul. 2015.

CINELLI, M. A. et al. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. **Medicinal Research Reviews**, v. 40, n. 1, p. 158–189, 13 jun. 2019.

CLOEZ-TAYARANI, I. Differential effect of serotonin on cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells: involvement of 5-hydroxytryptamine_{2A} receptors. **International Immunology**, v. 15, n. 2, p. 233–240, 1 fev. 2003

DAVID, D.j.; GARDIER, A.m.. Les bases de pharmacologie fondamentale du système sérotoninergique : application à la réponse antidépressive. : application à la réponse antidépressive. **L'encéphale**, [s.l.], v. 42, n. 3, p. 255-263, jun. 2016. Elsevier BV.

DE LAS CASAS-ENGEL, M.; CORBÍ, A. L. Serotonin Modulation of Macrophage Polarization: Inflammation and Beyond. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, p. 89–115, 2014.

DOMÍNGUEZ-SOTO, Á. et al. Serotonin drives the acquisition of a profibrotic and anti-inflammatory gene profile through the 5-HT7R-PKA signaling axis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 14761, 7 nov. 2017.

DUERSCHMIED, D. Role of platelet serotonin in innate immune cell recruitment. **Frontiers in Bioscience**, v. 24, n. 3, p. 514–526, 2019.

DÜRK, T. et al. 5-Hydroxytryptamine modulates cytokine and chemokine production in LPS-primed human monocytes via stimulation of different 5-HTR subtypes. **International Immunology**, v. 17, n. 5, p. 599–606, 31 mar. 2005.

EDLMANN, E. et al. Pathophysiology of chronic subdural haematoma: inflammation, angiogenesis and implications for pharmacotherapy. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, n. 1, 30 maio 2017.

EL-HAJ, L.; BESTLE, M. H. [Nitric oxide and sepsis]. **Ugeskrift for Laeger**, v. 179, n. 44, 30 out. 2017.

EL-MERAHBI, R. et al. The roles of peripheral serotonin in metabolic homeostasis. **FEBS Letters**, v. 589, n. 15, p. 1728–1734, 9 jun. 2015.

EPLER BARBERCHECK, C. R.; BULLITT, E.; ANDERSSON, M. Bacterial Adhesion Pili. **Subcellular Biochemistry**, p. 1–18, 2018.

FIELDS, J. K.; GÜNTHER, S.; SUNDBERG, E. J. Structural Basis of IL-1 Family Cytokine Signaling. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 20 jun. 2019.

FIRINU, D. et al. SAPHO Syndrome: Current Developments and Approaches to Clinical Treatment. **Current rheumatology reports**, v. 18, n. 6, p. 35, 2016.

FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, n. 4, p. 369–378, jul. 2017.

GARCÍA-ORTIZ, A.; SERRADOR, J. M. Nitric Oxide Signaling in T Cell-Mediated Immunity. **Trends in Molecular Medicine**, v. 24, n. 4, p. 412–427, 1 abr. 2018.

GHIA, J. et al. Serotonin Has a Key Role in Pathogenesis of Experimental Colitis. **Gastroenterology**, v. 137, n. 5, p. 1649–1660, nov. 2009.

GIORNO, T. B. S. et al. Characterization of β N-Octadecanoyl-5-hydroxytryptamide Anti-Inflammatory Effect. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3709, 18 jun. 2021.

GUIRAL, Elisabet et al. Prevalence of Escherichia coli among samples collected from the genital tract in pregnant and nonpregnant women: relationship with virulence. : relationship with virulence. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 314, n. 2, p. 170-173, 6 dez. 2010. Oxford University Press (OUP).

HAGEL, Stefan et al. Staphylococcus-aureus-Blutstrominfektion – eine interdisziplinäre Herausforderung. Ains - Anästhesiologie · Intensivmedizin · Notfallmedizin **Schmerztherapie**, [s.l.], v. 54, n. 03, p. 206-216, mar. 2019. Georg Thieme Verlag

HERR, Nadine; BODE, Christoph; DUERSCHMIED, Daniel. The Effects of Serotonin in Immune Cells. **Frontiers In Cardiovascular Medicine**, [s.l.], v. 4, 20 jul. 2017. Frontiers Media SA.

IDZKO, M. et al. The serotonergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 172, n. 10, p. 6011–6019, 15 maio 2004.

JANG, J. *et al.* Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 123, n. 3, p. 570-581, 3 jul. 2017. Wiley.

JENKINS, T. et al. Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis. **Nutrients**, v. 8, n. 1, p. 56, 20 jan. 2016.

JEON, H. L. et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Actions of N-Arachidonoyl Serotonin in RAW264.7 Cells. **Pharmacology**, v. 97, n. 3-4, p. 195–206, 2016.

JEON, H. L. et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Actions of N-Arachidonoyl Serotonin in RAW264.7 Cells. **Pharmacology**, v. 97, n. 3-4, p. 195–206, 2016.

JORGE, T.C.A.; CASTRO, S.L. Doença de chagas: manual para experimentação animal [online]. **Editora FIOCRUZ**, p 368, 2000.

KARMAKAR, S.; LAL, G. Role of serotonin receptor signaling in cancer cells and anti-tumor immunity. **Theranostics**, v. 11, n. 11, p. 5296–5312, 2021.

KIM, H. S et al. Lowering the concentration affects the migration and viability of intracerebroventricular-delivered human mesenchymal stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 493, n. 1, p. 751–757, 4 nov. 2017.

KUBERA, M. et al. Effects of serotonin and serotonergic agonists and antagonists on the production of tumor necrosis factor α and interleukin-6. **Psychiatry Research**, v. 134, n. 3, p. 251–258, abr. 2005.

KUBERA, M. et al. Effects of serotonin and serotonergic agonists and antagonists on the production of tumor necrosis factor α and interleukin-6. **Psychiatry Research**, v. 134, n. 3, p. 251–258, abr. 2005.

KWIECINSKI, J. M.; HORSWILL, A. R. Staphylococcus aureus bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 53, p. 51–60, fev. 2020.

LEE, A. S. et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Nature reviews. Disease primers**, v. 4, n. 18033, p. 18033, 2018.

LIU, T. et al. Signal Transduction and Targeted Therapy. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 2, n. 17023, 2017.

LOBANOVSKA, M.; PILLA, G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? **The Yale journal of biology and medicine**, v. 90, n. 1, p. 135–145, 29 mar. 2017.

LU, Mingfang; VARLEY, Alan W.; MUNFORD, Robert S.. Persistently Active Microbial Molecules Prolong Innate Immune Tolerance *in vivo*. **Plos Pathogens**, [s.l.], v. 9, n. 5, p.0-0, 9 maio 2013.

LUGRIN, J. et al. The role of oxidative stress during inflammatory processes. **Biological Chemistry**, v. 395, n. 2, p. 203–230, 1 fev. 2014.

MAFFEI, M. E. 5-Hydroxytryptophan (5-HTP): Natural Occurrence, Analysis, Biosynthesis, Biotechnology, Physiology and Toxicology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 181, 26 dez. 2020.

MAMMADOVA-BACH, E. et al. Autocrine and paracrine regulatory functions of platelet serotonin. **Platelets**, v. 29, n. 6, p. 541–548, 4 jun. 2018.

MARSHALL, J. S. et al. An introduction to immunology and immunopathology. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 14, n. S2, set. 2018.

MARTIN, A. M. et al. The Diverse Metabolic Roles of Peripheral Serotonin. **Endocrinology**, v. 158, n. 5, p. 1049–1063, 1 mar. 2017.

MERCADO, Charles P; KILIC, Fusun. Molecular Mechanisms of SERT in Platelets: Regulation of Plasma Serotonin Levels. **Molecular Interventions**, Arkansas, v. 10, n. 4, p. 231-241, ago. 2010.

MIKULSKI, Z. et al. Serotonin activates murine alveolar macrophages through 5-HT_{2c} receptors. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 299, n. 2, p. L272–L280, ago. 2010.

MITTAL, Rahul et al. Neurotransmitters: the critical modulators regulating gut-brain axis. : The Critical Modulators Regulating Gut-Brain Axis. **Journal Of Cellular Physiology**, [s.l.], v. 232, n. 9, p. 2359-2372, 10 abr. 2017. Wiley.

MONDANELLI, G.; VOLPI, C. The double life of serotonin metabolites: in the mood for joining neuronal and immune systems. **Current Opinion in Immunology**, v. 70, p. 1–6, jun. 2021.

MOTA, C. M. D. et al. Central serotonin attenuates LPS-induced systemic inflammation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 66, p. 372–381, nov. 2017.

MOTA, C. M. D. et al. Central serotonin prevents hypotension and hypothermia and reduces plasma and spleen cytokine levels during systemic inflammation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 80, p. 255–265, ago. 2019.

NAU, F. et al. Serotonin 5-HT_{2A} Receptor Activation Blocks TNF- α Mediated Inflammation *in vivo*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e75426, 2 out. 2013.

NESTA, Barbara; PIZZA, Mariagrazia. Vaccines Against Escherichia coli. **Current Topics In Microbiology And Immunology**, [s.l.], p. 213-242, 2018. Springer International Publishing.

NORIEGA, Eduardo R; SEAS, Carlos. The changing pattern of methicillin-resistant staphylococcus aureus clones in Latin America: implications for clinical practice in the region. **Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, v. 14, p.87-96, dez. 2010.FapUNIFESP (SciELO).

OLIVEIRA, Thiago Henrique Caldeira de. **Avaliação da participação de biomarcadores na fisiopatologia da sepse induzida por Staphylococcus aureus**, 2013, 88f. Dissertação (Mestrado)- Curso de Mestrado em Ciências Fisiológicas, Departamento de Instituto Multidisciplinar em Saúde- IMS, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2013a.

PALMIERI, E. M. et al. Nitric Oxide in Macrophage Immunometabolism: Hiding in Plain Sight. **Metabolites**, v. 10, n. 11, p. E429, 26 out. 2020

PATERSON, G. K.; HARRISON, E. M.; HOLMES, M. A. The emergence of mecC methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 42–47, 1 jan. 2014.

PEDRO, Taís da Costa São; MORCILLO, André Moreno; BARACAT, Emílio Carlos Elias. Etiologia e fatores prognósticos da sepse em crianças e adolescentes admitidos em terapia intensiva. **Rev Bras Ter Intensiva**, Campinas, v. 3, n. 1, p.240-246, jul. 2015.

PINTO MILEO, Grazielle et al. Incidência de sepse em uma UTI neonatal no ano de 2011 no interior de São Paulo. **Revista Eletrônica de Enfermagem do Vale do Paraíba**, v. 1, n. 05, ago. 2017.

POIREL, L. et al. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. **Microbiology spectrum**, v. 6, n. 4, 2018.

POLAND, Mieke et al. Docosaehexaenoyl serotonin, an endogenously formed n-3 fatty acid-serotonin conjugate has anti-inflammatory properties by attenuating IL-23–IL-17 signaling in macrophages. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, [s.l.], v. 1861, n. 12, p. 2020-2028, dez. 2016. Elsevier

PRIYADARSHINI, Sushri; PRADHAN, Biswaranjan; AICH, Palok. Role of murine macrophage in temporal regulation of cortisol- and serotonin-induced adipogenesis in pre-adipocytes when grown together. **Biology Open**, [s.l.], v. 7, n. 8, 6 ago. 2018. The Company of Biologists.

QUINTERO-VILLEGAS, A.; VALDÉS-FERRER, S. I. Role of 5-HT7 receptors in the immune system in health and disease. **Molecular Medicine**, v. 26, 31 dez. 2019.

ROSANO, G. L.; MORALES, E. S.; CECCARELLI, E. A. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli* : A 5-year update. **Protein Science**, v. 28, n. 8, p. 1412–1422, jul. 2019

ROUMIER, A.; BÉCHADE, C.; MAROTEAUX, L. Serotonin and the Immune System. **Serotonin**, p. 181–196, 2019.

RUFFELL, D. et al. A CREB-C/EBP cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 41, p. 17475–17480, 24 set. 2009.

SANTOS JUNIOR, Manoel Neres; MARQUES, Lucas Miranda; TIMENETSKY, Jorge. Caracterização da Reposta Imunológica de *Ureaplasma diversum* em Cultura de Macrófagos. 2022.

SCHOENICHEN, Claudia; BODE, Christoph; DUERSCHMIED, Daniel. Role of platelet serotonin in innate immune cell recruitment. **Frontiers In Bioscience**, Freiburg, jan. 2019.

SCHUFF-WERNER, P. et al. Serotonin acts as a radical scavenger and is oxidized to a dimer during the respiratory burst of human mononuclear and polymorphonuclear phagocytes. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 25, n. 7, p. 477–484, 1 jul. 1995.

SHAJIB, M. S.; KHAN, W. I. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. **Acta Physiologica**, [s.l.], v. 213, n. 3, p. 561-574, 11 dez. 2014. Wiley.

SHARMA, G. et al. Escherichia colibiofilm: development and therapeutic strategies. : development and therapeutic strategies. **Journal Of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 121, n. 2, p. 309-319, 11 mar. 2016. Wiley.

SIERRA-FILARDI, E. et al. CCL2 Shapes Macrophage Polarization by GM-CSF and M-CSF: Identification of CCL2/CCR2-Dependent Gene Expression Profile. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 8, p. 3858–3867, 17 mar. 2014.

SINGH, N. et al. Inflammation and Cancer. **Annals of African Medicine**, v. 18, n. 3, p. 121–126, 2019.

STEWART, A.; BEART, P. Inflammation: maladies, models, mechanisms and molecules. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 4, p. 631–634, fev. 2016.

STRASSER, Barbara; GOSTNER, Johanna M.; FUCHS, Dietmar. Mood, food, and cognition: role of tryptophan and serotonin. **Current Opinion**, Austria, v. 19, n. 1, p. 55-61, jan./2016.

SZABO, A. et al. Immunomodulatory capacity of the serotonin receptor 5-HT2B in a subset of human dendritic cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 29 jan. 2018.

TAMMA, R. et al. Inflammatory Cells in Diffuse Large B Cell Lymphoma. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 8, p. 2418, 28 jul. 2020.

TAYLOR, T. A.; UNAKAL, C. G. Staphylococcus Aureus. 2018

TERLIZZI, Maria E. et al. UroPathogenic Escherichia coli (UPEC) Infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. : Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 8, 15 ago. 2017. Frontiers Media SA.

TONG, Steven Y. C. et al. Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p.603-661, 27 maio 2015. American Society for Microbiology.

TURNER, N. A. et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an overview of basic and clinical research. **Nature reviews. Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 203–218, 1 abr. 2019.

VAĽÍČEK, Ondřej; LOJEK, Antonín; ČÍŽ, Milan. Serotonin and its metabolites reduce oxidative stress in murine RAW264.7 macrophages and prevent inflammation. **Journal Of Physiology And Biochemistry**, [s.l.], v. 76, n. 1, p. 49-60, 3 jan. 2020. Springer Science and Business Media LLC.

VILA, J. et al. Escherichia coli: an old friend with new tidings. : an old friend with new tidings. **Fems Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 40, n. 4, p. 437-463, 8 mar. 2016. Oxford University Press (OUP).

VLEUGELS, Rut; VERLINDEN, Heleen; BROECK, Jozef Vanden. Serotonin, serotonin receptors and their actions in insects. **Neurotransmitter**, Bélgica, v. 2, n. 2, p. 1-14, jan./2015.

VOLLMAR, P. et al. The antidepressant venlafaxine ameliorates murine experimental autoimmune encephalomyelitis by suppression of pro-inflammatory cytokines. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 12, n. 04, p. 525, 16 out. 2008

WAN, M. et al. Serotonin: A Potent Immune Cell Modulator in Autoimmune Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 11 fev. 2020.

WANG, H. et al. Selenium ameliorates Staphylococcus aureus-induced inflammation in bovine mammary epithelial cells by inhibiting activation of TLR2, NF- κ B and MAPK signaling pathways. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, 20 jun. 2018

WEISS, Scott L. et al. Global Epidemiology of Pediatric Severe Sepsis: The Sepsis Prevalence, Outcomes, and Therapies Study. **American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine**, v. 191, n. 10, p.1147-1157, 15 maio 2015. American Thoracic Society.

WILCOX, B. D.; DUMIN, J. A.; JEFFREY, J. J. Serotonin regulation of interleukin-1 messenger RNA in rat uterine smooth muscle cells. Relationship to the production of interstitial collagenase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 47, p. 29658–29664, 25 nov. 1994.

WU, H. et al. Beyond a neurotransmitter: The role of serotonin in inflammation and immunity. **Pharmacological Research**, v. 140, p. 100–114, fev. 2019.

XIE, C. et al. The açai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF- α and IL-6 production through inhibiting NF- κ B activation and MAPK pathway. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 9, p. 1184–1191, set. 2012.

YANG, T. et al. The 5-HT and PLC Signaling Pathways Regulate the Secretion of IL-1 β , TNF- α and BDNF from NG2 Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2022, p. 1–10, 13 maio 2022.

YU, B. et al. Serotonin 5-Hydroxytryptamine_{2A} Receptor Activation Suppresses Tumor Necrosis Factor- α -Induced Inflammation with Extraordinary Potency. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 327, n. 2, p. 316–323, 15 ago. 2008.

YUNNA, C. et al. Macrophage M1/M2 polarization. **European Journal of Pharmacology**, v. 877, p. 173090, jun. 2020.

ZHANG, Jingyao et al. 5-HT Drives Mortality in Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture in Mice. **Mediators Of Inflammation**, [s.l.], v. 2017, p. 1-12, 2017. Hindawi Limited.

ZHANG, Jingyao *et al.* Role of Serotonin in MODS. **Shock**, [s.l.], v. 43, n. 3, p. 276-284, mar. 2015. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

ZHAO, Y. et al. Comparison of the characteristics of macrophages derived from murine spleen, peritoneal cavity, and bone marrow. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 18, n. 12, p. 1055–1063, dez. 2017.

ZOLLBRECHT, C. et al. Nitrite-mediated reduction of macrophage NADPH oxidase activity is dependent on xanthine oxidoreductase-derived nitric oxide but independent of S-nitrosation. **Redox Biology**, v. 10, p. 119–127, dez. 2016.

ANEXOS

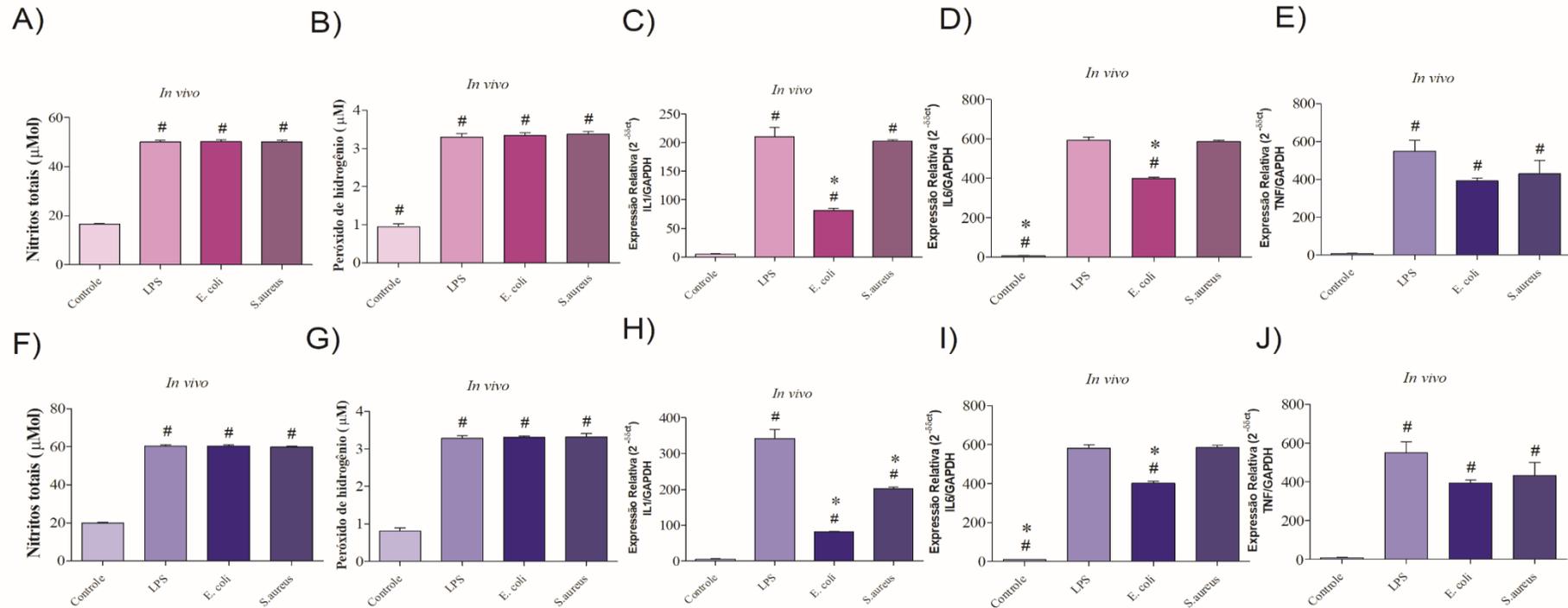


Figura S1: Análises de Óxido Nítrico (A e F), Peróxido de Hidrogênio (B e G) Expressão Gênica das citocinas IL-1 (C e H) ,IL-6 (D e I) e TNF- α (E e J) referente a cultura de macrófagos esplênicos (A, B, C, D, E) e peritoneais (F, G, H, I, J) de murinos (2×10^{-5} células) no grupo macrófagos de animais tratados *in vivo*. A primeira coluna do gráfico mostra que o controle (sem infecção) apresentou uma expressão baixíssima, comparado aos grupos infectados com as bactérias *E. coli* e *S. aureus* e o controle positivo LPS que tiveram em muitos momentos picos de expressão. Esse resultado evidencia a efetiva infecção em todos os grupos do experimento. Dados expressos como média \pm EPM. *Diferença estatística em relação ao grupo LPS ($p < 0,005$); # Diferença estatística em relação ao controle negativo ($p < 0,005$).

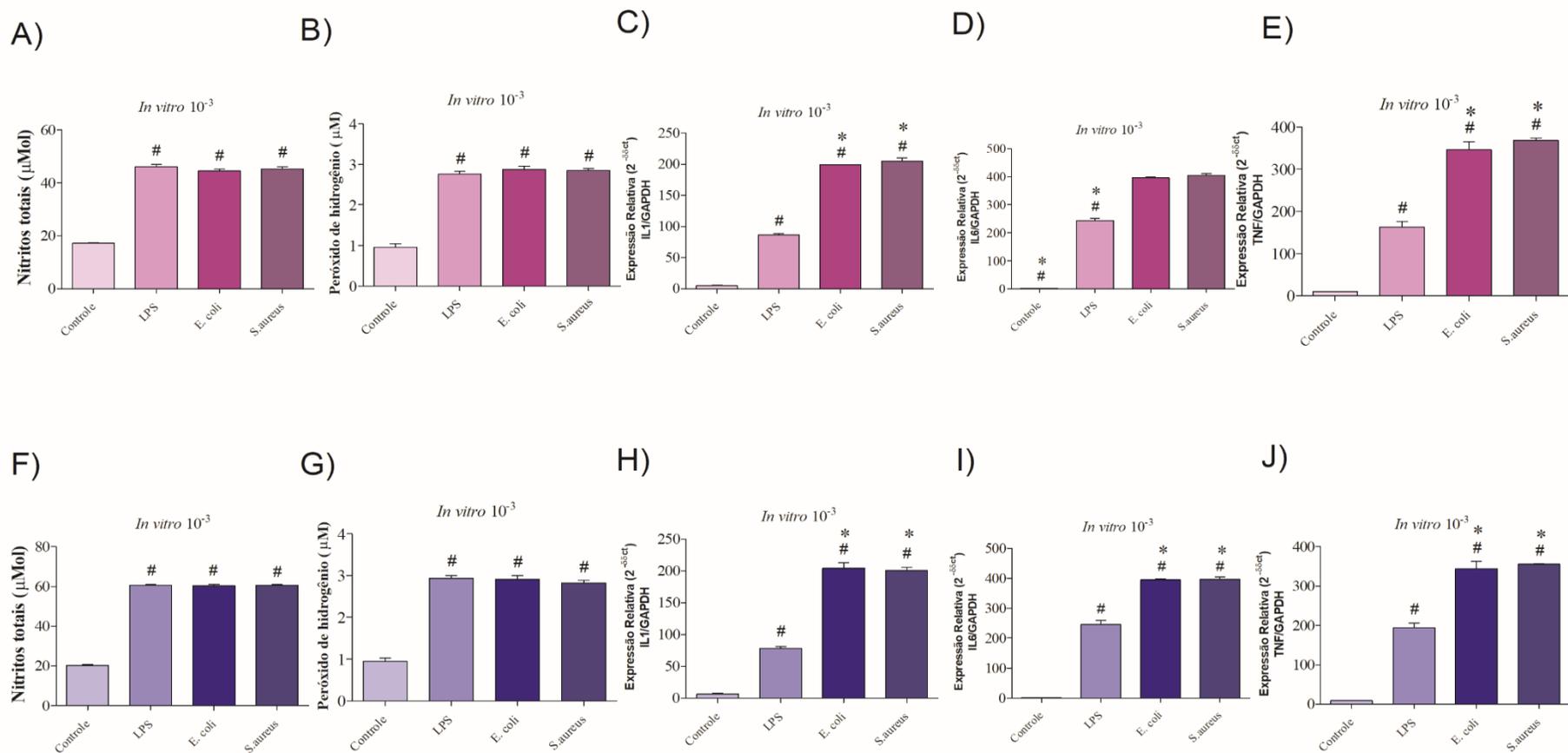


Figura S2: Análises de Óxido Nítrico (A e F), Peróxido de Hidrogênio (B e G) Expressão Gênica das citocinas IL-1 (C e H) ,IL-6 (D e I) e TNF- α (E e J) referente a cultura de macrófagos esplênicos (A, B, C, D, E) e peritoneais (F, G, H, I, J) de murinos (2×10^{-5} células) no grupo de macrófagos de animais Sham tratados *in vitro* com serotonina na dosagem 10^{-3} . A primeira coluna do gráfico mostra que o controle (sem infecção) não apresenta respostas significativas, quando comparado aos grupos infectados com as bactérias *E. coli* e *S. aureus* e o controle positivo LPS. Esse resultado evidencia a efetiva infecção em todos os grupos do experimento. Dados expressos como média \pm EPM. *Diferença estatística em relação ao grupo LPS ($p < 0,005$); # Diferença estatística em relação ao controle negativo ($p < 0,005$).

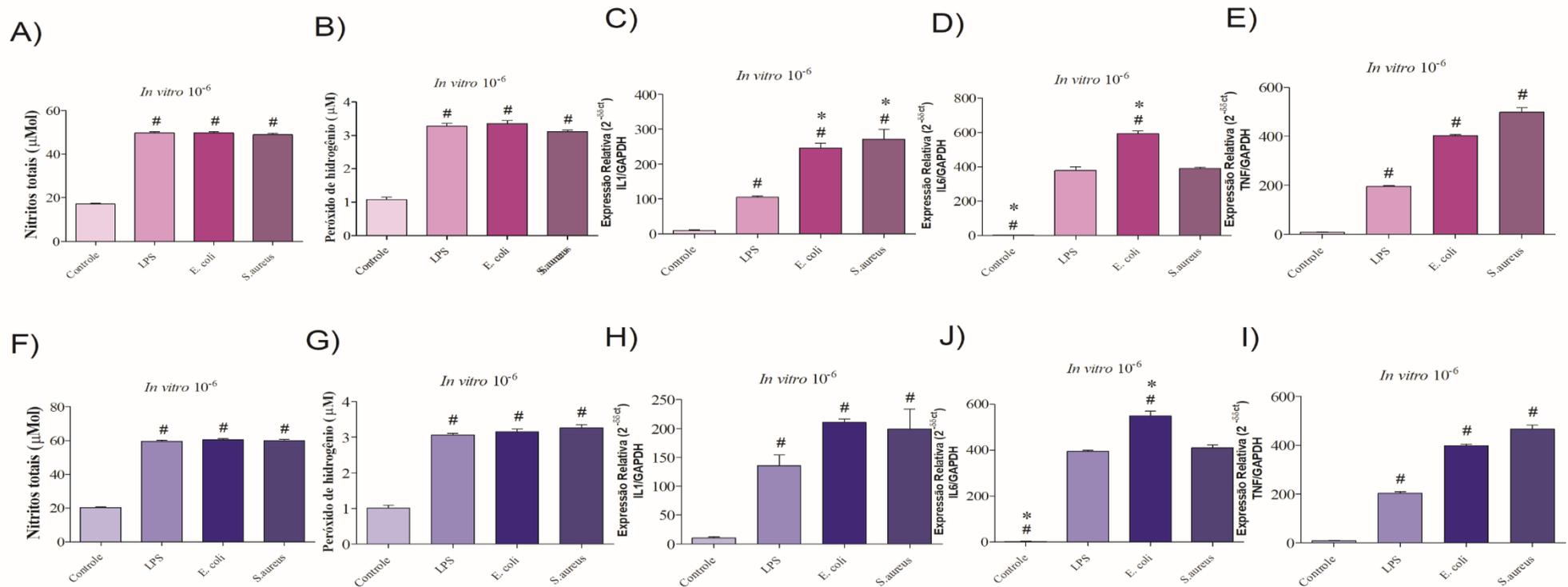
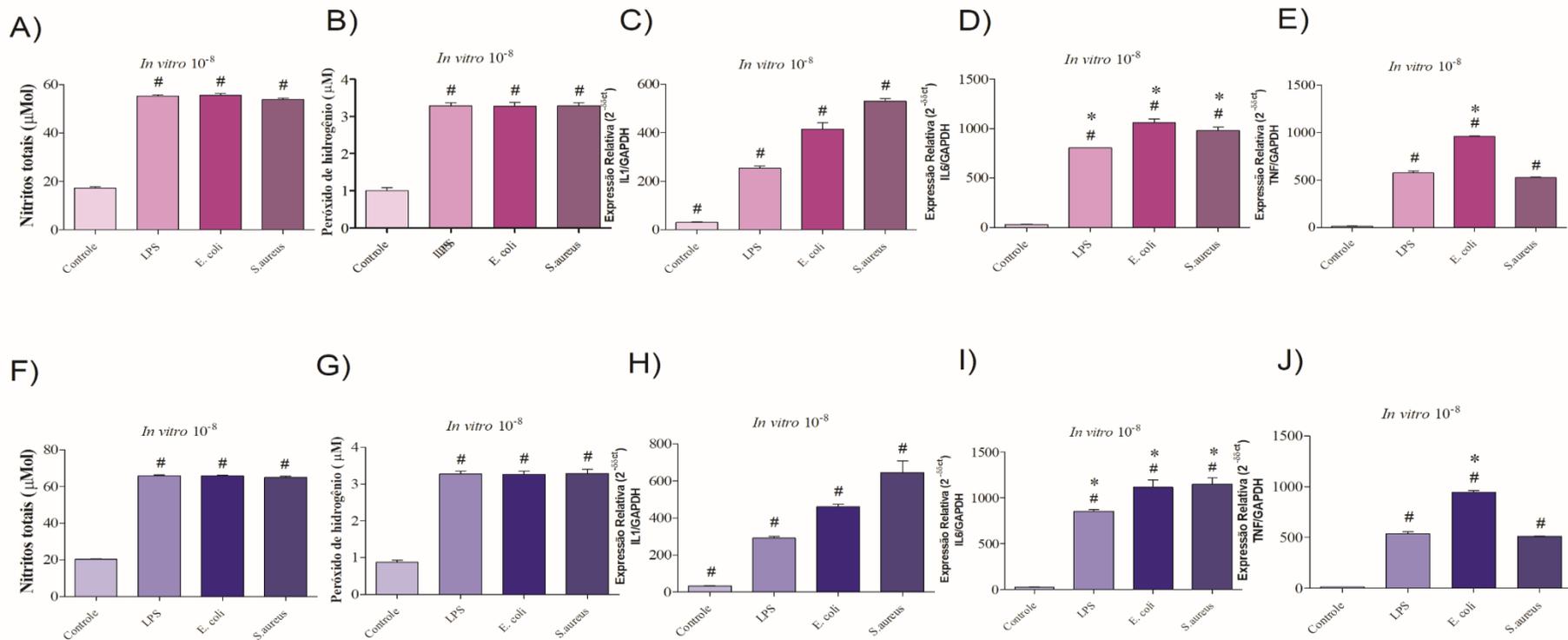


Figura S3: Análises de Óxido Nítrico (A e F), Peroxido de Hidrogênio (B e G) Expressão Gênica das citocinas IL-1 (C e H) ,IL-6 (D e I) e TNF-α (E e J) referente a cultura de macrófagos esplênicos (A, B, C, D, E) e peritoneais (F, G, H, I, J) de murinos (2×10^{-5} células) no grupo de macrófagos de animais Sham tratados *in vitro* com serotonina na dosagem 10^{-6} . A primeira coluna do gráfico mostra que o controle (sem infecção) é o grupo que apresenta a menor resposta, quando comparado aos grupos infectados. Esse resultado evidencia a efetiva infecção em todos os grupos do experimento. Dados expressos como média±EPM. *Diferença estatística em relação ao grupo LPS ($p < 0,005$); # Diferença estatística em relação ao controle negativo ($p < 0,005$).



ANEXO - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS

Página 1 de 1



Universidade Federal da Bahia
Instituto Multidisciplinar em Saúde - Campus Anísio Teixeira
COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS
(CEUA - IMS/CAT - UFBA)



PROJETO DE PESQUISA - Protocolo 090/2020 - Apreciação em 22/12/2020 – Aprovado sem restrições
Título: Avaliação do papel da 5-Hidroxitriptamina na resposta de macrófagos obtidos de camundongos inoculados com <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> .
Protocolo: 090/2020
Pesquisador: Lucas Miranda Marques
Instituição: Instituto Multidisciplinar em Saúde - Campus Anísio Teixeira – UFBA
CERTIFICADO
A Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA - IMS/CAT - UFBA) certifica que o projeto de pesquisa: "Avaliação do papel da 5-Hidroxitriptamina na resposta de macrófagos obtidos de camundongos inoculados com <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> ", Protocolo nº 090/2020, do pesquisador Lucas Miranda Marques, que foi submetido à avaliação desta Comissão, está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal e foi aprovado na 32ª Reunião Ordinária do dia 02 de dezembro de 2020.
CERTIFICATE
The Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA - IMS / CAT - UFBA) certifies that the research project "Evaluation of the role of 5-Hydroxytryptamine in the response of macrophages obtained from mice inoculated with <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Escherichia coli</i> ", Protocol nº 090/2020, by researcher Lucas Miranda Marques, who was submitted to the evaluation of this Commission, is in accordance with the ethical principles of animal experimentation and was approved at the 32th Ordinary Meeting on December 02, 2020.

Vitória da Conquista, 22 de dezembro de 2020.


Bruno Lopes Bastos
Coordenador CEUA - IMS/CAT – UFBA