

JOÃO RICARDO SÁ LEITÃO CAMAROTI

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO *IN VITRO* DE SUBSTÂNCIAS
SEROTONINÉRGICAS SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO
NÍTRICO E A VIABILIDADE CELULAR EM MACRÓFAGOS DA
LINHAGEM RAW 264.7

RECIFE

2013

João Ricardo Sá Leitão Camaroti

Efeito da administração *in vitro* de substâncias serotoninérgicas sobre
a produção de óxido nítrico e a viabilidade celular em macrófagos da
linhagem RAW 264.7

Recife

2013

João Ricardo Sá Leitão Camaroti

Efeito da administração *in vitro* de substâncias serotoninérgicas sobre
a produção de óxido nítrico e a viabilidade celular em macrófagos da
linhagem RAW 264.7

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Patologia do Centro
de Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Pernambuco para obtenção
do título de Mestre em Patologia.

Linha de Pesquisa: Patologia da
nutrição e seus distúrbios.

Projeto de Pesquisa: Desnutrição
perinatal e seu desfecho sobre a
imunidade de ratos ao longo da vida:
um estudo da programação da relação
macrófago-serotonina

Orientadora: Profa. Dr^a. Wylla Tatiana Ferreira e Silva.

Recife
2013

Catálogo na Publicação
Bibliotecária: Gláucia Cândida da Silva, CRB4-1662

- C172e Camaroti, João Ricardo Sá Leitão.
Efeito da administração *in vitro* de substâncias serotoninérgicas sobre a produção de óxido nítrico e a viabilidade celular em macrófagos de linhagem RAW 264.7 / João Ricardo Sá Leitão Camaroti. – Recife: O autor, 2013.
57 f. : il. ; 30 cm.
- Orientadora: Wylla Tatiana Ferreira e Silva.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2013.
Inclui bibliografia e anexos.
1. Serotonina. 2. Óxido Nítrico. 3. Sobrevivência Celular. I. Silva, Wylla Tatiana Ferreira e (Orientadora). II. Título.
- 616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2013-092)

João Ricardo Sá Leitão Camaroti

Efeito da administração *in vitro* de substâncias serotoninérgicas sobre a
produção de óxido nítrico e a viabilidade celular em macrófagos da linhagem
RAW 264.7

Dissertação aprovada em 14 de Março de 2013.

Prof^a. Dr^a. Manuela Figueroa Lyra de Freitas

Prof^a. Dr^a. Cybelle Rolim de Lima

Prof^a. Dr^a. Luciana Gonçalves de Orange

Recife
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

R E I T O R

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE- REITOR

Prof. Sílvio Romero de Barro Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof^a. Catarina de Oliveira Neves

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Mário Ribeiro de Melo Júnior

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof^a Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

R E C I F E

2013

A Seu **Ricardo** e Dona **Valéria**, painho e mainha

A **Ana Clara** e **Ana Victória**, queridas irmãs

A **Maria Fernanda** e **Raul**, meus sobrinhos e orgulho

A **Thulio** e **Érica**, inesquecíveis amigos e companheiros

A **Wylla**, admirável mestra

AGRADECIMENTOS

Antes ganhar uns quilos e perder o juízo, os cabelos e noites de sono do que não ter tido a oportunidade ímpar de passar por essa experiência que me fez amadurecer, mais do que qualquer coisa, como pessoa.

*Meus mais sinceros agradecimentos a **todas as pessoas** que me ajudaram a ser um profissional mais qualificado, uma pessoa menos ansiosa, que confia mais nas pessoas e em si mesmo, enfim, por ser uma pessoa mil vezes, ou mais, melhor do que era há dois anos.*

*Á minha orientadora, **Wylla Tatiana Ferreira e Silva**, por sempre me acalmar e nunca me abandonar.*

*Aos meus amigos, **Thulio, Fernando, Thomás, Karla, Yoga, Miguel e Isabella** por me proporcionarem momentos de diversão e despreocupação, quando necessário.*

*Á **Érica**, por estar me acompanhando em todos os momentos desde a faculdade até agora, estarei esperando a sua vez!*

*Á **Queliane e Louise**, por estarem sempre tão disponíveis a ajudar na construção desta caminhada.*

*Á minha família maravilhosa, **Painho, mainha, Neide, irmãs e sobrinhos**, pela sensação de proteção, amor incondicional e, principalmente, por serem os principais responsáveis por eu estar completando essa etapa, sem vocês eu não teria tido forças!*

*Ás **forças divinas**, que me tanto me protegem desde sempre.*

**“(...) Agora eu era o rei
Era o bedel e era também juiz
E pela minha lei
A gente era obrigado a ser feliz (...)”¹**

¹ Música: João e Maria de Chico Buarque.

RESUMO

No intuito de analisar o efeito da administração *in vitro* de substâncias serotoninérgicas (SS) sobre a produção de óxido nítrico (PNO) e a viabilidade celular em macrófagos, foi realizado um estudo experimental com cultura de células da linhagem RAW 264.7, adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio de cultura em placas de 24 poços a 37°C com 5% de CO₂ em ar umidificado. As células foram tratadas com lipopolissacarídeo (LPS de *E. coli*, sorotipo 055B5) na presença de várias concentrações de SS. As SS incluíram: inibidores seletivos da recaptação da serotonina-ISRS (Fluoxetina-FLX, paroxetina-PRX e escitalopran-ESC); facilitador seletivo da recaptação de serotonina (Tianeptina-TNP); aminoácido precursor da serotonina (Triptofano-TRP); agonista do receptor 5-HT_{1B} (CP-93,129). Após 24 h, o sobrenadante de cultura foi removido para mensuração da concentração de nitrito, um metabólito estável do NO, pela reação de Griess. A seguir, as células foram incubadas por 2h com MTT, a fim de que aquelas viáveis o convertessem em formazam, cuja concentração foi quantificada espectrofotometricamente a 540 nm. As respostas das células estimuladas com LPS e tratadas com as SS foram sempre comparadas as das células não tratadas com SS. A coincubação das células com FLX e PRX a 10⁻⁴ M reduziu de maneira drástica a PNO (0% em ambos), acontecimento explicado pela citotoxicidade (98,2% para FLX e 99,2% para PRX). FLX aumentou a PNO a 10⁻⁶ (↑22,53%) e 10⁻⁷ M (↑21,71%). O mesmo foi observado para ESC apenas a 10⁻⁴ M (↑49,9%), apesar de ter havido redução na viabilidade celular nesta concentração (22,6%). PRX reduziu a PNO a 10⁻⁵ M (↓22,98%). Da mesma forma, CP diminuiu a PNO a 10⁻⁷ M (↓22,18%). A administração de TNP não interferiu na PNO. Um aumento na PNO foi observado nas células tratadas com TRF a 10⁻⁶ (↑40,03%) e 10⁻⁸ M (↑33,39%). Este resultado parece ter sido independente do aumento na viabilidade celular (observado a 10⁻⁷ M [↑10%]). A viabilidade das células tratadas com FLX e PRX entre 10⁻⁵ e 10⁻⁸ M variou de 81 a 92,5% (para FLX) e de 78,8 a 104,6% (para PRX). Este efeito foi inversamente proporcional à dose. Em conclusão, os resultados do presente trabalho indicam que ISRS interferem na PNO por macrófagos de maneira heterogênea, estimulando ou deprimindo dependendo da dose. A redução da PNO por macrófagos parece estar associada ao receptor 5-HT_{1B}. Triptofano apresenta atividade promotora da PNO em macrófagos, contudo não se sabe se por via relacionado ao metabolismo da serotonina.

Descritores: Serotonina. Macrófago. Óxido Nítrico. Viabilidade celular.

ABSTRACT

With the aim of analyze the effect of in vitro administration of serotogenic substances (SS) on the production of nitric oxide (PNO) and cell viability in macrophages, an experimental study was performed with the culture of the cell line RAW 264.7, purchased in the Bank of Cells of Rio de Janeiro. The cells were cultivated in culture medium in 24 well plates at 37°C with 5% CO₂ in humidified air. The cells were treated with lipopolysaccharide (LPS from *E. Coli* serotype 055B5) in the presence of various concentrations of SS. The SS included: selective serotonin re-uptake-SSRI (fluoxetine-FLX, paroxetine, and PRX-escitalopran ESC), facilitator selective serotonin re-uptake (tianeptine-TNP); amino acid precursor of serotonin (Tryptophan-TRP) and agonist of the 5-HT_{1B} receptor (CP-93, 129). After 24 hours, the culture supernatant was removed for measuring the concentration of nitrite, a stable metabolite of NO, by the Griess reaction. Then, the cells were incubated with MTT for 2 hours, so that the viable ones converted it into formazan, and its concentration was quantified spectrophotometrically at 540 nm. The responses of the cells stimulated with LPS and treated with SS were always compared to the cells not treated with SS. The cells co-incubation with FLX and PRX at 10⁻⁴ M drastically reduced the PNO (0% in both), event explained by cytotoxicity (98,2% for FLX and 99,2% for PRX). FLX increased PNO at 10⁻⁶ (↑22,53%) and 10⁻⁷ M (↑21,71%). The same was observed for ESC only at 10⁻⁴ M (↑49,9%), although there was a reduction in cell viability at this concentration (22,6%). PRX reduced the PNO at 10⁻⁵ M (↓22,98%). In the same way, CP decreased the PNO at 10⁻⁷ M (↓22,18%). The administration of TNP did not interfere in the PNO. An increase in PNO was observed in the cells treated with TRF at 10⁻⁶ (↑40,03%) and 10⁻⁸ M (↑33,39%). This result seems to be independent of the cellular viability increasing (observed at 10⁻⁷ M [↑10%]). The viability of cells treated with FLX and PRX between 10⁻⁵ and 10⁻⁸ M varied from 91 to 92,5% (for FLX) and from 78,8 to 104, 6% (for FLX). This effect was inversely proportional to the dose. In conclusion, the results of this work indicate that SSRIs interfere in PNO by macrophages heterogeneously, stimulating or depressing dependently of the dose. The reduction of PNO by macrophages seems to be associated to the 5-HT_{1B} receptor. Tryptophan shows promoting activity of PNO in macrophages, although, it is not known if it's by way related to the serotonin metabolism.

Keywords: Serotonin. Macrophage. Nitric oxide. Cell survival.

LISTA DE FIGURAS

Artigo Original:

Figura 1 (A,B,C,D): Produção de óxido nítrico e Viabilidade celular de macrófagos da linhagem RAW 264.7 sob influência de fluoxetina em diferentes concentrações e seus correspondentes percentuais. (página 48)

Figura 2 (A,B,C,D): Produção de óxido nítrico e Viabilidade celular de macrófagos da linhagem RAW 264.7 sob influência de escitalopram em diferentes concentrações e seus correspondentes percentuais. (página 49)

Figura 3 (A,B,C,D): Produção de óxido nítrico e Viabilidade celular de macrófagos da linhagem RAW 264.7 sob influência de paroxetina em diferentes concentrações e seus correspondentes percentuais. (página 50)

Figura 4 (A,B,C,D): Produção de óxido nítrico e Viabilidade celular de macrófagos da linhagem RAW 264.7 sob influência de tianeptina em diferentes concentrações e seus correspondentes percentuais. (página 51)

Figura 5 (A,B,C,D): Produção de óxido nítrico e Viabilidade celular de macrófagos da linhagem RAW 264.7 sob influência do agonista CP 93,129 em diferentes concentrações e seus correspondentes percentuais. (página 52)

Figura 6 (A,B,C,D): Produção de óxido nítrico e Viabilidade celular de macrófagos da linhagem RAW 264.7 sob influência de triptofano em diferentes concentrações e seus correspondentes percentuais. (página 53)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT: 5-hidroxitriptamina; Serotonina

TPH: Triptofano hidroxilase

TPD: Triptofano Descarboxilase

5-HTP: 5-hidroxitriptofano

NT: Neurotransmissor

NA: Noradrenalina

DA: Dopamina

SN: Sistema Nervoso

SNC: Sistema Nervoso Central

SS: Substâncias Serotoninérgicas

ISRS: Inibidor Seletivo da Recaptação da Serotonina

FLX: Cloridrato Fluoxetina

PRX: Cloridrato de Paroxetina

ESC: Oxalato de Escitalopram

SRT: Setralina

FLV: Fluvoxamina

TNP: Tianeptina

TRF: Triptofano

CP 93,129: Agonista do receptor serotoninérgico 5-HT_{1B}

SI: Sistema Imune

MØ: Macrofágo

LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido Nítrico Sintetase

cNOS: Oxido Nítrico Sintetase constitutiva

nNOS: Oxido Nítrico Sintetase cerebral

eNOS: Oxido Nítrico Sintetase endotelial

iNOS: Oxido nítrico Sintetase induzível

RI: Resposta Imune

PNO: Produção de Óxido Nítrico

Ca: Cálcio

SERT: Transportador da Serotonina

IFN γ : Interferon-Gamma

FNT α : Fator de necrose tumoral α

FAP: Fator Ativador Plaquetário

O₂⁻: Superóxido

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

IMAO: Inibidor da monoaminoxidase

ADT: Antidepressivo tricíclico

LENIB: Laboratório de Estudos em Nutrição e Instrumentação Biomédica

UTC: Universidade de Tecnologia de Compiègne

DMSO: Dimetilsulfóxido

SFB: Soro Fetal Bovino

MTT: 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- brometo de difeniltetrazólio

SDS: dodecil sulfato de sódio

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	13
1.1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA	13
1.2 HIPÓTESES	14
1.3 OBJETIVOS	15
1.3.1 <i>Objetivo geral</i>	15
1.3.2 <i>Objetivos específicos</i>	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 SEROTONINA	16
2.2 SUBSTÂNCIAS SEROTONINÉRGICAS	18
2.3 MACRÓFAGO	19
2.4 USO DE LINHAGENS CELULARES EM MODELOS EXPERIMENTAIS AVALIANDO A FUNÇÃO DO MACRÓFAGO	21
3 MÉTODOS	23
3.1 ÁREA	23
3.2 PERÍODO DE REFERÊNCIA	23
3.3 DESENHO DO ESTUDO	24
3.4 MÉTODO DE COLETA DE DADOS	24
3.4.1 <i>Cultivo celular de macrófagos</i>	24
3.4.2 <i>Contagem de macrófagos</i>	25
3.4.3 <i>Cultivo das células in vitro</i>	25
3.4.4 <i>Incubação das células cultivadas com drogas serotoninérgicas e avaliação de seu efeito sobre a produção de óxido nítrico</i>	25
3.4.5 <i>Mensuração do óxido nítrico</i>	26
3.4.6 <i>Análise da viabilidade celular</i>	26
3.5 MÉTODO DE ANÁLISE	27
4 RESULTADOS- ARTIGO ORIGINAL	28
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO A- Submissão do artigo original para a revista Neuroimmunomodulation	57

1 APRESENTAÇÃO

1.1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

A Serotonina (5-HT) é um dos neurotransmissores do sistema nervoso central mais extensamente estudado. Está presente numa variedade de regiões do cérebro, mas principalmente nos núcleos da rafe do tronco cerebral, que possui corpos celulares de neurônios serotoninérgicos, que sintetizam, armazenam e liberam a 5-HT como neurotransmissor (KATZUNG; JULIUS, 2002). Está presente, também, em uma variedade de tecidos periféricos, incluindo componentes do sistema imunológico (MOSSNER; LESCH, 1998).

O sistema imune (SI) é uma organização de células e moléculas com papéis especializados na defesa do organismo contra infecções (DELVES; ROITT, 2000), na remoção de células mortas e detritos celulares, bem como, no estabelecimento da memória imunológica (SCHULENBURG; KURZ; EWBANK, 2004).

As células básicas do sistema imune são: Macrófagos (MØ), linfócitos, células NK (*Natural Killer*), células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos, plaquetas e células endoteliais (BRASILEIRO-FILHO, 2006).

O Sistema imune e o sistema nervoso (SN) por muito tempo foram considerados sistemas de regulação autônoma. No entanto, esses dois sistemas interagem mutuamente (HOMO-DELARCHE; DARDENNE, 1993). A 5-HT parece ter uma importante função na integração entre os SN e SI devido a evidências que comprovam seu papel imunomodulador em componentes do SI.

Verifica-se que a 5-HT pode mediar interações entre o SN e SI através de processos de sinalização celular coordenados por receptores serotoninérgicos em componentes do SI por quatro vias diferentes: Ativação de células T e células NK; Resposta de hipersensibilidade tardia; Produção de fatores quimiotáticos e Imunidade natural desempenhada pelo MØ (MOSSNER; LESCH, 1998)

Macrófagos são células imunes multifacetadas provenientes da linhagem mielóide, sendo a forma tecidual do monócito. Desempenham papel fundamental na integração das respostas imune inata (RI) e adaptativa (ROSS; AUGER, 2000; MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009).

Possuem diversas funções, entre elas: regulação da RI, da reação inflamatória, defesa contra agentes infectantes em geral, secreção de enzimas, substâncias reguladoras da atividade celular de linfócitos (KLIMP, et al.,2002; LORENZI, 2006) além de atuarem no reparo e renovação dos tecidos e imunidade contra tumores (ZAGO, FALCÃO, PASCHINI, 2001; KLIMP, et al.,2002).

O óxido nítrico é uma espécie reativa do nitrogênio e pode ser gerado pelo MØ em resposta a diferentes estímulos imunológicos tais como: IFN γ , TFN α e LPS, os quais estimulam a geração de uma grande quantidade de NO. O NO produzido por MØ desenvolve um papel importante em processos patológicos, como a defesa antimicrobiana, inflamação e angiogênese (KRISHNATRY; BRAZEAU; FUNG, 2009). Uma importante maneira de avaliar a função do macrófago é analisar a produção de óxido nítrico (NO).

O entendimento mais profundo da interação entre o MØ e a 5-HT, através de um modelo experimental utilizando manipulações farmacológicas de substâncias serotoninérgicas (SS) em linhagens celulares de MØ, trará um conhecimento mais amplo acerca desta relação.

1.2 HIPÓTESES

- Acredita-se que, sob influência dos inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), ocorra uma diminuição da produção de óxido nítrico (PNO) pelo MØ ativado com relação dose-efeito;
- Acredita-se que, sob influência da tianeptina (TNP), um facilitador da recaptação da 5-HT, ocorra um aumento da PNO pelo MØ ativado com relação dose-efeito;
- Acredita-se que, sob influência do aminoácido triptofano (TRF), o aminoácido precursor da 5-HT, ocorra uma diminuição da PNO pelo MØ ativado com relação dose-efeito.
- Acredita-se que, sob influência do agonista do receptor serotoninérgico 5-HT_{1B} (CP 93,129), ocorra um aumento da PNO pelo MØ ativado com relação dose-efeito.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 *Objetivo geral*

Avaliar o efeito da administração *in vitro* de substâncias serotoninérgicas sobre a produção de óxido nítrico e a viabilidade celular em macrófagos da linhagem RAW 264.

1.3.2 *Objetivos específicos*

- Avaliar o efeito de Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina: Cloridrato de Fluoxetina (FLX), Cloridrato de Paroxetina (PRX) e Oxalato de Escitalopran (ESC) em diferentes concentrações na PNO por MØ's estimulados ou não com Lipopolissacarídeo bacteriano (LPS).
- Avaliar o efeito da Tianeptina em diferentes concentrações na PNO por MØ estimulados ou não com LPS.
- Avaliar o efeito do Triptofano em diferentes concentrações na PNO por MØ estimulados ou não com LPS.
- Avaliar efeito do Agonista CP 93,129 em diferentes concentrações na PNO por MØ estimulados ou não com LPS.
- Avaliar a viabilidade celular de MØ's, estimulados ou não com LPS, sob influência das SS: FLX, PRX, ESC, TNP e TRF em diferentes concentrações.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SEROTONINA

A 5-HT, noradrenalina (NA), adrenalina e dopamina (DA) são neurotransmissores (NT) coletivamente conhecidos por aminas biogênicas. Esses agentes tem papel chave na neurotransmissão de diversas funções sinalizadoras do SN (KATZUNG; JULIUS, 2002; BARNES, GORDON, 2008). A 5-HT está envolvida na neurotransmissão de uma variedade de funções: humor, apetite, ciclo circadiano, atividade sexual, funções neuroendócrinas, temperatura corporal, sensibilidade à dor, atividade motora e funções cognitivas (GILMAN; GOODMAN, 1987; NOGUEIRA, et al., 2004).

Alterações na neurotransmissão serotoninérgica têm sido implicadas na etiologia de várias desordens como a ansiedade, depressão, esquizofrenia, Alzheimer (LESCH, 2004) hiperatividade (PASSOS; LOPEZ, 2010) e autismo (MORANT; MULAS; HERNANDÈZ, 2001; LESCH, 2004).

A 5-HT pode agir em diversos outros órgãos e sistemas do organismo (BARNES; GORDON, 2008), como por exemplo: trato gastrointestinal (FRAMPTON; et al., 2010), cardiovascular (JAFFRE; et al. 2009) e componentes do SI (MOSSNER; LESCH, 1998; CLOEZ-TAYARANI; et. al., 2003; TSUCHIDA; et al., 2011).

A 5-HT é um hormônio neuroendócrino que é sintetizado nos neurônios serotoninérgicos do sistema nervoso central (DIKSIC; YOUNG, 2001). Os corpos celulares de neurônios que produzem 5-HT localizam-se numa zona restrita do tronco encefálico. A maioria encontra-se nos núcleos da rafe (FRAZER; HENSCHER, 1999). As células enterocromafins do intestino produzem 5-HT fora do Sistema Nervoso Central (SNC), que é liberada na corrente sanguínea e captada por plaquetas e mastócitos (apenas mastócitos de ratos contém serotonina) (ESSMANN, 1978; GORDON; BARNES, 2003).

Bioquimicamente, a 5-HT, é sintetizada a partir da descarboxilação do aminoácido aromático TRF. A enzima triptofano hidroxilase (TPH) converte, inicialmente, TRF em 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Por ação da triptofano descarboxilase (TPD), numa segunda etapa, 5-HTP é descarboxilado para formar a 5-HT. Após a síntese, a 5-HT é estocada em vesículas por meio de transporte ativo a partir do citoplasma. A liberação da 5-HT ocorre por exocitose

dependente de cálcio (Ca). O influxo de Ca aumenta a liberação de 5-HT. (DIKSIC; YOUNG, 2001; BICALHO; et al., 2006).

O sistema nervoso pode influenciar o sistema imune através de neurotransmissores. Para que um NT possa mediar relações neuroimunes, é necessário que este preencha alguns critérios: Inervação do tecido linfóide por fibras nervosas de terminais nervosos noradrenérgicos; Liberação do NT e sua disponibilização para células imunes; Presença de receptores específicos do NT em células imunes e identificação de papéis imunomoduladores mediados pelo NT (ADER; et al., 1995).

A 5-HT está presente, periféricamente, em plaquetas, linfócitos, monócitos, MØ, mastócitos, células neuroendócrinas do pulmão e células do intestino (ESSMANN, 1978). A ação da serotonina, nestas células, se dá através da interação ligante/receptor de membrana celular.

A disponibilização da 5-HT para células do sistema imune ocorre por liberação direta da 5-HT armazenada em vesículas nos neurônios serotoninérgicos de terminais nervosos noradrenérgicos, que estão em contato íntimo com órgãos linfoides, quando estimulados (THOA, et al., 1969); Pela degranulação de mastócitos teciduais em resposta a estímulos inflamatórios (ROBBINS; COTRAN, 2006) ou ainda pela liberação por plaquetas no processo de agregação plaquetária (LORENZI, 2006).

Estudos evidenciaram a existência de 7 diferentes famílias de receptores serotoninérgicos, através dos quais a serotonina exerce suas funções fisiológicas, podendo algumas delas exibir vários subtipos, a saber: 5-HT₁ (5-HT_{1A}, HT_{1B}, HT_{1c}, HT_{1D}, HT_{1E}, HT_{1F}); 5-HT₂ (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}); 5-HT₃; 5-HT₄; 5-HT₅ (5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}); 5-HT₆ e 5-HT₇ (SILVA, 2004; WATTS; DAVIS, 2010).

O transportador da serotonina (SERT, 5-HTT) é responsável pelo transporte ativo de 5-HT nos neurônios, células enterocromafins, plaquetas e outras células. No cérebro, situa-se nas membranas pré- sinápticas dos terminais nervosos. A disponibilidade da 5-HT é regulada unicamente pela ação do SERT. Ele captura as moléculas de 5-HT e as transporta de volta para o terminal nervoso, tornando-as disponíveis para reciclagem dentro das vesículas sinápticas (MURPHY et al., 2004; SIBILLE; LEWIS, 2006)

Monócitos/ Macrófagos expressam receptores específicos para a 5-HT envolvidos no efeito imunomodulatório da 5-HT (FRANK ; et al., 2001; DURK; et al. 2005). Os receptores 5-HT_{1A} (ALEXANDER; et al., 2007; RITTER; et al., 2012) e 5-HT_{2A} (CLOEZ-TAYARANI; et al., 2003) foram descritos em MØ humanos. Em MØ de ratos, ambos os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{3A}, têm sido descritos (FREIRE-GARABAL; et al., 2003; CLOEZ-TAYARANI;

CHANGEUX, 2007). Os SERT estão presentes em macrófagos (MOSSNER; LESCH, 1998; CLOEZ-TAYARANI; CHANGEUX; 2007) e monócitos (FINOCCHIARO; et al., 1988).

Alguns efeitos da 5-HT sobre os MØ foram estudados por Nannmark *et al.* em 1992, que observou que a produção de superóxido (O_2^-) e a fagocitose induzida por interferon-gamma ($IFN-\gamma$) em MØ melhoram na presença de 5-HT.

A 5-HT tem influência, também, na produção de citocinas. Constatou-se que esta causa uma diminuição na produção de fator de necrose tumoral α (FNT- α), uma citocina pró-inflamatória, por monócitos estimulados, com envolvimento do subtipo do receptor 5-HT_{2A} (CLOEZ-TAYARANI; et al., 2003).

Em estudo experimental realizado, avaliando a influência da 5-HT na produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por MØ peritoneais de ratos em cultura e estimulados por LPS, evidenciou-se um significativo acréscimo na produção desta espécie reativa de oxigênio (KONDOMERKOS; KALAMIDAS AND KOTULAS, 2003).

Belowski; et al. em 2004, avaliou a influência de ISRS: fluvoxamina (FLV) e FLX na atividade citotóxica de MØ do baço de ratos, *in vivo*, e constataram uma significativa diminuição da atividade. Corroborando este resultado, estudo experimental realizado com MØ alveolares de ratos adultos, *in vitro*, avaliando sua funcionalidade, constatou que ocorre redução da liberação de NO por ISRS (FERREIRA e SILVA; *et al.* 2009). Todas as características, acima citadas, qualificam a 5-HT como um NT neuroimune.

2.2 SUBSTÂNCIAS SEROTONINÉRGICAS

Os transtornos depressivos podem ser explicados, bioquimicamente, pela hipótese monoaminérgica. Essa teoria propõe que a depressão seja consequência de uma menor disponibilidade de aminas biogênicas cerebrais, em particular de 5-HT, NA e/ou DA. Desta maneira, o tratamento desse transtorno através de drogas antidepressivas tem foco no aumento da disponibilidade destes NT's na fenda sináptica (STAHL, 1997; NISHIDA; et al., 2002).

O mecanismo de ação destas drogas pode ser baseado na inibição de enzimas responsáveis pela degradação destes NT's (antidepressivos da classe dos inibidores da monoaminoxidase- IMAO's) de uma forma não específica ou através do bloqueio, não específico, da recaptação dessas monoaminas (antidepressivos da classe dos tricíclicos- ADT's) (STAHL, 1997; NISHIDA; et al., 2002).

A baixa tolerabilidade, segurança e a ampla gama de efeitos colaterais causados pelos ADT's e IMAO's levaram os pesquisadores a produzirem medicamentos mais específicos e seguros: Os ISRS's: ESC, FLX, FLV, PRX e sertralina (SRT) (GOODNICK; GOLDSTEIN, 1998; STAHL, 1997; NISHIDA; et al., 2002). Embora compartilhem o principal mecanismo de ação, os ISRS's são estruturalmente distintos com marcadas diferenças no perfil farmacodinâmico e farmacocinético (GOODNICK; GOLDSTEIN, 1998).

A potência da inibição de recaptação da 5-HT é variada, assim como a seletividade por noradrenalina e dopamina. SRT e PRX são os mais potentes inibidores de recaptação. A potência relativa da SRT em inibir a recaptação de DA a diferencia farmacologicamente dos outros ISRS's (GOODNICK; GOLDSTEIN, 1998)

Os ISRS's inibem de forma potente e seletiva a recaptação de 5-HT na fenda sináptica através do bloqueio dos SERT, resultando em aumento da disponibilidade da 5-HT, especificamente. O maior tempo de permanência do NT na fenda sináptica leva a uma ativação aumentada dos receptores serotoninérgicos, levando a intensificação das respostas pós-sinápticas. O mecanismo molecular da inibição dos transportadores ainda não foi totalmente elucidado (GOODNICK; GOLDSTEIN, 1998).

A 5-HT pode entrar em contato com o MØ a partir de mecanismos imunológicos anteriormente citados. O MØ possui receptores para a 5-HT e SERT em sua membrana e há evidências do seu papel imunomodulatório na regulação da RI através da interação entre a 5-HT/ receptores na membrana desta célula.

2.3 MACRÓFAGO

Os monócitos são células circulantes consideradas ainda não totalmente amadurecidas, que só atingem o estágio final do desenvolvimento ao deixar a corrente circulatória para se fixarem nos tecidos, onde se transformam em MØ tissulares (histiócitos) ou nos MØ das cavidades serosas (LORENZI, 2006). Os MØ tissulares ou teciduais encontram-se espalhados por diversos órgãos e em alguns deles com denominações específicas, como no fígado (células de kupffer), no tecido ósseo (osteoclastos), nos rins (células mesangiais), no cérebro (células da micróglia) (PEKMAN; VERGANI, 1999; KRISHNATRY; BRAZEAU; FUNG, 2009;).

Os macrófagos, juntamente com os neutrófilos, constituem uma das primeiras linhas de defesa contra infecções, após as barreiras naturais da pele e mucosas (PARSLOW, 2004). Esta célula desempenha um papel crucial na RI tanto inata quanto da adaptativa (JANEWAY; CHARLES, 1997; GORDON; ABBAS; LICHTMAN, 2005; MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009).

Através da fagocitose e processamento dos antígenos, os MØ eliminam (resposta imune inata) e apresentam antígenos aos linfócitos, iniciando a resposta imune adaptativa (ABBAS; LICHTMAN, 2005; MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009). Além de liberarem diversos mediadores químicos responsáveis pelo controle da resposta inflamatória (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2001; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

A ativação do sistema monócito- MØ se dá após o contato direto dessas células com partículas vivas ou inertes que invadem o meio interno. Além disso, as próprias células dos indivíduos, uma vez alteradas ou modificadas em sua membrana externa, passam a ser agentes ativadores de MØ (LORENZI, 2006).

Os MØ quando ativados, são fagócitos ávidos que internalizam quaisquer partículas estranhas ou restos celulares com os quais entram em contato (PARSLOW, 2004). A fagocitose se processa por meio da relação entre os receptores da membrana e certas moléculas de adesão que facilitam o contato com as partículas estranhas. Os receptores são de vários tipos: (1) receptores da porção Fc da imunoglobulina G; (2) receptores das frações C3b e C4 do complemento; (3) receptores para opsoninas não reconhecidas pela célula; (4) receptores de quimocinas (LORENZI, 2006).

Quando ativados, os macrófagos, defendem-se contra a invasão do patógeno através da liberação de citocinas pró inflamatórias, produção de espécies reativas de oxigênio (por exemplo, o superóxido) e nitrogênio (por exemplo, o NO) que desempenham um papel importante na função bactericida desta célula, (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000; GORDON, 2003; PARSLOW, 2004; LEE; *et al.* 2009) juntamente com proteases e hidrolases (PARSLOW, 2004), além de muitos outros mediadores inflamatórios, tais como leucotrienos (GORDON, 2003) e o fator ativador plaquetário (PAF), que são ativos em células distantes e amplificam a reação inflamatória (PEREIRA; *et al.*, 1998).

O NO é um gás radical livre, neutro, solúvel, altamente lábil e permeável à membranas, sua atividade não se restringe ao local de sua produção, por sua característica de rápida difusão (BOGDAN, 2001).

É produzido pelas óxido nítrico sintetases (NOS) que são dependentes de O₂, NADPH, flavinas e biopterina para exercer sua atividade. Três isoenzimas já foram identificadas, sendo

duas delas constitutivas (cNOS), normalmente presentes nas células, e uma induzível (iNOS), ativada a partir de algum estímulo externo, no caso um estímulo imunológico (WANG; MARDSEN, 1995; MOTE; et al., 2008).

A óxido nítrico sintetase cerebral (nNOS) ou Isoforma I está presente, constitutivamente, no cérebro e foi identificada no cerebelo do camundongo e do porco (SCHIMIDT, et al., 1991) e em cérebros humanos (KONTUREC; KONTUREC, 1995) e a óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) ou Isoforma III, que é expressa constitutivamente nas células endoteliais, e foi identificada em células endoteliais de bovinos e humanos (POLLOCK; et al., 1991).

A enzima denominada óxido nítrico sintase induzível (iNOS) ou isoforma II, é induzida nos macrófagos e em outras células : células do músculo liso (TENG; et al., 1998), hepatócitos de camundongos (STUEHR; et al., 1991) e humanos (GELLER; et al., 1993) quando estimuladas.

As NOS tem a propriedade de gerar NO a partir da L-arginina, um aminoácido essencial, e oxigênio molecular (PARSLOW, 2004) e tem importante papel em diversos sistemas do organismo : no controle da pressão arterial (LANCASTER, 1992; VANHOUTTE, 2003); na homeostase das vias aéreas (ZILBERSTEIN; FLORA-FILHO, 2000); na participação de mecanismos de aprendizado e memória e na ativação da resposta imune (LANCASTER, 1992).

O NO age ingressando nas células, reagindo com outras moléculas inorgânicas (oxigênio, O_2^- , metais de transição); estruturas do DNA (bases pirimídicas); grupos prostéticos (heme); e proteínas (levando a S-nitrosilação de grupos tiols, nitração de resíduos de tirosina ou ruptura de metal-sulfeto, domínios de zinco ou complexo de ferro-sulfeto) (MARSHALL; et al., 2000), inativando as proteínas que são importantes para a produção de energia, transdução de sinais e síntese dos ácidos nucléicos, provocando a morte celular (LANCASTER, 1992).

2.4 USO DE LINHAGENS CELULARES EM MODELOS EXPERIMENTAIS AVALIANDO A FUNÇÃO DO MACRÓFAGO

Em condições adequadas, a maioria das células, pode viver se reproduzir e até mesmo expressar suas propriedades *in vitro* (ALBERTS; et al., 2006). A partir de tecidos vivos de

animais, as células podem ser isoladas e cultivadas em placas contendo meio de cultura nutritivo (COOPER; HAUSMAN, 2007). Este tipo de cultivo, a partir de tecidos vivos, é denominado cultura primária (ALBERTS; et al., 2006).

Células geneticamente modificadas, geralmente isoladas de tecidos cancerosos, que se proliferam indefinidamente, mas com a preservação das características genótípicas e fenotípicas dos tecidos de origem são denominadas linhagens celulares (COOPER; HAUSMAN, 2007).

Modelos experimentais que utilizam a cultura primária trazem prejuízos tanto econômicos quanto do ponto de vista bioético. Este tipo de cultivo necessita de um grande gasto de materiais além do tempo despendido pelos pesquisadores. Uma vez que são inviáveis durante longos períodos, precisam ser descartadas (NOVELINO; et al., 2003) e a cada experimento realizado, uma nova cultura deverá ser montada.

Desta maneira, muitos animais precisam ser sacrificados até o fim da pesquisa, inclusive para que se consiga o número ideal de células, indo de encontro aos princípios éticos da pesquisa com animais, que normatiza a utilização do mínimo necessário de animais para se obter resultados válidos (HOFF, 1980).

Os macrófagos da linhagem RAW 264.7 são macrófagos murinos transformados pela injeção intraperitoneal do vírus de leucemia Abelson, obtidos da ascite de ratos BALB/c (RASCHKE; et al., 1978; ABELSON; RABSTEIN 1970). Estas células possuem receptores para imunoglobulinas e produzem lisozimas (ABCAM, 2012). Também são capazes de responder de forma similar aos macrófagos obtidos diretamente de camundongos (RAMAMOORTHY; TIZARD, 1998).

A linhagem RAW 264.7 de macrófagos/monócitos peritoneais de camundongo tem sido amplamente utilizada em pesquisas científicas com o objetivo de analisar a resposta normal desta célula frente a substâncias, supostamente imunomoduladoras. Esta linhagem é utilizada em modelos experimentais avaliando a ativação da RI através da produção do NO. (HASKÓ; et al., 1996; WANG; MAZZA, 2002 YUN; et al., 2008; QIN; et al., 2012; CHAE).

3 MÉTODOS

3.1 ÁREA

Os experimentos foram realizados na Sala de cultura de células e tecidos do Laboratório de Estudos em Nutrição e Instrumentação Biomédica (LENIB) do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Fundado em 1956, o departamento de nutrição, foi inicialmente designado Instituto de Fisiologia e Nutrição da Faculdade de Medicina do Recife. Visava, principalmente, ao estudo da problemática nutricional no Nordeste. Em 1957, foi criado o Curso de Nutricionistas (atual Graduação em Nutrição da UFPE), pelo professor Nelson Chaves. Com a reestruturação da Universidade, em 1975, o departamento de nutrição passou a integrar o Centro de Ciências da Saúde (CCS).

A ideia para a criação do LENIB surgiu em 2002, quando uma comissão do curso de Engenharia Biomédica, que visava criar parcerias que pudessem originar projetos de pesquisa e extensão se interessou por uma pesquisa que era desenvolvida pela Pós-Graduação em Nutrição. De tal fato se originou uma parceria com a Universidade de Tecnologia de Compiègne (UTC), na França, que culminou com a construção do laboratório.

O LENIB foi fundado em 11/12/2006 através da parceria entre a UFPE e UTC por meio da aprovação do projeto de cooperação internacional Capes/Cofecub em 2003.

3.2 PERÍODO DE REFERÊNCIA

Este estudo foi realizado de Julho de 2012 a Fevereiro de 2013.

3.3 DESENHO DO ESTUDO

Estudo do tipo experimental e comparativo, utilizando macrófagos da linhagem celular RAW 264.7, para a avaliação do efeito da administração *in vitro* de substâncias serotoninérgicas, através da mensuração da produção de óxido nítrico.

3.4 MÉTODO DE COLETA DE DADOS

3.4.1 *Cultivo celular de macrófagos*

Para esse estudo, foram utilizados MØ da linhagem RAW 264.7, obtidos no banco de células do Rio de Janeiro/BCRJ-UFRJ. As células foram preservadas em nitrogênio líquido (criopreservação) por 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, SP, Brasil), um crioprotetor, e 90% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich, SP, Brasil) (1mL DMSO em 9mL de SFB).

Para a realização dos ensaios *in vitro*, as células foram descongeladas em banho Maria a 37° C. Na iminência do descongelamento, o material foi transferido para garrafas estéreis de cultura de tecidos de 75 cm² (TPP,-Biosystem, PR, Brasil) contendo meio de cultura DMEM (Sigma-Aldrich, SP, Brasil) já aquecido a 37°C, suplementado com 10 % de SFB, 2mM l-glutamina, 100U/ml penicilina e 100µg/ml de Streptomicina e levadas à incubadora a uma temperatura de 37° C em CO₂ a 5% para crescer até as mesmas atingirem a confluência.

As células aderidas à superfície da garrafa de cultivo foram destacadas por meio de raspagem com suporte plástico (TPP,-Biosystem, PR, Brasil). A suspensão contendo as células, então, foi coletada e centrifugada a 1500 rpm por 10 min para separação das células do meio. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 5 mL de DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10%, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma-Aldrich, SP, Brasil).

3.4.2 *Contagem de macrófagos*

A suspensão de MØ foi diluída na proporção de 1:10 (v:v) com solução de azul de Tripán (0,4%) e a contagem total de MØ's foi feita em hemocitômetro de Neubauer, com auxílio de microscópio de luz.

3.4.3 *Cultivo das células in vitro*

As células foram distribuídas em placas de cultura com 24 poços (TPP, Cultilab, SP, Brasil) e levadas para aderir por 12 h em incubadora a 37°C em CO₂ a 5%. As células não aderidas foram removidas por lavagem com tampão PBS. Em cada poço 5×10^5 células estavam presentes em 1 mL de meio.

3.4.4 *Incubação das células cultivadas com drogas serotoninérgicas e avaliação de seu efeito sobre a produção de óxido nítrico*

Com o intuito de analisar a PON por em resposta a SS, as células aderidas foram incubadas com ISRS's (FLX, ESC, PRX) (TOCRIS Bioscience, Sellex – SAC, SP, Brasil), TNP, CP 93, 129 e TRF.

Todas as substâncias foram preparadas em água para injeção nas concentrações de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} M. A monocamada de células foi estimulada com 10 µL/mL de lipopolissacarídeo (LPS, Sigma-Aldrich, SP, Brasil). Para controle negativo, foi adicionada água para injeção em alguns poços.

3.4.5 Mensuração do óxido nítrico

Após 24 horas da estimulação com LPS, os sobrenadantes de cultura foram coletados e a análise da PON foi realizada através de método colorimétrico quantitativo baseado na reação de Griess, culminando com a leitura dos níveis de nitrito/nitrato em sobrenadante de cultura de macrófagos, sendo os resultados expressos em μM de nitrato por 5×10^5 células.

No método colorimétrico quantitativo baseado na reação de Griess, neste estudo, foram utilizadas alíquotas de 100 μL em duplicada dos sobrenadantes de cultura incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos com 100 μL de reagente de Griess imediatamente preparados (sulfanilamida a 1% e naftiletileno a 0,1% em ácido ortofosfórico a 5%). A absorbância foi mensurada a 540 nm por leitor de microplaca.

A concentração de nitrito foi determinada a partir de uma curva padrão construída com nitrato de sódio nas concentrações de 0-100 μM . Todas as amostras foram avaliadas em relação a um branco correspondente a DMEM incubado por 24 h nas mesmas placas das amostras, mas na ausência de células.

3.4.6 Análise da viabilidade celular

A viabilidade dos macrófagos foi avaliada pela redução mitocondrial do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- brometo de difeniltetrazólio (MTT) ao formazam como descrito em Mossman (1983). As células foram incubadas com 50 μL de MTT/mL (0,5 mg/ml) e meio de cultura (500 μL) por 2h em incubadora a 37°C e CO₂ a 5%. O formazam resultante foi solubilizado com 500 μL de dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS), por 12 h à temperatura ambiente.

A quantificação do formazam solubilizado foi realizada por leitor de microplaca a 540 nm. Os resultados foram expressos em absorbância de formazam por 5×10^5 células.

3.5 MÉTODO DE ANÁLISE

Foram utilizados para a análise dos dados os parâmetros: média e desvio padrão da média. A fim de verificar se houve diferenças nos valores médios entre os grupos, foi utilizado o teste estatístico One Way ANOVA, seguido do teste de Dunnett's (comparações múltiplas *versus* grupo controle. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4 RESULTADOS- ARTIGO ORIGINAL

Nesta dissertação, foi estudado o efeito da administração de substâncias serotoninérgicas (Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina, agonista do receptor serotoninérgico 5-HT_{1B}, facilitador da recaptação da serotonina e o aminoácido precursor da serotonina) na produção de óxido nítrico por macrófagos da linhagem RAW 264.7, bem como o possível efeito destas substâncias na viabilidade celular. O artigo intitulado: “*Evaluation of the effect of serotogenic substances on oxide nitric production for RAW 264.7 macrophages*”. Foi submetido como artigo original (ANEXO XXX) à revista: **Neuroimmunomodulation**. Publicada pela Editora Karger, uma editora de longa história em publicações médicas <<desde 1893>>, é uma revista que explora as vias nas quais o sistema nervoso interage com o sistema imune. Englobando pesquisas básicas e clínicas, relata todos os aspectos destas interações. É classificada como qualis internacional A pela CAPES.

Title: Evaluation of the effect of serotogenic substances on nitric oxide production by RAW 264.7 macrophages

Authors:

João Ricardo Sá Leitão Camaroti ^a

Enthéia Louise Queiroz Machado ^b

Queliane Gomes da Silva Machado ^c

Wylla Tatiana Ferreira e Silva ^{b,*}

Author Affiliations:

^a Programa de Pós Graduação em Patologia, Centro de Ciências da Saúde, UFPE. Recife, Brazil

^b Departamento de Nutrição, Centro Acadêmico de Vitória, UFPE. Vitória do Santo Antão, Brazil

^c Departamento de Enfermagem, Centro de Ciências da Saúde, UFPE. Recife, Brazil.

This study was conducted in the Departamento de Nutrição. Universidade Federal de Pernambuco – Brazil.

* **Corresponding author:** Departamento de Nutrição, CCS, UFPE, Av. Professor Moraes Rego, s/n, CEP 50670-901, Cidade Universitária, Recife/PE, Brazil. Tel.: +55 81 2126 8470; fax: +55 81 2126 8473

E-mail address : joaoricardocamarotti@hotmail.com (J.R.S.L Camaroti)

Short Title/Running head: Effect of serotogenic substances on nitric oxide production by macrophages

Key-words: Macrophage, Serotonin, Oxide nitric release, Cell survival.

Abstract

Objective: Macrophages express surface serotonin receptors and transporter which can influence its function. The aim of the present study was evaluation the nitric oxide production (NOP) in RAW 264.7 macrophages incubated in the presence of various serotogenic substances: selective serotonin re-uptake-SSRI (fluoxetine-FLX, paroxetine- PRX and escitalopran ESC), facilitator selective serotonin re-uptake (tianeptine-TNP); amino acid

precursor of serotonin (Tryptophan-TRP) and agonist of the 5-HT_{1B} receptor (CP-93, 129) in different concentrations.

Methods: RAW 264.7 macrophages were cultivated and incubated with FLX, PRX, ESC, TNP, TRP e CP-93,129 in concentrations of 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} . After lipopolysaccharide (LPS from E. Coli serotype 055B5) stimulation, the culture supernatant were removed for measuring of the oxide nitric production. The viability of culture cells were assessed.

Results: FLX and PRX at high concentrations showed cytotoxic effect on cells. FLX at low concentrations resulted an increased production of nitric oxide. ESC and TRP also showed to influence the increase in nitric oxide production at some concentrations. PRX and CP-93,129 caused a decrease in oxide nitric production at certain concentrations. TNP didn't seem to influence in nitric oxide production. The cell viability treated with FLX and PRX showed a variation inversely proportional to the dose.

Conclusions: SSRI interfere on nitric oxide production by macrophages heterogeneously and dose-dependent. The reduction of nitric oxide production seems to be associated with the 5-HT_{1B} receptor. Tryptophan shows promoting activity of production of nitric oxide in macrophages, although, it is not known if it's by way related to the serotonin metabolism.

Introduction

Serotonin (5-HT) is a neurotransmitter in the central nervous system (CNS) synthesized, stored and released primarily by serotonergic neurons of the raphe nuclei of the brain stem. [1]. The enterochromaffin cells of the gut produce 5-HT outside the CNS that is released into the blood and taken up by mast cells and platelets [2,3].

Serotonin plays a critical role in neurotransmission in various signaling functions of the nervous system [1,4]. It is involved in a variety of functions: Humor, appetite, circadian cycle, sexual activity, neuroendocrine functions, body temperature, pain sensitivity, motor activity and cognitive function [5,6]. Serotonin acts also in many other organs and body

systems [4], for example: digestive [7], cardiovascular [8], respiratory [2] and components of the immune system [9,10,11].

The immune system (IS) is an organization of molecules, cells, tissues and organs with specialized roles in defending the body against infections [12], removal of dead cells and cellular debris, as well as in the establishment of immunological memory [13]. The basic cells of the IS are macrophages (MØ), lymphocytes, NK (Natural Killer) cells and dendritic cells, polymorphonuclear: neutrophils, eosinophils, basophils, mast cells, platelets and endothelial cells [12,14].

Macrophages are multifaceted immune cells from the myeloid lineage, being the tissue form from monocyte and play a critical role in the integration of innate and adaptive immune responses [15]. Possess several functions, including: regulating of the immune response, inflammatory response, defense against infectious agents, enzyme secretion, secretion of substances that regulate cell activity of lymphocytes [16,17,18,19] as well as acting in the repair and renewal of tissues and immunity against tumors [18].

The activation of the monocyte / macrophage occurs after direct contact of these cells with live or inert particles that invade the internal environment. In addition, self cells altered or changed in its outer membrane become macrophages activating agents [19].

When activated, macrophages are avid phagocytes that internalize foreign particles and cellular debris with which they come in contact [20], defend themselves against pathogen invasion through the release of inflammatory cytokines, production of reactive oxygen species (eg superoxide) and nitrogen (eg, NO), [3,20,21,22] with proteases and hydrolases [20], and many other inflammatory mediators such as leukotrienes [3] and platelet activating factor (PAF), which are active in distant cells and amplify the inflammatory reaction [23].

An important way to evaluate the function of macrophages is to analyze the production of nitric oxide (NO). The release of nitric oxide by activated macrophages has effector function in host defense and has an important role in some infectious diseases because their immune regulatory properties [24].

The immune system and the nervous system (NS) have long been considered autonomous regulatory systems. However, these two systems interact with each other [25]. 5-HT seems to have an important role in the integration between the NS and IS due to evidence supporting their role in immunomodulatory components of IS.

5-HT may mediate interactions between IS and NS through cell signaling processes coordinated by serotonergic receptors and 5-HT reuptake system by four different routes:

Activation of T cells and natural killer cells, delayed hypersensitivity response; Production of chemotactic factors and natural immunity performed by macrophages [9].

The aim of this study was to analyze the nitric oxide production (NOP) and cell viability of RAW 264.7 macrophage lineage when influenced by serotonergic substances.

Material and methods

RAW 264.7 cells

For this study macrophages lineage (RAW 264.7), purchased in the cell bank of Rio de Janeiro/ BCRJ-UFRJ, were used. The cells were preserved in liquid nitrogen (cryopreservation) in dimethyl sulfoxide 10% (DMSO) (Sigma-Aldrich, SP, Brasil) and fetal bovine serum 90% (FBS) (Sigma-Aldrich, SP, Brasil) (1mL DMSO in 9mL de FBS).

RAW 264.7 cell culture

For realization of assays, the cells were thawed in water-bath at 37°C. In imminence of thaw, the material were transferred to 75 cm³ tissue-culture flasks (TPP,-Biosystem, PR, Brasil) containing Dulbecco's modified Eagle's *médium* (DMEM) (Sigma-Aldrich, SP, Brasil) at 37°C, supplemented with 10 % of FBS, 2mM l-glutamine, 100U/ml penicillin and 100µg/ml of Streptomycin and transported to cell culture incubation at 37° C with 5% CO₂ to grow until reaching confluence

The adherent cells were *scraped* from tissue culture plastic (TPP,-Biosystem, PR, Brasil) and pelleted at 4703g for 10 minutes and resuspended in a volume of 5 mL culture medium DMEM supplemented with fetal bovine serum at 10%, 100 U/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin (Sigma-Aldrich, SP, Brasil).

The cells were distributed in culture plates with 24 wells (5 x 10⁵/ml cells) (TPP, Cultilab, SP, Brazil) and taken to adhere for 12h in an incubator at 37°C in CO₂ 5%. The cells that didn't adhere were removed with PBS-EDTA.

Incubation of RAW 264.7 cells with serotogenic substances for evaluation of its effects on the nitric oxide production

In order to analyze the nitric oxide production (NOP) for macrophage in response to different concentrations of serotogenic substances. The cells adhered were incubated with: Selective Serotonin Re-uptake -SSRI (fluoxetine-FLX, paroxetine, and PRX-escitalopran ESC), facilitator selective serotonin re-uptake (tianeptine-TNP); amino acid precursor of serotonin (Tryptophan-TRP) and agonist of the 5-HT_{1B} receptor (CP-93, 129) at 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} M. After incubation with serotogenic substances, the cells were stimulated with 10 μ L/mL of lipopolysaccharide (LPS from *E. Coli* serotype 055B5) (LPS, Sigma-Aldrich, SP, Brasil).

Nitric oxide assay

After 24 hours of incubation with LPS, the supernatant of culture was collected and it was made an analysis of nitric oxide production by the quantitative colorimetric method based on the Griess reaction, culminating with nitrite/nitrate level readings in a supernatant culture of macrophage. The results were expressed in μ M of nitrate by 5×10^5 cells. The absorbance was measured in 540 nm per spectrophotometry

Analysis of cellular viability

The macrophage viability cultivated on the plate was evaluated by the mitochondrial reduction of the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-il]-2,5-difezil tetrazolium bromide (MTT) to formazan as described in Mossman (17). The cells were incubated with 5 μ L of MTT/mL (0,5 mg/ml) and culture medium (50 μ L) for 2 h in an incubator at 37°C and CO₂ at 5%. The

resulting formazan was solubilized with 50 μ L of sodium dodecyl sulfate at 10% (SDS), incubated for 12h in the same conditions.

The quantification of the solubilized formazan was realized by spectrophotometry at 540nm. The results were expressed in formazan's absorbance of 5×10^5 cells.

Statics analysis

It was used for the data analysis of the tests media +/- standard deviation. In order to analyze the differences in means values between the groups were used the statistical test One Way ANOVA, followed by Dunnett's test (multiples comparison *versus* control group). $P < 0,05$ was considerate statistically significant.

Results

Nitric oxide production by activated macrophages and incubated with FLX at concentration of 10^{-6} M e 10^{-7} M was increased to 22,53% and 21,71%, respectively, compared with the control. In other concentrations has been no change. FLX at concentration of 10^{-4} M showed cytotoxic effect for macrophages, reflecting the drastic reduction in levels of nitric oxide production (0%). The viability of cells treated with FLX concentrations between 10^{-5} M and 10^{-8} M ranged from 81 to 92.5% compared with the control. This effect was inversely proportional to the dose (Figure 1).

ESC at concentration of 10^{-4} showed an increased (49,9%) in nitric oxide production for activated macrophages compared with the control, even with a reduction of 22.6% in cell viability at this concentration. An increase in the rate of death cell was observed in macrophages incubated with ESC at concentrations of 10^{-4} M, 10^{-5} M 10^{-6} M and 10^{-7} M compared with the control. No proportional relationship was observed with the dose (Figure 2).

A decrease in the production of nitric oxide (22,98%) by activated macrophages incubated with PRX at concentration of 10^{-5} M was observed compared with the control. In others concentrations were not observed changes. PRX at concentration of 10^{-4} M showed cytotoxic effect for the cells (absence of nitric oxide production). PRX at concentrations

between 10^{-5} M and 10^{-8} M showed a variation in the rate of cell viability between 78,8% to 104,6% compared with the control. This effect was directly proportional to the dose. (Figure 3).

There was no change in nitric oxide production by activated macrophages and incubated with TNP at any of the concentrations. A decrease in cell viability was observed in macrophages incubated with TNP at concentration of 10^{-5} M in comparison with the control (figure 4).

There was a decrease (22.18%) in the production of nitric oxide by activated macrophages and incubated with the agonist CP-93, 129 at a concentration of 10^{-7} M compared with the control. In other concentrations has been no change. A decrease in cell viability was observed in macrophages incubated with CP-93,129 at concentrations of 10^{-7} M and 10^{-8} M compared with the control (figure 5).

TRF at concentrations of 10^{-6} M e 10^{-8} M caused an increase of the production of nitric oxide of 40,03% and 33,39%, respectively, compared with the control. In other concentrations has been no change. An increased of cell viability was observed in macrophages incubated with TRF at concentration of 10^{-7} M in comparison with the control (figure 6).

Discussion

The effect of serotonin in immunological processes was evaluated through analysis of nitric oxide production by RAW 264.7 macrophage lineage in culture, activated by LPS and under the influence of serotonergic substances (SSRI, TNP, TRP and CP-93, 129) in different concentrations.

Data from this study indicate that SSRIs interfere in the production of nitric oxide in a heterogeneous way (sometimes stimulating, sometimes depressing) and no relationship of proportionality with the dose. Under the influence of CP-93, 129, there was a reduction in nitric oxide production, suggesting the involvement of 5-HT_{1B} receptor in this process. TRP showed a promoter activity in nitric oxide production, but still not known whether for the serotonergic pathway.

Regarding the influence of the dose of substances used in the study on cell viability in general, an inverse relationship was observed. Only CP-93, 129 has a different response:

Lower doses caused a reduction in cell viability. FLX and PRX at higher concentrations showed a high cytotoxic power, reducing to 0% cell viability. The amino acid TRP appears to have a protective function for this cell, since there was a decrease in the rate of cell death in macrophages treated with this substance.

Several studies in order to demonstrate the effect of 5-HT on the immune system have been performed. The presence of serotonin receptors in leukocytes has been first reported in 1982 [26]. The 5-HT_{1A} receptor on T cells [27], 5-HT₇ receptor and serotonin reuptake system on B cells [9,28] have been studied.

Monocytes / macrophages express specific receptors for 5-HT involved in the immunomodulatory effect of serotonin [29,30]. The 5-HT_{1A} [31,32] and 5-HT_{2A} receptors [10] have been described in human macrophages. Both 5-HT_{1A} and 5-HT_{3A} receptors in mice's macrophage already been reported in previous studies [33,34]. Serotonin transporter (SERT) are present on macrophages [9,34] and monocytes [35]. The presence of 5-HT receptors and SERT in macrophages suggests a role of 5-HT in the functionality of this cell.

A study performed to analyze the effects of 5-HT in the macrophage, showed an influence on superoxide production and phagocytosis induced by IFN- γ by this cell [36]. 5-HT has influence also on the production of cytokines. It was found that serotonin causes a decrease in production of tumor necrosis factor α (TNF- α) production by monocytes stimulated with involvement of 5-HT_{2A} receptor subtype [10].

In experimental study, assessing the influence of 5-HT in the production of hydrogen peroxide (H₂O₂) by peritoneal macrophage of mice cultured and stimulated by LPS, was shown a significant increase in the production of this reactive oxygen species [37]. Study evaluating the influence of SSRIs: fluvoxamine (FLV) and FLX functionality of spleen macrophages of mice *in vivo*, indicated a significant decrease in their cytotoxic activity [38].

Confirming these results, experimental study evaluating the effect of FLX on the function of the alveolar macrophages from adult mice, *in vitro*, it was found that there is a reduction of NO release [39]. These results disagree with the results of this study, which showed an increase of nitric oxide production from macrophage under the influence of FLX, fact which can be explained by the difference in types of cell culture used in the experiments.

Data from this study indicate that 5-HT has an important immunomodulatory role of macrophage function, represented by changes in the production of nitric oxide. However, specific studies on the role of 5-HT_{1B} receptor in macrophage function, by what pathway tryptophan modulates the nitric oxide production, and the effect of SSRI this cell must be

privileged to have been more useful data about the important relationship macrophage / serotonin.

The understanding of the relationship macrophage / serotonin provide further evidence and better understanding of the complex processes of immunity and how the use of serotonergic substances, such as antidepressant drugs and / or nutritional supplement with food source of the amino acid precursor tryptophan affect the immune response.

Acknowledgements

This work was supported by The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/Brazil.

References

- [1] Katzung BG, Julius DJ. Histamina, serotonina e os alcalóides do esporão do centeio. In: Katzung BG editor. *Farmacologia Básica & Clínica*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 233-256.
- [2] Essmann WB. Serotonin distribution in tissue and fluids. In W. B. Essmann editor. *Serotonin in health and disease*. New York: Spectrum, 1978. Vol.1.
- [3] Gordon J, Barnes NM. Lymphocytes transport serotonin and dopamine: agony or ecstasy? *Trends Immunol*. 2003; 24: 438–443.
- [4] Barnes NM, Gordon J. Harnessing serotonergic and dopaminergic pathways for lymphoma therapy: evidence and aspirations. *Semin Cancer Biol*. 2008;18:218–225.
- [5] Gilman AG, Goodman LS. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1987.
- [6] Nogueira MI, Takase, LF, Lopes, S, Mascaro, MB, Manhaes-de-Castro, R. Serotonina. A trajetória evolutiva de uma molécula de ampla ação trófica e neurológica. *Ciência Hoje*. 2004; 202(34): 30-5.

- [7] Frampton I, Watkins B, Gordon I, Lask B. Do abnormalities in regional cerebral blood flow in anorexia nervosa resolve after weight restoration? *Eur Eat Disord Rev* 2011;19:55-8.
- [8] Jaffre F, Bonnin P, Callebert J, Debbabi H, Setola V, Doly S, Monassier L, Mettauer B, Blaxall BC, Launay JM, Maroteaux L. Serotonin and angiotensin receptors in cardiac fibroblasts coregulate adrenergic- dependent cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2009; 104: 113–123.
- [9] Mossner R, Lesch KP. Role of serotonin in the immune system and neuroimmune interactions. *Brain Behav Immun*. 1998; 12: 249-271.
- [10] Cloez-Tayarani I, Petit-Bertron AF, Venters HD, Cavaillon JM. Differential effect of serotonin on cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells: involvement of 5-hydroxytryptamine_{2A} receptors. *International immunology*. 2003; 15(2): 233-240.
- [11] Tsuchida Y, Hatao F, Fujisawa M, Murata T, Kaminishi M, Seto Y, Hori M, Ozaki H. Neuronal Stimulation with 5-Hydroxytryptamine 4 Receptor Induces Anti-Inflammatory Actions via {Alpha}7nACh Receptors on Muscularis Macrophages Associated with Postoperative Ileus Gut. 2011; 5(60): 638-647.
- [12] Delves PJ, Roit TIM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000; 343:37-49.
- [13] Schulenburg H, Kurz CL, Ewbank JJ. Evolution of the innate immune system: the worm perspective. *Immunol Rev*. 2004; 198:36-58.
- [14] Brasileiro Filho G. *Bogliolo Patologia*. 4º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- [15] Ross JA, Auger MJ. The biology of the macrophage. In: Burke B, Lewis CE editors. *The Macrophage*. Oxford University Press, Oxford, UK. 2002. p. 1-72
- [16] Pekman M, Vergani D. *Imunologia Básica e clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- [17] Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. *Hematologia: Fundamentos e Práticas*. São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

- [18] Klimp AH, De Vries EG, Scherphof GL, Daemen T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2002; 44: 143-161.
- [19] Lorenzi TF. *Manual de Hematologia: Propedêutica e Clínica*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-koogan, 2006.
- [20] Parslow, TG. *Imunologia médica*. 10ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- [21] Medzhitov, R.; Janeway, C. Innate immune recognition: Mechanisms and pathways. *Immunol. Rev.* 173: 89-97. 2000.
- [22] Lee, HH.; Lee, JS.; Cho, JY.; Kim, YE.; Hong, EK. Study on immunostimulating activity of macrophage treated with purified polysaccharides from liquid culture and fruiting body of *Lentinus edodes*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 566-572. 2009.
- [23] Pereira Jr, GA.; Marson, F.; Abeid, M.; Ostini, FM.; Souza, SM.; Brasileiro Filho, A. Pathogenetic mechanisms of sepsis and their therapeutics implications. *Medicina, Ribeirão Preto*. 31: 349-362. 1998.
- [24] Bogdan C: Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2001;2(10):907-916.
- [25] Homo-Delarche F, Dardenne M. The neuroendocrine-immune axis. *Springer Semin Immunopathol*. 1993;14 Suppl 3:221-38.
- [26] Elisieva, LS., & Stefanovich, LE. Specific binding of serotonin by blood leukocytes and peritoneal cells in the mouse. *Biokhimica*. 1982; 47, 810-815.
- [27] Aune, TM, KM. Mcgrath, et al. Expression of 5HT1a receptors on activated human T cells. Regulation of cyclic AMP levels and T cell proliferation by 5-hydroxytryptamine. *J Immunol*, v.151, n.3, Aug 1, p.1175-83.1993.
- [28] Lesch, K. P., Bengel, D., Heils, A., Sabol, S. Z., Greenberg, B. D., Petri, S., Benjamin, J., Müller, C. R., Hamer, D. H., & Murphy, D. L. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*. 1996; 274, 1483-1487.

- [29] Frank, MG.; Johnson, DR.; Hendricks, SE.; Frank, JL. Monocyte 5- HT1A receptors mediate pindobind suppression of natural killer cell activity: modulation by catalase. *Int Immunopharmacol.* 1: 247–253. 2001.
- [30] Durk, T.; Panther, E.; Muller, T.; Sorichter, S.; Ferrari, D.; Pizzirani, C. et al. 5-Hydroxytryptamine modulates cytokine and chemokine production in LPS-primed human monocytes via stimulation of different 5-HTR subtypes. *Int Immunol.* 17: 599–606. 2005.
- [31] Alexander, SPH.; Mathie, A.; Peters, JA. *Guide to Receptors and Channels*, 2^a ed. *Br J Pharmacol.* 150(1): 1–168. 2007.
- [32] Ritter, M.; El-Nour, H.; Hedblad, MA.; Butterfield, JH.; Beck, O.; Stephanson, N.; Holst, M.; Giscombe, R.; Azmitia, EC.; nordlind, K. Serotonin and its 5-HT1 receptor in human mastocytosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 34(4): 679-685. 2012.
- [33] Freire-Garabal, M.; Nunez, M.; Balboa, J.; Lopez-Delgado, P.; Gallego, R.; Garcia-Caballero, T.; Fernández-Roel, M.D.; Brenlla, J.; Rey-Mendez, M. Serotonin upregulates the activity of phagocytosis through 5-HT1A receptors. *Br J Pharmacol.* 139: 457–463. 2003.
- [34] Cloez-Tayarani, I.;Changeux, JP. Nicotine and serotonin in immune regulation and inflammatory processes: a perspective. *J Leukoc Biol.* 81: 599-606. 2007.
- [35] Finocchiaro, LME; Arzt, ES.; Fernandez-Castelo, S. et al. Serotonin and melatonin synthesis in peripheral blood mononuclear cells: Stimulation by interferon-gamma as part of an immunomodulatory pathway. *Journal of Interferon Research.* 8: 705-16. 1988.
- [36] Nannmark, U.; Sennerby, L.; Bjursten, LM. ; Skolnik, G. ; Bagge, U. Inhibition of leukocyte phagocytosis by serotonin and its possible role in tumor cell destruction. *Cancer Lett.* 62(1): 83-86. 1992.
- [37] Kondomerkos, DJ; Kalamidas, SA.; Kotulas, OB. In vitro effects of hormones and autacoids on the hydrogen peroxide production and the morphology of endotoxin-activated rat peritoneal macrophages. *Histol histopatholol.* 18: 55-65. 2003.
- [38] Belowski, D.; Kowalski, J.; Madej, A.; Herman, ZS. Influence of antidepressant drugs on macrophage cytotoxic activity in rats. *Pol. J. Pharmacol.* 56: 837-842. 2004.
- [39] Ferreira-e-Silva, WT.; Galvão, BA.; Ferraz-Pereira, KN.; de-Castro, CB.; Manhães-de-Castro, R. Perinatal Malnutrition Programs Sustained Alterations in Nitric Oxide Released by

Activated Macrophages in Response to Fluoxetine in Adult Rats. *Neuroimmunomodulation*. 16:219-227. 2009.

Figure legends

Figure 1 (A,B,C,D): Nitric oxide production in culture supernatant of RAW 264.7 macrophages and its corresponding percentage under the influence of different concentrations of FLX (A, B); Cellular viability and its corresponding percentage of RAW 264.7 macrophages under the influence of different concentrations of FLX (C, D). (*) Indicates statistical difference, $P < 0,05$ (One way ANOVA followed by Dunnett's) compared with the control.

Figure 2 (A,B,C,D): Nitric oxide production in culture supernatant of RAW 264.7 macrophages and its corresponding percentage under the influence of different concentrations of ESC (A, B); Cellular viability and its corresponding percentage of RAW 264.7 macrophages under the influence of different concentrations of ESC (C, D). (*) Indicates statistical difference, $P < 0,05$ (One way ANOVA followed by Dunnett's) compared with the control.

Figure 3 (A,B,C,D): Nitric oxide production in culture supernatant of RAW 264.7 macrophages and its corresponding percentage under the influence of different concentrations of PRX (A, B); Cellular viability and its corresponding percentage of RAW 264.7 macrophages under the influence of different concentrations of PRX (C, D). (*) Indicates statistical difference, $P < 0,05$ (One way ANOVA followed by Dunnett's) compared with the control.

Figure 4 (A,B,C,D): Nitric oxide production in culture supernatant of RAW 264.7 macrophages and its corresponding percentage under the influence of different concentrations of TNP (A, B); Cellular viability and its corresponding percentage of RAW 264.7 macrophages under the influence of different concentrations of TNP (C, D). (*) Indicates statistical difference, $P < 0,05$ (One way ANOVA followed by Dunnett's) compared with the control.

Figure 5 (A,B,C,D): Nitric oxide production in culture supernatant of RAW 264.7 macrophages and its corresponding percentage under the influence of different concentrations of CP-93,129 (A, B); Cellular viability and its corresponding percentage of RAW 264.7 macrophages under the influence of different concentrations of CP-93,129 (C, D). (*) Indicates statistical difference, $P < 0,05$ (One way ANOVA followed by Dunnett's) compared with the control.

Figure 6 (A,B,C,D): Nitric oxide production in culture supernatant of RAW 264.7 macrophages and its corresponding percentage under the influence of different concentrations of TRF (A, B); Cellular viability and its corresponding percentage of RAW 264.7 macrophages under the influence of different concentrations of TRF (C, D). (*) Indicates statistical difference, $P < 0,05$ (One way ANOVA followed by Dunnett's) compared with the control.

Figure 1 (A,B,C,D) :Nitric oxide production and cellular viability of RAW 264.7 macrophages influenced by Fluoxetine

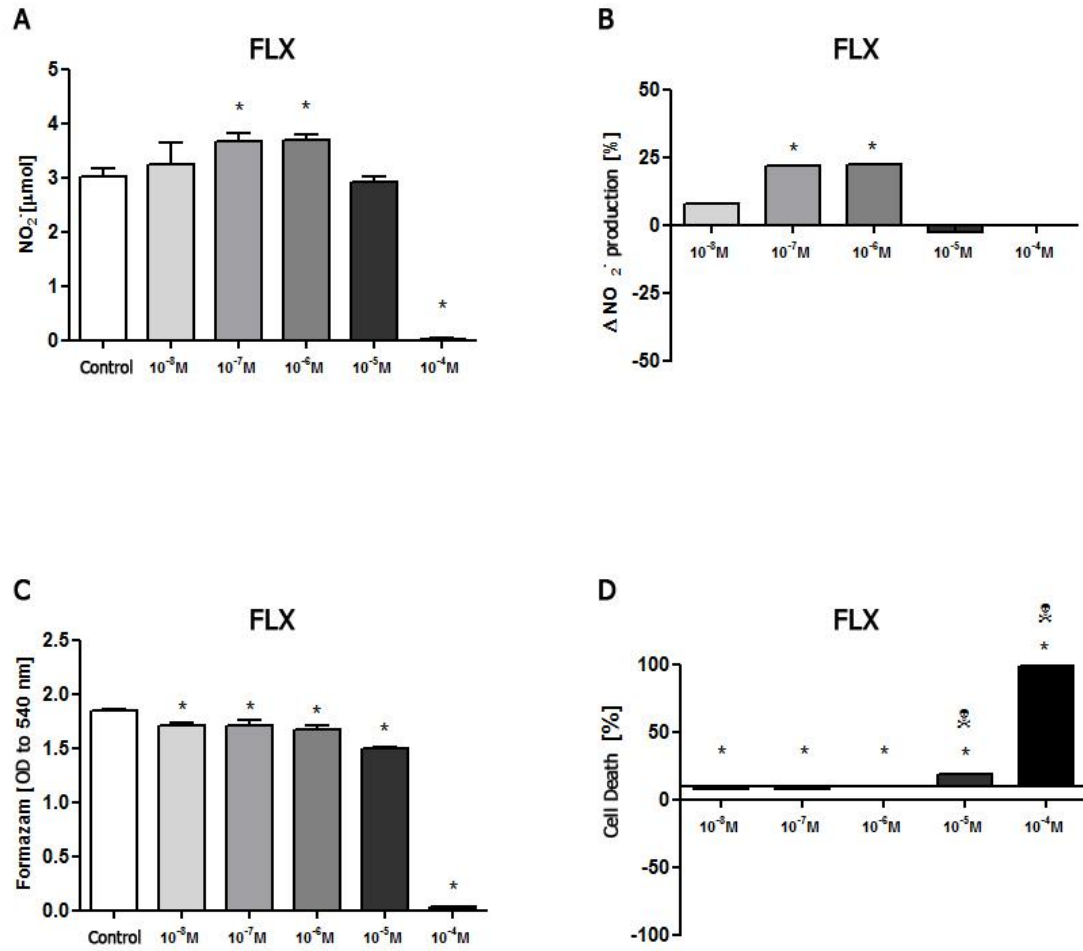


Figure 2 (A,B,C,D) :Nitric oxide production and cellular viability of RAW 264.7 macrophages influenced by Escitalopram

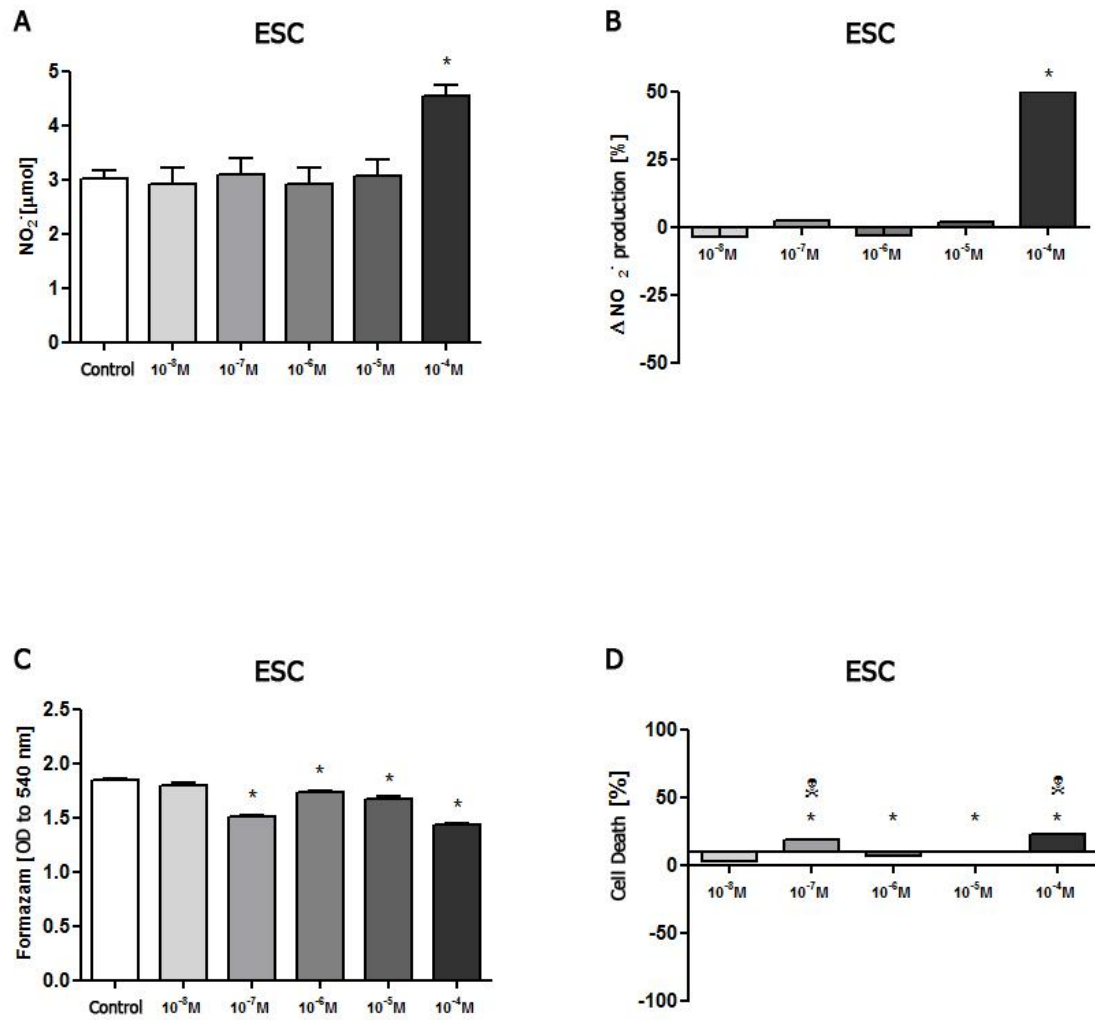


Figure 3 (A,B,C,D) :Nitric oxide production and cellular viability of RAW 264.7 macrophages influenced by Paroxetine

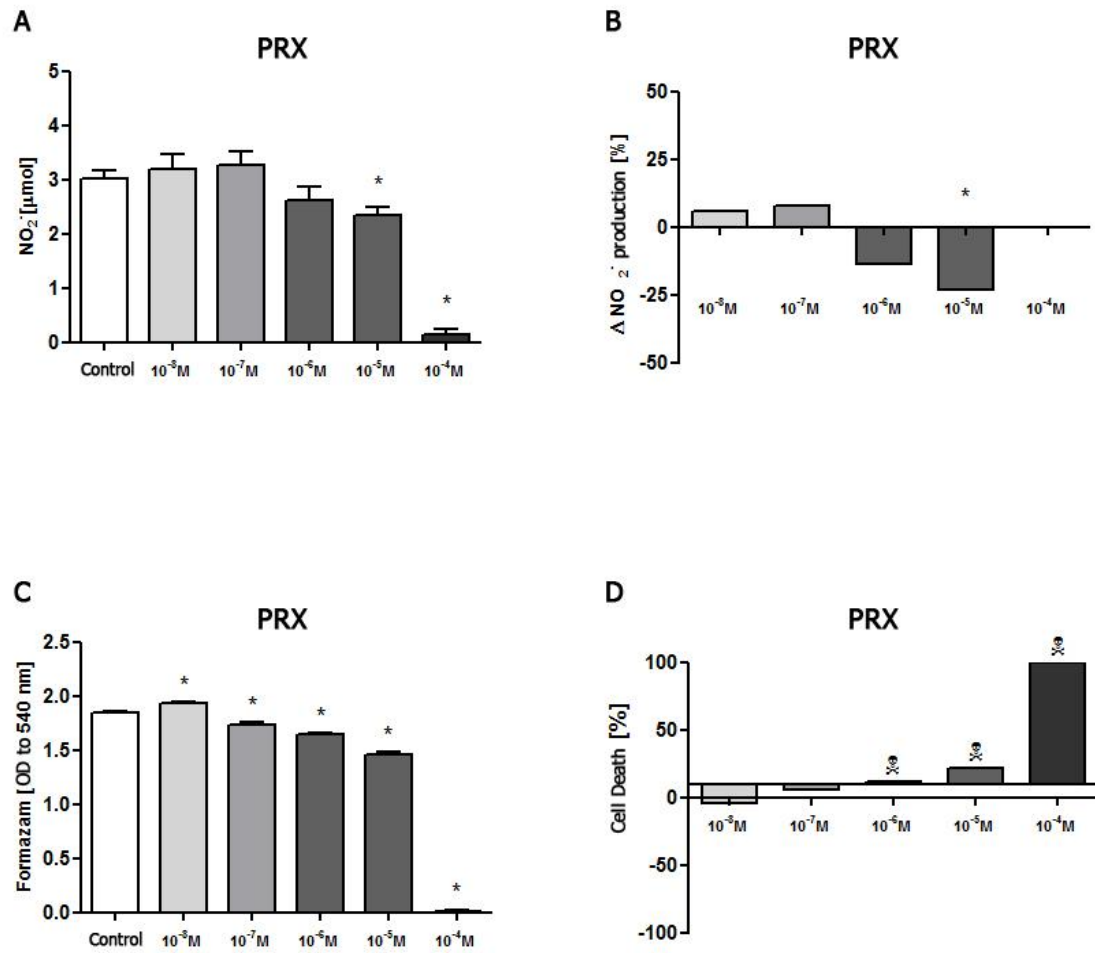


Figure 4 (A,B,C,D) :Nitric oxide production and cellular viability of RAW 264.7 macrophages influenced by Tianeptide

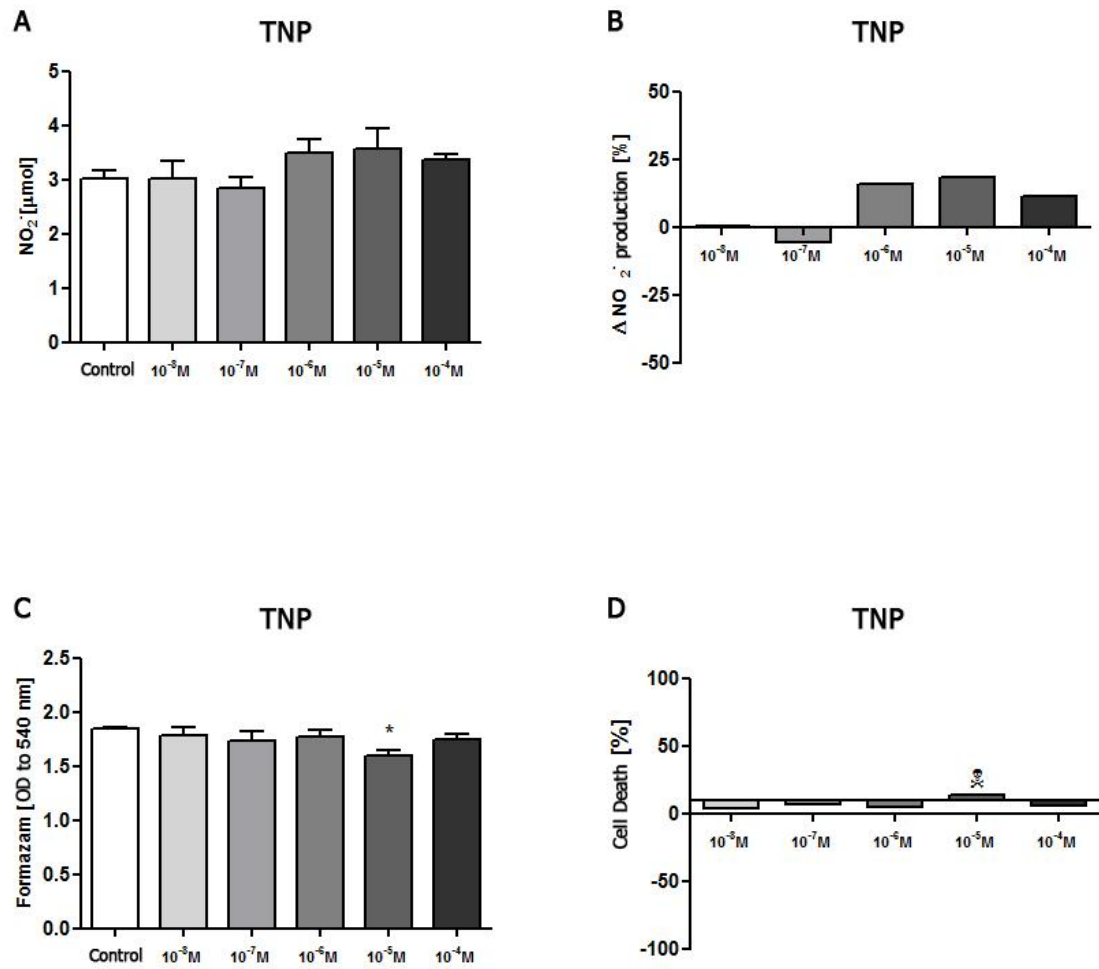


Figure 5 (A,B,C,D) :Nitric oxide production and cellular viability of RAW 264.7 macrophages influenced by CP-93,129

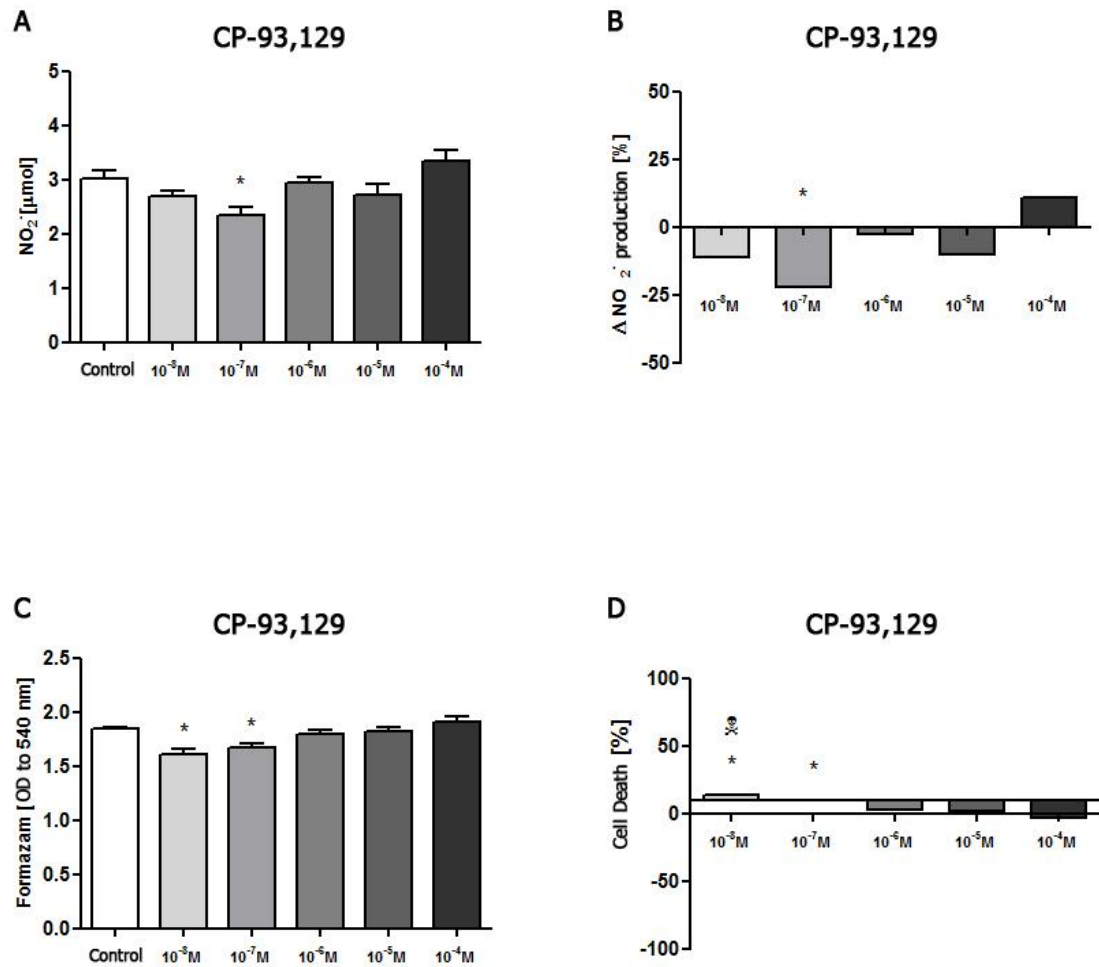
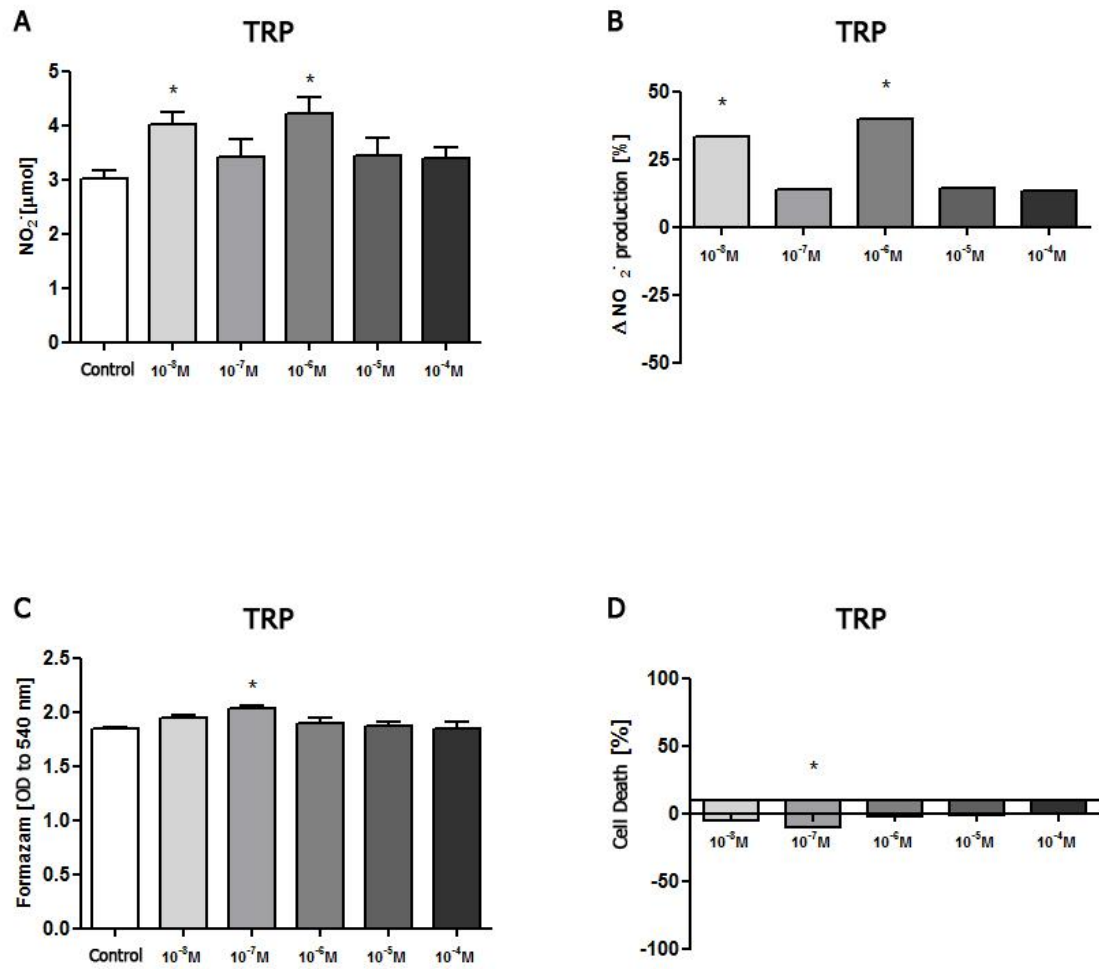


Figure 6 (A,B,C,D) :Nitric oxide production and cellular viability of RAW 264.7 macrophages influenced by Tryptophan



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A serotonina tem influências sobre a função do macrófago, provavelmente, mediadas por componentes serotoninérgicos (receptores serotoninérgicos e transportadores de serotonina) presentes nesta célula.

Nossos estudos indicam que os inibidores seletivos da recaptação da serotonina alteram a função do macrófago, representados pela produção de óxido nítrico. Essa influência exercida não demonstra um padrão específico. Os resultados do presente trabalho indicam que ISRS ora estimulam, ora deprimem a PNO por macrófagos, independente da dose.

O agonista do receptor 5-HT_{1B} teve influência na PNO, mostrando um importante papel deste receptor no efeito imunomodulatório da serotonina. O aminoácido precursor da 5-HT triptofano se mostrou um importante agente influenciador da função do macrófago.

O entendimento acerca da relação macrófago/serotonina proporcionará subsídios para o entendimento mais amplo acerca dos complexos processos da imunidade e de que maneira o uso de substâncias serotoninérgicas, como por exemplo drogas antidepressivas e/ou suplemento nutricional com alimentos fonte do aminoácido precursor (triptofano), afetará a resposta imune.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. *Imunologia Celular e Molecular*. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- ABCAM. <http://www.abcam.com/RAW-264-7-Mouse-leukaemic-monocytemacrophage-cell-line-Whole-Cell-Lysate-ab7187.html> - Disponível em 20/11/2012. acessado às 13:42h.
- ABELSON, H.T.; RABSTEIN, L.S. *Lymphosarcoma: Virus-induced Thymic independent Disease in Mice*. Cancer Research, Philadelphia. 30: 2213-2222. 1970.
- ADER, R.N.; COHEN, et al. *Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system*. Lancet .345: 99-103. 1995.
- ALBERTS, B.; et al. *Fundamentos da biologia celular*. Porto Alegre: Artmed. 866 p. 2006.
- ALEXANDER, S.P.H.; MATHIE, A.; PETERS, J.A. *Guide to Receptors and Channels*, 2^a ed. Br J Pharmacol. 150(1): 1–168. 2007.
- BARNES, N.M.; GORDON, J. *Harnessing serotonergic and dopaminergic pathways for lymphoma therapy: evidence and aspirations*. Semin Cancer Biol.18:218–225. 2008.
- BELOWSKI, D.; KOWALSKI, J.; MADEJ, A.; HERMAN, Z.S. *Influence of antidepressant drugs on macrophage cytotoxic activity in rats*. Pol. J. Phamacol. 56: 837-842. 2004.
- BICALHO, M.A.; PIMENTA, G.J.; NEVES, F.S.; CORREA, H.; DE MORAES, E.N.; DE MARCO, L.; ROMANOSILVA, M.A. *Genotyping of G1463A (Arg441His) TPH2 polymorphism in a geriatric population of patients with major depression*. Molecular Psychiatry 11:799-800. 2006
- BOGDAN, C. *Nitric Oxide and the immune response*. Nature Immunology. 2(10):907-916, 2001.
- BRASILEIRO FILHO, G. *Bogliolo Patologia*. 4^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

CLOEZ-TAYARANI, I.; PETIT-BERTRON, A.F.; VENTERS, H.D.; CAVAILLON, J.M. *Differential effect of serotonin on cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells: involvement of 5-hydroxytryptamine_{2A} receptors*. International immunology. 15(2): 233-240. 2003.

CLOEZ-TAYARANI, I.;CHANGEUX, J.P. *Nicotine and serotonin in immune regulation and inflammatory processes: a perspective*. J Leukoc Biol. 81: 599-606. 2007.

COOPER, G.M.; HAUSMAN, R.E. *A célula - uma abordagem molecular*. Porto Alegre: Artmed. 736 p. 2007.

DELVES, P.J.; ROITT, T.I.M. *The immune system. First of two parts*. N Engl J Med. 343:37-49. 2000.

DIKSIC, M.; YOUNG, S.N. *Study of the brain serotonergic system with labeled alpha-methyl-L-tryptophan*. J Neurochem. 78:1185–1200. 2001.

DURK, T.; PANTHER, E.; MULLER, T.; SORICHTER, S.; FERRARI, D.; PIZZIRANI, C. et al. *5-Hydroxytryptamine modulates cytokine and chemokine production in LPS-primed human monocytes via stimulation of different 5-HTR subtypes*. Int Immunol. 17: 599–606. 2005.

ESSMANN, W.B. *Serotonin distribution in tissue and fluids*. In W. B. Essmann editor. *Serotonin in health and disease*. New York: Spectrum. Vol.1. 1978.

FERREIRA-E-SILVA, W.T.; GALVÃO, B.A.; FERRAZ-PEREIRA, K.N.; DE-CASTRO, C.B.; MANHÃES-DE-CASTRO, R. *Perinatal Malnutrition Programs Sustained Alterations in Nitric Oxide Released by Activated Macrophages in Response to Fluoxetine in Adult Rats*. Neuroimmunomodulation. 16:219-227. 2009.

FINOCCHIARO, L. M. E.; ARZT, E. S.; FERNANDEZ-CASTELO, S. et al. *Serotonin and melatonin synthesis in peripheral blood mononuclear cells: Stimulation by interferon-gamma as part of an immunomodulatory pathway*. Journal of Interferon Research. 8: 705-16. 1988.

FRAMPTON, I.; WATKINS, B.; GORDON, I.; LASK, B. *Do abnormalities in regional cerebral blood flow in anorexia nervosa resolve after weight restoration?* Eur Eat Disord Rev. 19:55-8. 2011.

FRANK, M.G.; JOHNSON, D.R.; HENDRICKS, S.E.; FRANK, J.L. *Monocyte 5-HT_{1A} receptors mediate pindolol suppression of natural killer cell activity: modulation by catalase*. *Int Immunopharmacol.* 1: 247–253. 2001.

FREIRE-GARABAL, M.; NUNEZ, M.; BALBOA, J.; LOPEZ-DELGADO, P.; GALLEGU, R.; GARCIA-CABALLERO, T.; FERNÁNDEZ-ROEL, M.D.; BRENLLA, J.; REY-MENDEZ, M. *Serotonin upregulates the activity of phagocytosis through 5-HT_{1A} receptors*. *Br J Pharmacol.* 139: 457–463. 2003.

FRAZER, A.; HENSCHER, J. *Serotonin. Basic neurochemistry: molecular, celular and medical aspects* In: SIEGEL, G.J.; AGRANOFF, B.W.; ALBERTS, R.W.; FISCHER, S.K.; UHLER, M.D. editors. 6ª edição. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, cap. 13, 263-291. 1999.

GELLER, D.A.; LOWENSTEIN, C.J.; SHAPIRO, R.A.; NUSSLER, A.K.; DI, S.M.; WANG, S.C.; NAKAYAMA, D.K.; SIMMONS, R.L.; SNYDER, S.H.; BILLIAR, T.R. *Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 3491-3495. 1993.

GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1987.

GOODNICK, P.J.; GOLDSTEIN, B.J. *Selective serotonin reuptake inhibitors in affective disorders – I: Basic pharmacology*. *J Psychopharmacol.* 12(3 suppl B): S3-S20. 1998.

GORDON, J.; BARNES, N.M. *Lymphocytes transport serotonin and dopamine: agony or ecstasy?* *Trends Immunol.* 24: 438–443. 2003

HASKÓ, G.; SZABÓ, C.; NÉMETH, Z.H.; KVETAN, V.; PASTORES, S.M.; VIZI, E.S. *Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF- α , and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice*. *The Journal of Immunology.* 157(10): 4634-4640. 1996.

HOFF, C. *Immoral and moral uses of animals*. *New Eng. J. Med.* 302: 115-118, 1980.

HOMO-DELARCHE F.; DARDENNE M. *The neuroendocrine-immune axis*. *Springer Semin Immunopathol.* 14 Suppl 3:221-38. 1993

JAFFRE, F.; BONNIN, P.; CALLEBERT, J.; DEBBABI, H.; SETOLA, V.; DOLY, S.; MONASSIER, L.; METTAUER, B.; BLAXALL, B.C.; LAUNAY, J.M.; MAROTEAUX, L.

Serotonin and angiotensin receptors in cardiac fibroblasts coregulate adrenergic- dependent cardiac hypertrophy. Circ Res. 104: 113–123. 2009.

JANEWAY, JR.; CHARLES, A. *Imunologia: o sistema imunobiológico na saúde e na doença.* 2ª Ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

KATZUNG, B.G.; JULIUS, D.J. *Histamina, serotonina e os alcalóides do esporão do centeio.* In: KATZUNG, B.G. editor. *Farmacologia Básica & Clínica.* 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 233-256. 2002.

KLIMP, A.H.; DE VRIES, E.G.; SCHERPHOF, G.L.; DAEMEN, T. *A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer.* Critical Reviews in Oncology/Hematology. 44: 143-161. 2002.

KONDOMERKOS, D.J.; KALAMIDAS, S.A.; KOTULAS, O.B. *In vitro effects of hormones and autacoids on the hydrogen peroxide production and the morphology of endotoxin-activated rat peritoneal macrophages.* Histol histopathol. 18: 55-65. 2003.

KONTUREK, S.K.; KONTUREK, P.C. *Role of nitric oxid in the digestive system.* Digestion. 56: 1-13. 1995.

KRISHNATRY, A.S.; BRAZEAU, D.A.; FUNG, H. *Broad regulation of matrix and adhesion molecules in THP-1 human macrophages by nitroglycerin.* Nitric Oxide, Orlando, In press: doi:10.1016/j.niox.2009.10.004, 2009.

LANCASTER, J. R. *Nitric oxide in cells.* American Scientist. 80: 248-259. 1992.

LEE, H.H.; LEE, J.S.; CHO, J.Y.; KIM, Y.E.; HONG, E.K. *Study on immunostimulating activity of macrophage treated with purified polysaccharides from liquid culture and fruiting body of *Lentinus edodes*.* J. Microbiol. Biotechnol. 19: 566-572. 2009.

LESCH, K.P. *Gene-environment interaction and genetics of depression.* Rev Psychiatr Neurosci. 29: 174-184. 2004.

LORENZI, T.F. *Manual de Hematologia: Propedêutica e Clínica.* 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-koogan, 2006.

MARSHALL, H. E.; MERCHANT, K.; et al. *Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression.* Faseb J, v.14,n.13, Oct, p.1889-900. 2000.

MARTINEZ, F.O.; HELMING, L.; GORDON, S. *Alternative activation of macrophage: an immunologic functional perspective*. The Annual Review of Immunology, Palo Alto. 27: 451-483. 2009.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. *Innate immune recognition: Mechanisms and pathways*. Immunol. Rev.173: 89-97. 2000.

MORANT, A.; MULAS, F.; HERNANDEZ, S. *Bases neurobiológicas do autismo*. Rev Neuro Clin. 2:163-171. 2001.

MOSSNER, R.; LESCH, K.P. *Role of serotonin in the immune system and neuroimmune interactions*. Brain Behav Immun. 12: 249-271. 1998.

MOTE, J.D.; LÓPEZ, R.F.E.; MEZA, S.D.; ROJAS, G.S.; CASTRO, V.E.L.E.; CHÁVEZ, J.M.; GARFIAS, J.A.B. *Óxido nítrico: metabolismo e implicaciones clínicas*. Med Int Mex. 24(6):397-406. 2008.

MURPHY, D.L.; LERNER, A.; RUDNICK, G.; LESCH, K.P. *Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics*. Molecular Interventions. 4: 109-123. 2004.

NANNMARK, U.; SENNERBY, L.; BJURSTEN, L.M. ; SKOLNIK, G. ; BAGGE, U. *Inhibition of leukocyte phagocytosis by serotonin and its possible role in tumor cell destruction*. Cancer Lett. 62(1): 83-86. 1992.

NISHIDA, A.; HISAOKA, K.; ZENSHO, H.; UCHITOMI, Y.; MORINOBU, S.; YAMAWAKI, S. *Antidepressant drugs and cytokines in mood disorders*. Int Immunopharmacol. 2(12):1619-26. 2002.

NOGUEIRA, M.I.; TAKASE, L.F.; LOPES, S.; MASCARO, M.B.; MANHAES-DE-CASTRO, R. *Serotonina. A trajetória evolutiva de uma molécula de ampla ação trófica e neurológica*. Ciência Hoje. 202(34): 30-5. 2004.

NOVELINO, A.; CHIAPPALONE, M.; VATO, A.; BOVE, M.; TEDESCO, M.B.; MARTIONIA, S. *Behaviors from an electrically stimulated spinal cord neuronal network cultured on microelectrode arrays*. Neurocomputing. 52: 661-669. 2003.

PARSLOW, T.G. *Imunologia médica*. 10ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

PASSOS, R.B.F.; LOPEZ, J.R.R.A. *Síndrome de Gilles de la Tourette associada ao transtorno de déficit de atenção com hiperatividade: resposta clínica satisfatória a inibidor seletivo da recaptura de serotonina e metilfenidato*. J. bras. psiquiatr. [online]. 59(2): 160-162. 2010.

PEKMAN, M.; VERGANI, D. *Imunologia Básica e clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

PEREIRA JUNIOR, G.A.; MARSON, F.; ABEID, M.; OSTINI, F.M.; SOUZA, S.M.; BASILEIRO FILHO, A. *Pathogenetic mechanisms of sepsis and their therapeutics implications*. Medicina, Ribeirão Preto. 31: 349-362. 1998.

POLLOCK JS, FÖRSTERMANN U, MITCHELL JA, WARNER TD, SCHMIDT HHHW, NAKANE M, MURAD F. *Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and natively bovine aortic endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci. 88: 10480-10484. 1991.

QIN, J.J.; ZHU, J.X.; ZENG, Q.; CHENG, X.R.; ZHANG, S.D.; JIN, H.Z.; ZHANG, W.D. *Sesquiterpene lactones from Inula hupehensis inhibit nitric oxide production in RAW264.7 macrophages*. Planta Med. 78(10):1002-9. 2012.

RAMAMOORTHY, L.; TIZARD, I.R. *Induction of apoptosis in a macrophage cell line RAW 264.7 by acemannan, a beta-(1,4)-acetylated mannan*. Mol Pharmacol. 53(3): 415-421. 1998.

RASCHKE, W.C.; BAIRD, S.; RALPH, P.; NAKOINZ, I. *Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus*. Cell, Cambridge. 15: 261-7. 1978.

RITTER, M.; EL-NOUR, H.; HEDBLAD, M.A.; BUTTERFIELD, J.H.; BECK, O.; STEPHANSON, N.; HOLST, M.; GISCOMBE, R.; AZMITIA, E.C.; NORDLIND, K. *Serotonin and its 5-HT₁ receptor in human mastocytosis*. Immunopharmacol Immunotoxicol. 34(4): 679-685. 2012.

ROBBINS & COTRAN. *Patologia: Bases patológicas das doenças*. São Paulo: Elsevier. 2006

ROSS, J.A.; AUGER, M.J. *The biology of the macrophage*. In: Burke, B.; Lewis, C.E. editors. The Macrophage. Oxford University Press, Oxford, UK. p. 1-72. 2002

SCHMIDT, H.H.H.W.; POLLOCK, J.S.; NAKANA, M.; GORSKY, L.D.; FÖRSTERMANN, U.; MURAD, F. *Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase*. Proc Natl Acad Sci USA. 88: 365-369. 1991.
SCHULENBURG, H.; KURZ, C.L.; EWBANK, J.J. *Evolution of the innate immune system: the worm perspective*. Immunol Rev. 2004; 198:36-58.

SIBILLE, E.; LEWIS, D.A. *SERT-only involved in depression, but when?* Am J Psychiatry. 163: 8-11. 2006.

SILVA, P. *Farmacologia*. 6^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

STAHL, S.M. *Psychopharmacology of antidepressants*. London: Martin Dunitz. 114p. 1997.

STUEHR, D.J.; CHO, H.J.; KWON, N.S.; WEISE, M.F.; NATHAN, C.F. *Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein*. Proc Natl Acad Sci USA. 88: 7773-7777. 1991.

TENG, B.; MURTHY, K.S.; KUEMMERLE, J.F.; GRIDER, J.R.; SASE, K.; MICHEL, T.; MAKHLOUF, G.M. *Expression of endothelial nitric oxide synthase in human and rabbit gastrointestinal smooth muscle cells*. Am J Physiol. 275: G342-351. 1998.

THOA, N.B.; ECCLESTON, D.; AXELROD, J. *The accumulation of C14-serotonin in the guinea-pig vas deferens*. J Pharmacol Exp Ther. 169 Suppl 1:68-73. 1969.

TSUCHIDA, Y.; HATAO, F.; FUJISAWA, M.; MURATA, T.; KAMINISHI, M.; SETO, Y.; HORI, M.; OZAKI, H. *Neuronal Stimulation with 5-Hydroxytryptamine 4 Receptor Induces Anti-Inflammatory Actions via α_7 nACh Receptors on Muscularis Macrophages Associated with Postoperative Ileus Gut*. 5(60): 638-647. 2011.

VANHOUTTE, P.M. *Endothelial control of vasomotor function - From health to coronary disease*. Circ J. 67: 572-5. 2003.

WANG, Y.; MARDSEN, P.A. *Nitric oxide synthases: Biochemical and molecular regulation*. Curr Opin Nephrol Hypert. 4: 12-22. 1995.

WANG, J.; MAZZA, G. *Inhibitory Effects of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on Nitric Oxide Production in LPS/IFN- γ -Activated RAW 264.7 Macrophages*. J. Agric. Food Chem. 50 (4): 850-857. 2002.

WATTS, S.W.; DAVIS, R.P. *5-Hydroxytryptamine Receptors in Systemic Hypertension: an arterial focus*. Cardiovasc Ther. 1:54–67. 2010.

YUN, K.J.; KIM, J.Y.; KIM, J.B.; LEE, K.W.; JEONG, S.Y.; PARK, H.J.; JUNG, H.J.; CHO, Y.W.; YUN, K.; LEE, K.T. *Inhibition of LPS-induced NO and PGE2 production by asiatic acid via NF-kappa B inactivation in RAW 264.7 macrophages: possible involvement of the IKK and MAPK pathways*. International Immunopharmacology. 8(3):431-441. 2008.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. *Hematologia: Fundamentos e Práticas*. São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

ANEXO A- Submissão do artigo original para a revista Neuroimmunomodulation

Neuroimmunomodulation Submission Received



nim@karger.com (nim@karger.com) [Adicionar aos contatos](#) 20:49 ▶

Para: joaoricardocamarotti@hotmail.com ✉

Dear Mr. João Camaroti:

Thank you for submitting your manuscript entitled "Evaluation of the effect of serotogenic substances on nitric oxide production by RAW 264.7 macrophages " to "Neuroimmunomodulation"; the submission number is: 1517. Your submission will now be checked by the editorial office, and you will receive a confirmation mail from the editorial office soon. This step will also activate your personal user-id and password, enabling you to login to the system to check the status of your manuscript.

~~If you have any queries, please send an email to: nim@karger.com~~

© 2013 Microsoft Termos Privacidade Desenvolvedores Português (Brasil)