



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO BIOMÉDICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR

BRUNA SOUZA TEIXEIRA

**Análise *in vitro* do impacto do uso de inibidores seletivos
de recaptção de serotonina na função de neutrófilos
humanos contra *Candida albicans***

RIO DE JANEIRO

2018

Bruna Souza Teixeira

Análise *in vitro* do impacto do uso de inibidores seletivos de recaptção de serotonina na função de neutrófilos humanos contra *Candida albicans*

Trabalho de dissertação, desenvolvido no Laboratório de Imunidade Inata-LIMIN, apresentado junto ao curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, na área de concentração de Imunologia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Dr^a. Vera Carolina Bordallo Bittencourt

Rio de Janeiro

2018

TEIXEIRA, Bruna Souza

Análise *in vitro* do impacto do uso de inibidores seletivos de recaptção de serotonina na função de neutrófilos humanos contra *Candida albicans*/ Bruna Souza Teixeira – Rio de Janeiro, 2018. p 79.

Trabalho de Dissertação – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Instituto Biomédico, 2018.

Orientadora: Dr^a. Vera Carolina Bordallo Bittencourt.

1. Serotonina 2. Neutrófilo 3. *Candida albicans*
I. Mestre

Análise *in vitro* do impacto do uso de inibidores seletivos de recaptação de serotonina na função de neutrófilos humanos contra *Candida albicans*

Autora: *Bruna Souza Teixeira*

Trabalho de Dissertação, desenvolvido no Laboratório de Imunidade Inata-LIMIN, apresentado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, na área de concentração de Imunologia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dr^a. Vera Carolina Bordallo Bittencourt

Banca Examinadora:

Dr^a. Tatiana Almeida Pádua (FIOCRUZ)

Dr^a. Landi Veivi Guillermo Costilla (UNIRIO)

Dr. Cassiano Felipe Gonçalves de Albuquerque (UNIRIO)

Dr^a. Mariana Conceição de Souza (FIOCRUZ)

Dr. Rafael Braga Gonçalves (UNIRIO)

Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha mãe, Guilhermina, e minha irmã, Kátia, sem as quais nada disso poderia ter acontecido. Também a minha orientadora, Vera, que brigou com metade da UNIRIO: “Ela vai fazer mestrado sim e se reclamar ela faz 2!”

Agradecimentos

À Minie, Simon e ao Benji (*in memoriam*) pelos anos do mais puro e verdadeiro amor incondicional. Ao Jake e à Ronda, por trazerem novamente aquela vontade de chegar logo em casa no final do dia.

À minha mãe, Guilhermina, por todo o suporte para que eu pudesse me dedicar aos estudos. Viu mãe? Estou indo pro doutorado já! Quase cientista igual você queria.

À minha “irmã”, Kátia, pelo apoio em qualquer situação, pela torcida, incentivo e todos os sacrifícios que fez para que eu pudesse me dedicar aos estudos.

A minha irmã, Ana, que não entende nada do que eu estudo, mas acha tudo muito bonitinho e apoia assim mesmo.

A todos os doutores e doutoras que aceitaram prontamente em integrar a minha banca examinadora, mesmo na correria de descobrir ter menos de um mês para defesa. Obrigada por cederem o tempo de vocês tão gentilmente e se disporem a contribuir para a minha formação.

À professora Landi, pelo incentivo, pelas discussões científicas e por acreditar no meu potencial até quando eu não estava confiando muito nele.

Ao professor Rafael, por sempre estar pronto para ajudar no que for necessário. Obrigada também pela torcida e incentivo.

Ao professor André pelo apoio nesse projeto e por estar sempre pronto a ajudar no que for necessário.

À professora Livia, pelas conversas sobre o cenário profissional, pela torcida e incentivo e pela consultoria em alguns experimentos, com direito a doação de reagentes.

À Dr^a Mariana, por todo o plástico que nem eu mesma daria conta de acabar, pelas conversas sobre ciência e a profissão. Por me aceitar como aluna de doutorado e principalmente por todo apoio, 24/7, durante o processo seletivo.

À Dr^a Tatiana, e ao seu alter ego, Tânia, por me mostrar um mundo novo de pesquisa e me tornar novamente curiosa, por responder minhas mensagens na madrugada, por me mandar almoçar, dormir, descansar... Quando eu estava a louca do experimento/processo seletivo.

Ao Dr. Leonardo, não só por me ajudar no *Western Blotting*, mas por toda paciência em me explicar cada detalhe da técnica.

Às alunas do LIMIR, Laís e Tamires, pela companhia no laboratório, pela amizade e as risadas das desgraças que caíam nas nossas cabeças, pelo apoio e torcida e principalmente por me obrigarem a estudar mais um pouco.

À Rejane, pela amizade e companheirismo em qualquer circunstância, uma verdadeira irmã. Obrigada pela mãozinha na bancada, pelo *delivery* de amostras, pelos cafés, almoços, lanches. Pelas trocas de figurinhas de Jiu Jitsu e Muay Thai. Por me emprestar sua família, suas amigas e suas catorras. Pelas futuras folhinhas em branco de um certo bloquinho, carimbadas e assinadas.

À Aline pelo apoio e torcida mesmo de longe.

À Roni, pelas discussões científicas que acabam no bar.

À Aloma e Amanda, meus presentinhos mais que importantes do PPGBMC, e à Carol e Vanessa, com vocês 4 foi tudo muito mais divertido e interessante, inclusive bioestatística.

A todos que se interessaram pelo estudo, doaram sangue para o projeto e voltaram para saber como estavam os experimentos.

À minha orientadora, professora Vera Carolina, por ter sido todas quem eu precisei no exato momento em que eu precisei. Como acordado entre as partes, na próxima trocamos. Espero um dia ser metade da orientadora que você foi para mim.

À CAPES, CNPq, FAPERJ e UNIRIO pelo apoio financeiro.

Obrigada a Deus por ter colocado essas pessoas na minha vida e a São Pedro e São Jorge por cuidarem do meu caminho.

Epígrafe

"We're never gonna survive, unless...

We get a little crazy"

Seal

RESUMO

A Serotonina (5-HT) é uma monoamina que regula uma série de processos vitais no sistema nervoso central (SNC) e em órgãos periféricos. Embora seja um neurotransmissor, a maior produção de 5-HT no organismo ocorre no intestino, sendo liberada, em seguida, na corrente sanguínea, onde sua maior parte é recaptada por plaquetas e o restante circula livremente. O metabolismo serotoninérgico no SNC envolve a liberação de 5-HT na fenda sináptica e interação com o receptor na célula alvo, sua recaptação do meio extracelular pelo transportador de recaptação de 5-HT (SERT) e posterior degradação pela enzima monoamina oxidase. A desregulação desse metabolismo pode levar a uma série de desordens cujo tratamento é feito com o uso de inibidores seletivos de recaptação de 5-HT (SSRI). Os SSRI inibem a recaptação de 5-HT pelo SERT em todas as células que o expressam, incluindo os neurônios e as plaquetas. Ao inibir a recaptação de 5-HT pelas plaquetas, os SSRI podem aumentar a concentração de 5-HT que circula livremente no plasma e esta então pode interagir com seus receptores expressos em diversas células, incluindo os leucócitos. Essa ação não é considerada um efeito colateral da medicação, contudo esse aumento de 5-HT plasmática pode trazer consequências, especialmente ao sistema imune, dado a sua característica imunomoduladora. Diante desse quadro e considerando o aumento substancial das prescrições de SSRI, são essenciais estudos que avaliem o efeito da 5-HT e do tratamento com estes fármacos na resposta imune dos indivíduos. Alguns estudos já demonstraram os efeitos da 5-HT no sistema imune, incluindo o do nosso grupo que demonstrou que a 5-HT inibe a resposta de neutrófilos de indivíduos saudáveis à *C. albicans*. Dando continuidade a esse trabalho, no presente estudo foi observado que a 5-HT exerce sua inibição nos neutrófilos através do receptor 5-HT₇. Os dados demonstraram ainda que neutrófilos de indivíduos em uso de SSRI não produziram quantidades significativas de espécies reativas de oxigênio (ROS), assim como não formaram armadilhas extracelulares de DNA (NET) sob estímulo de *C. albicans*. Além disso, quando esses neutrófilos são pré-tratados com 5-HT, a resposta à *C. albicans* é ainda mais reduzida, mostrando que essas células ainda têm capacidade responsiva ao neurotransmissor. Quando a atividade dos neutrófilos de indivíduos em tratamento com SSRI foi comparada à dos neutrófilos de indivíduos saudáveis, a produção de ROS, a formação de NET e a atividade candidacida se mostraram significativamente inferiores. Nossos resultados sugerem que o uso de SSRI pode inibir as funções dos neutrófilos, possivelmente pelo aumento de 5-HT plasmática.

Palavras-chave: Serotonina, SSRI, neutrófilo, *Candida albicans*.

Abstract

Serotonin is a monoamine that contributes to regulation of vital functions in the Central Nervous System (CNS) and in peripheral organs. Although it is a neurotransmitter, the highest production of 5-HT in the body occurs in the intestine, and is then released into the bloodstream, where most of it is reuptake by platelets while the rest circulates freely. The serotonergic metabolism in the CNS involves the release of 5-HT in the synaptic cleft, its interaction with the receptor in the target cell, its reuptake of the extracellular medium by the 5-HT reuptake transporter (SERT) and subsequent degradation by the enzyme monoamine oxidase. Deregulation of this metabolism can lead to a number of disorders which are treated with the use of selective 5-HT reuptake inhibitors (SSRI). SSRIs inhibit 5-HT reuptake by SERT in all cells expressing it, including neurons and platelets. By inhibiting 5-HT reuptake by platelets, SSRIs can increase the concentration of 5-HT that circulates freely in plasma and then it can interact with its receptors expressed on several cells, including leukocytes. This action is not considered a side effect of the medication, however this increase of plasma 5-HT can bring consequences, especially to the immune system, given its immunomodulatory characteristic. In view of this and considering the substantial increase in SSRI prescriptions, studies evaluating the effect of 5-HT and the effect of treatment with these drugs on the immune response of individuals are essential. Some studies have already demonstrated the effects of 5-HT on the immune system, including that of our group, which demonstrated that 5-HT inhibited the response to *C. albicans* of healthy individuals neutrophils. In the present study, it was observed that 5-HT exerted its inhibition on neutrophils through the 5-HT₇ receptor. The data also demonstrated that neutrophils from individuals using SSRI did not produce significant amounts of reactive oxygen species (ROS), nor did they form extracellular DNA traps (NETs) under *C. albicans* stimulation. In addition, when these neutrophils were pretreated with 5-HT, the response to *C. albicans* was further reduced, showing that these cells remain responsive to the neurotransmitter. When the activity of neutrophil from subjects receiving SSRI was compared to that of neutrophils from healthy subjects, ROS production, NET formation, and candidacidal activity were significantly lower. Our results suggest that the use of SSRIs may inhibit neutrophil functions, probably by increasing plasma 5-HT.

Key-words: Serotonin, SSRI, neutrophils, *Candida albicans*

Lista de abreviaturas

- 5-HT - 5-hidroxitriptamina
- 5-HT₁₋₇- Receptores da 5-HT
- ADPRc - Adenosina difosfato ribose cíclica
- AMPc - Adenosina monofosfato cíclica
- D.O. - Densidade óptica
- DC - Célula dendrítica (do inglês, *dendritic cell*)
- DHR - 1,2,3 Dihidrorodamina
- ECC- Célula enterocromafim (do inglês, *enterochromaffin cell*)
- IFN- γ - Interferon-gamma
- IL – Interleucina
- IP3 - Inositol trifosfato
- MAO - Monoamina oxidase
- MFI - Intensidade média de fluorescência
- MPO - Mieloperoxidase
- NET - Armadilha extracelular de neutrófilo (do inglês, *Neutrophil extracellular trap*)
- NF- κ B - Fator nuclear kappa B (do inglês, *Nuclear Factor kappa B*)
- NK – Célula *natural killer*
- PBS - Tampão fosfato salino (do inglês, *Phosphate buffer saline*)
- PRR - Receptor de padrão molecular (do inglês, *pattern recognition receptor*)
- QMPA - Questionário de Morbidades Psiquiátricas do Adulto
- Rh - 1,2,3 Rodamina
- ROS - Espécies reativas de oxigênio (do inglês, *Reactive oxygen species*)
- SB- SB269970 Antagonista seletivo do receptor 7 de 5-HT
- SERT - Transportador de recaptção de 5-HT (do inglês, *Serotonin transporter*)
- SFB - Soro fetal bovino
- SNC - Sistema nervoso central
- SSRI - Inibidor seletivo da recaptção de 5-HT (do inglês, *Selective serotonin reuptake inhibitor*)
- TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- TLR - Receptor do tipo toll (do inglês, *Toll Like Receptor*)
- TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *tumor necrosis factor alpha*)
- TPH - Triptofano hidroxilase

UFC - Unidades formadoras de colônias

Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 <u>Serotonina</u>	14
1.1.1 <i>Desregulação do sistema serotoninérgico</i>	16
1.2 <u>Serotonina e o sistema imunológico</u>	20
1.3 <u>Resposta do neutrófilo contra <i>Candida albicans</i></u>	23
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 <u>Objetivo geral</u>	30
3.2 <u>Objetivos específicos</u>	30
4 METODOLOGIA	31
4.1 <u>Micro-organismo e condições de cultivo</u>	31
4.2 <u>Recrutamento de voluntários e análise dos Questionários de Morbidade Psiquiátrica do Adulto</u>	31
4.3 <u>Coleta de amostra e isolamento de neutrófilos</u>	33
4.4 <u>Análise da expressão e atividade de receptores de 5-HT</u>	33
4.4.1 <i>Análise da expressão do 5-HT₇ por Western Blotting</i>	33
4.4.2 <i>Análise da atividade dos receptores 5-HT₄ e 5-HT₇</i>	35
4.4.2.1 Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	35
4.4.2.2 Dosagem da formação de armadilhas extracelulares de neutrófilo.....	35
4.4.2.3 Avaliação da viabilidade da <i>C. albicans</i> após interação com neutrófilos.....	36
4.4.2.4 Avaliação da capacidade candidacida do neutrófilo (ensaio de <i>killing</i>).....	36
4.5 <u>Análise da atividade de neutrófilos de indivíduos em uso de SSRI e do efeito modulador da 5-HT sobre estas células</u>	37
4.6 <u>Análise da modulação de neutrófilos de indivíduos saudáveis por SSRI</u> ...37	
4.7 <u>Análise estatística</u>	38
5 RESULTADOS	39
5.1 <u>Neutrófilos expressam 5-HT₇</u>	39

5.2 <u>SB reverte a atividade inibitória da 5-HT em neutrófilos de indivíduos saudáveis: Determinação da concentração de trabalho</u>	40
5.3 <u>SB reverte a atividade inibitória da 5-HT em neutrófilos de indivíduos saudáveis</u>	41
5.4 <u>Cisaprida não exerce efeito na resposta do neutrófilo contra <i>C. albicans</i></u>	42
5.5 <u>Neutrófilos de indivíduos em tratamento com SSRI não são estimulados à produção de ROS e formação de NET em resposta à <i>C. albicans</i></u>	43
5.6 <u>Neutrófilos de indivíduos em tratamento com SSRI têm menor capacidade responsiva à <i>C. albicans in vitro</i> quando comparados a neutrófilos de indivíduos que não utilizam essa classe de fármaco</u>	45
5.7 <u>SSRIs não alteram a resposta <i>in vitro</i> de neutrófilos de indivíduos saudáveis à <i>C. albicans</i></u>	47
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÃO	56
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
9 ANEXOS	72
<u>ANEXO A - Autorização conselho de ética em pesquisa UNIRIO</u>	72
<u>ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido-TCLE</u>	74
<u>ANEXO C - Questionário de morbidades psiquiátricas do adulto – QMPA</u>	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Serotonina

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é uma monoamina derivada do aminoácido essencial triptofano. Sua síntese é realizada pelos neurônios dos núcleos da Rafe no sistema nervoso central (SNC), local que contem 5% do total de 5-HT do organismo (BERGER; GRAY; ROTH, 2009), onde esse neurotransmissor está atrelado a diversas funções vitais como ciclo sono-vigília, termorregulação (RAY *et al.*, 2011), sensibilidade à dor (SPARKES; SPENCER, 1971), regulação da frequência cardiorrespiratória, manutenção da pressão arterial (RAY *et al.*, 2011; (HODGES; RICHERSON, 2010), apetite, humor, memória (BERGER; GRAY; ROTH, 2009) e comportamento sexual (AHLENIUS; LARSSON; SVENSSON, 1980; MEYERSON; LEWANDER, 1970) (Figura 1). Além da síntese, os neurônios serotoninérgicos detêm a função de manutenção de níveis adequados de 5-HT, para tanto, esses neurônios fazem a recaptção da 5-HT da fenda sináptica através do transportador de recaptção de 5-HT (SERT) e posterior degradação pela enzima monoamina oxidase (MAO) (BERGER; GRAY; ROTH, 2009).

A maior parte da produção de 5-HT, 95%, ocorre no intestino, pelas células enterocromafins, ganhando a corrente sanguínea em seguida. Além disso, a 5-HT produzida periféricamente jamais irá adentrar o SNC, visto que a barreira hemato-encefálica é impermeável à 5-HT, assim como a 5-HT de origem neurológica não circula no plasma sanguíneo (EL-MERAHBI *et al.*, 2015; FIDALGO; IVANOV; WOOD, 2013). Em determinadas situações, outras células periféricas, além das enterocromafins, podem produzir 5-HT, como os osteoclastos, adipócitos, linfócitos T e células β -pancreáticas (AHERN, 2011; EL-MERAHBI *et al.*, 2015). Por outro lado, plaquetas e algumas células, como basófilos e mastócitos, apenas têm a capacidade de estocar a 5-HT proveniente do intestino, cabendo às plaquetas a maior capacidade de estoque de 5-HT plasmática do organismo, transportando assim a 5-HT pelo plasma. A entrada da 5-HT plasmática nas plaquetas ocorre ativamente através do SERT, da mesma forma que a 5-HT neurológica é captada

pelos neurônios serotoninérgicos (DE VERNEJOU; COLLET; CHABBI-ACHENGLI, 2012; EL-MERAHBI *et al.*, 2015).

A circulação de 5-HT no plasma amplia suas funções como neurotransmissor, podendo ser considerada um hormônio periférico devido a sua vasta influência, atuando, como exemplo, no controle do peristaltismo intestinal, da contratilidade vascular (MARSTON; GARFIELD; HEISLER, 2011), do metabolismo ósseo (DE VERNEJOU; COLLET; CHABBI-ACHENGLI, 2012; YADAV *et al.*, 2010), da homeostase de glicose e lipídeos (SUMARA *et al.*, 2012; WATANABE *et al.*, 2010) e, de acordo com o que vem sendo apontado por diversos estudos, a 5-HT desempenha ainda um papel modulador do sistema imune (DUERSCHMIED *et al.*, 2013; JANČINOVÁ *et al.*, 2003; NANNMARKA; SENNERBYA, 1992) (**Figura 1**).

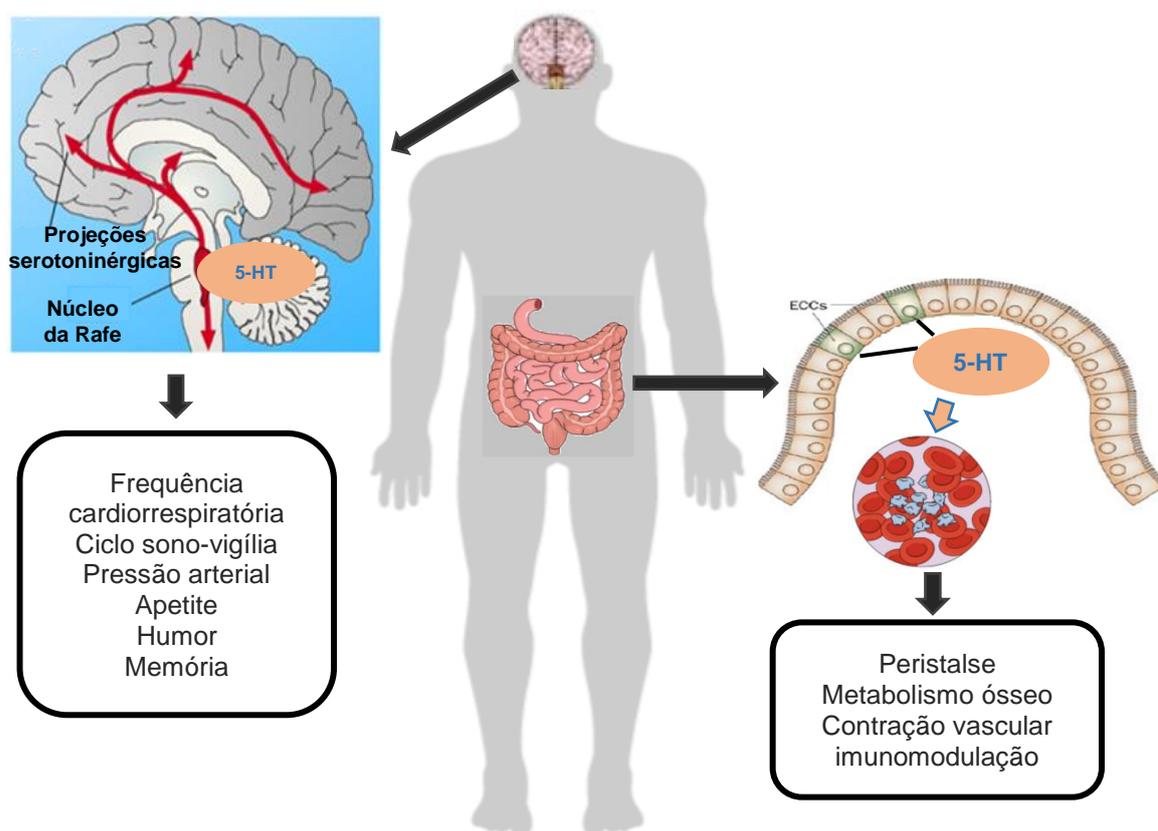


Figura 1: Atuação da 5-HT no SNC e na periferia. Elaborada em mindthegraph.com. Serotonina (5-HT), Células enterocromafins (ECC).

Essa grande gama de efeitos serotoninérgicos, tanto no SNC como em sistemas periféricos, está relacionada com a variedade de receptores para a 5-HT.

Os receptores foram agrupados em sete famílias (5-HT₁₋₇) que ainda foram divididas em 14 subtipos, sendo todos eles acoplados a proteína G, exceto o 5-HT₃, um receptor do tipo canal iônico regulado por ligante (HOYER *et al.*, 1994; HUMPHREY; HARTIG; HOYER, 1993). Na **tabela 1** é possível observar o tipo de receptor, seu mecanismo de sinalização intracelular e as células que o expressam.

Tabela 1: Receptores serotoninérgicos, vias de sinalização e expressão celular

Tipo de receptor	Mecanismo de sinalização	Expressão celular
5-HT ₁	Redução nos níveis de AMPc	Neurônios ^{3,8} , enterócitos ⁵ , osteoclastos ^{2,4} , osteoblastos ^{2,4} , mastócitos ¹ , macrófagos ¹ , DC ¹ , NK ¹ , linfócitos T e B ¹
5-HT ₂	Ativação da Fosfolipase C com aumento dos níveis de IP3 e Ca ²⁺	Neurônios ^{3,8} , osteoclastos ^{2,4} , osteoblastos ^{2,4} , adipócitos ² , enterócitos ^{5,7} , hepatócitos ² , macrófagos ¹ , DC ¹ , eosinófilos ¹ , células β-pancreáticas ² , linfócitos T e B ¹
5-HT ₃	Aumento do influxo de Ca ²⁺	Neurônios ³ , adipócitos ² , enterócitos ^{10,9} , macrófagos ¹ , DC ¹ , células β-pancreáticas ² , linfócitos T e B ¹
5-HT ₄	Aumento nos níveis de AMPc	Neurônios ^{3,11} , cardiomiócitos ^{2,6} , enterócitos ^{5,11} , macrófagos ¹ e DC ¹
5-HT ₅	Redução da ADPRc	Neurônios ³
5-HT ₆	Aumento nos níveis de AMPc	Neurônios ³
5-HT ₇	Aumento nos níveis de AMPc	Neurônios ³ , enterócitos ⁵ , DC ¹ , macrófagos ¹ , linfócitos T ^{1,3} e B ¹

Adenosina monofosfato cíclica (AMPc), célula dendrítica (DC), célula *natural killer* (NK), inositol trifosfato (IP3), adenosina difosfato ribose cíclica (ADPRc). (1)BAGANZ; BLAKELY, 2013; (2) BERGER; GRAY; ROTH, 2009; (3)DARMON *et al.*, 2015; (4)DE VERNEJOU; COLLET; CHABBI-ACHENGLI, 2012; (5)DICKSON; HEREDIA; SMITH, 2010; (6)EL-MERAHBI *et al.*, 2015; (7)FIORICA-HOWELLS *et al.*, 2002; (8)HALE; SHEKHAR; LOWRY, 2012; (9)KATO, 2013; (10)LIU *et al.*, 2011, (11)2005).

1.1.1 Desregulação do sistema serotoninérgico

A manutenção do tônus serotoninérgico envolve a disponibilidade de níveis adequados de triptofano e regulação da síntese de 5-HT, a liberação de 5-HT no meio extracelular, interação com seus receptores e ativação de via de sinalização na célula alvo e, envolve ainda, a recaptação da 5-HT livre do meio

extracelular através do SERT e sua posterior degradação pela MAO ou estocagem em vesículas citoplasmáticas (FIDALGO; IVANOV; WOOD, 2013). (Figura 2)

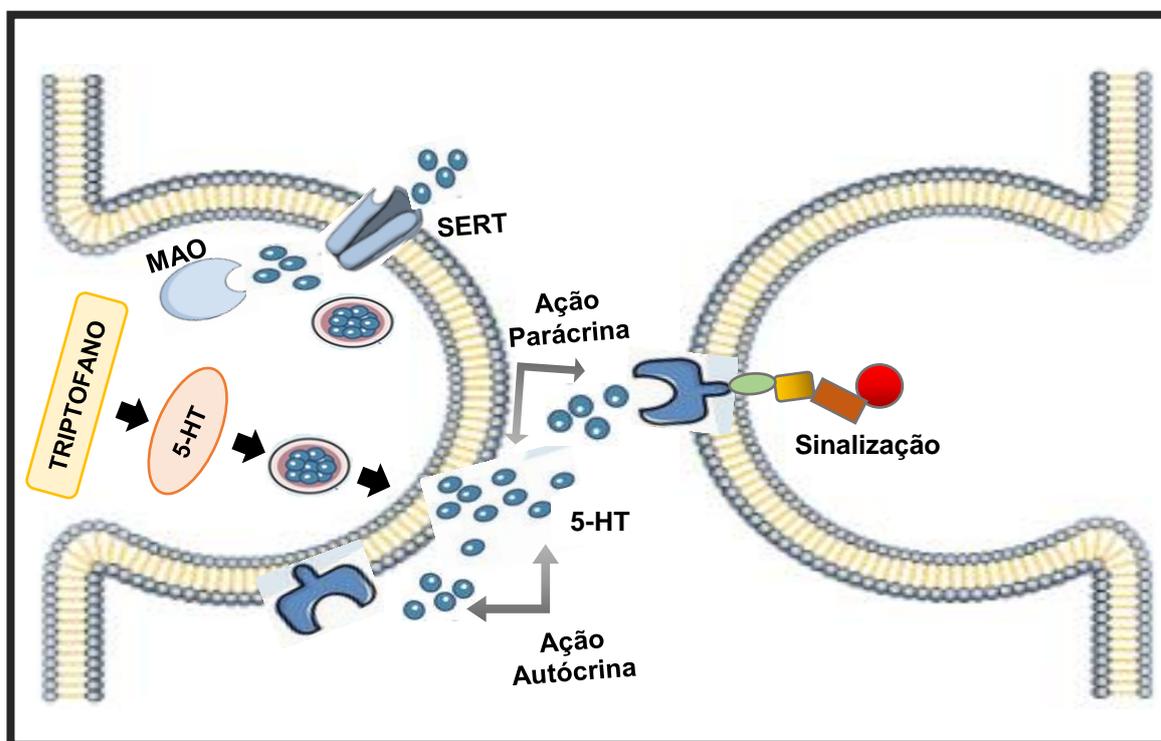


Figura 2: Manutenção do tônus serotoninérgico. Elaborada com mindthegraph.com. Enzima monoamimna oxidase (MAO), Transportador de recaptção de serotonina (SERT). Serotonina (5-HT).

O desequilíbrio de qualquer ponto desse ciclo metabólico serotoninérgico pode resultar em alteração nos níveis de 5-HT e conseqüentemente sinalização inadequada. Tais alterações estão relacionadas com uma série de morbidades, como a síndrome do intestino irritável (THIJSEN *et al.*, 2015), fibromialgia (JUHL, 1998), enxaqueca (DIENER *et al.*, 2015), transtorno de ansiedade generalizada e seus espectros (HALE; SHEKHAR; LOWRY, 2012), obesidade (VERSTEEG *et al.*, 2015), transtorno afetivo bipolar (HALE; SHEKHAR; LOWRY, 2012), transtorno depressivo maior e seus espectros (ALMEIDA-MONTES, LUIS G. *et al.*, 2000; PARK; LEE; LEE, 2014) e transtorno disfórico pré-menstrual (HALBREICH; TWOREK, 1993).

O tratamento farmacológico dessas patologias abrange o uso de inibidores seletivos de recaptção de 5-HT (SSRI) (YONKERS, 1997; AGGARWAL; PURI; PURI, 2012; DOUGLAS *et al.*, 2015; FOURNIER *et al.*, 2013; HÄUSER *et*

al., 2013; SUMPTON; MOULIN, 2008; SUPLICY *et al.*, 2014). Fluoxetina, Paroxetina, Sertralina, Citalopram e Escitalopram (**Figura 3**) são exemplos dessa classe de fármacos que tem como mecanismo de ação o bloqueio do SERT, resultando em inibição da captação da 5-HT do meio extracelular, conseqüentemente, aumentando a disponibilidade de 5-HT para interação com seus receptores (DIENER *et al.*, 2015; MILANO *et al.*, 2013; STARKE, 1990). Vale ressaltar que a Food and Drug Administration (FDA) e a Agência Nacional de vigilância sanitária (ANVISA) indicam que os SSRI só devem ser prescritos por psiquiatras e para tratamento de Depressão maior e Transtorno de ansiedade generalizada (STONE; VIERA; PARMAN, 2003).

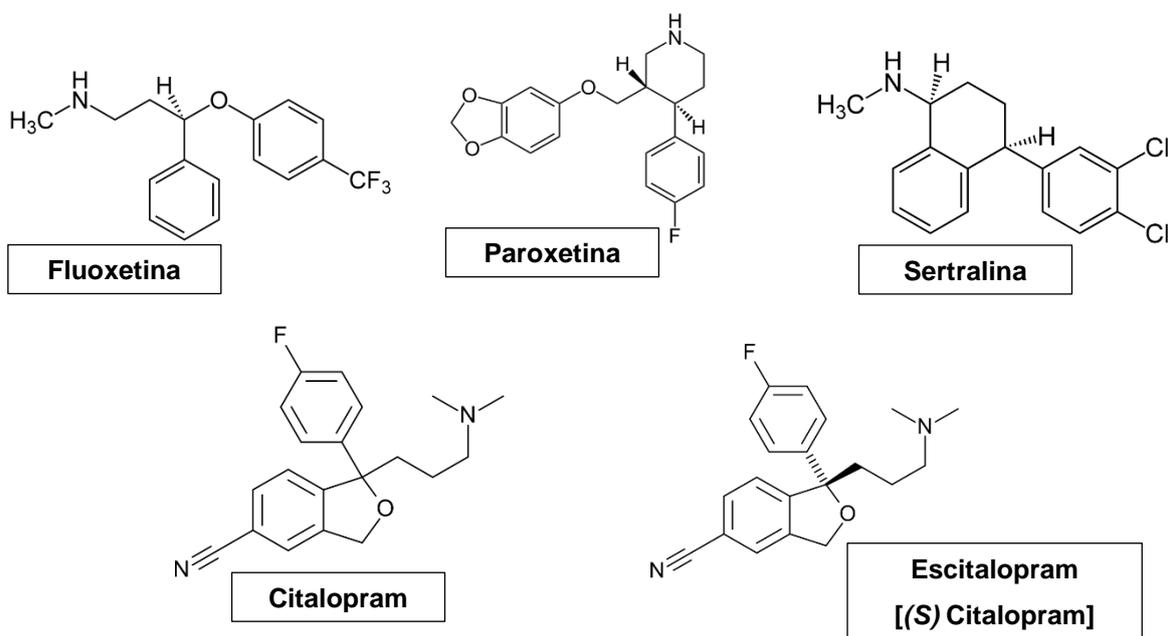


Figura 3: Estrutura dos SSRI. Domínio público.

Os SSRI possuem meia vida longa, entre 24h e 144h, a posologia geralmente consiste em doses, muitas vezes elevadas, tomadas diariamente, normalmente pela manhã, dado o risco de insônia. O metabolismo dessas drogas é hepático (CYP3A4 e CYP2C19), a biodisponibilidade varia entre 44% e 80%, e a excreção ocorre principalmente por via urinária e uma menor parte por via biliar. Os efeitos colaterais mais comuns incluem dor de cabeça, náusea, insônia, constipação, perda de libido, sudorese, tontura, visão embaçada, ideação suicida entre outros, sendo que esses estão mais presentes nas primeiras semanas de tratamento (LEE; CHEN, 2010; SANGKUHL; KLEIN; ALTMAN, 2009; VARIGONDA; JAKUBOVSKI; BLOCH, 2016; WADE; DESPIEGEL; REINES, 2006).

O mais seletivo desses fármacos é o escitalopram, que até o momento tem descrito como alvo apenas o SERT (GARTLEHNER *et al.*, 2011; WADE; DESPIEGEL; REINES, 2006), enquanto as outras drogas podem ter ligações fracas com os canais recaptadores de noradrenalina ou dopamina, além de interagirem com receptores de 5-HT (SGHENDO; MIFSUD, 2012).

Essas patologias tratadas com SSRI, por serem multifatoriais, não respondem positivamente ao tratamento em todos os casos, de forma que não se tem ainda descrição exata do mecanismo de ação efetivo dessas drogas em cada uma delas. Até o momento acredita-se que no caso do tratamento da enxaqueca o aumento de disponibilidade de 5-HT seria favorável a sua ligação aos 5-HT₁ e dessa forma levaria a vasoconstrição de vênulas e capilares cerebrais (AGGARWAL; PURI; PURI, 2012; DIENER *et al.*, 2015; DUSSOR, 2014). Na depressão maior e no transtorno de ansiedade generalizada, o tratamento visa equilibrar o tônus serotoninérgico levando a disponibilidade adequada de 5-HT para interação com todos os seus receptores no SNC (DETKE *et al.*, 2004a; GARTLEHNER; HANSEN; THIEDA; *et al.*, 2007; SGHENDO; MIFSUD, 2012). Nos distúrbios alimentares, como geralmente são secundários à depressão e ansiedade, a resposta clínica é devido a melhora dos sintomas das desordens primárias, contudo, o aumento da disponibilidade de 5-HT é favorável à sinalização anorexígena pela ligação ao 5-HT₂ via mTOR no hipotálamo, gerando sensação de saciedade (FULLER; WONG, 1990; GOLDSTEIN *et al.*, 1995; SARGENT; MOORE, 2009; SUPLICY *et al.*, 2014).

Os SSRI não têm atuação específica no SNC (FIDALGO; IVANOV; WOOD, 2013), portanto, qualquer célula que expresse o SERT, como osteoblastos (DE VERNEJOU; COLLET; CHABBI-ACHENGLI, 2012), plaquetas (SHAJIB; KHAN, 2015), neurônios (STARKE, 1990), linfócitos B, macrófagos, células dendríticas (DC) (O'CONNELL *et al.*, 2005) e mastócitos (BAGANZ; BLAKELY, 2013) são possíveis alvos. Em indivíduos saudáveis, a concentração de 5-HT livre no plasma é aproximadamente 10⁻⁹M, enquanto que, sendo transportada pelas plaquetas, a 5-HT é encontrada em concentrações maiores de aproximadamente 10⁻⁷M (FRÖBE *et al.*, 2014; LECHIN; VAN DER DIJS; LECHIN, 2005; ORTIZ; ARTIGAS; GELPÍ, 1988). O uso de SSRI aumenta a concentração plasmática de 5-HT por inibir sua recaptação pelas plaquetas, assim, uma maior parte da 5-HT

produzida nas células enterocromafins passa a circular de forma livre no plasma, podendo interagir com seus receptores, inclusive com os receptores expressos nos leucócitos (FIDALGO; IVANOV; WOOD, 2013; GOBIN, VEERLE *et al.*, 2014).

Em função da nova indicação de tratamento com SSRI para quadros de obesidade, fibromialgia e enxaqueca, além do aumento na incidência de depressão maior e transtorno de ansiedade generalizada, as vendas desta classe de fármaco dobraram na última década (NIELSEN; GØTZSCHE, 2011). A sua principal prescrição ainda é para o tratamento da depressão, uma doença crônica e muitas vezes debilitante que, segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2030, será a segunda maior causa de incapacidade e afastamento escolar/laboral representando um dos principais gastos governamentais com saúde pública (MATHERS; LONCAR, 2005; MOUSSAVI *et al.*, 2007). Não há um consenso de como o uso dos SSRI melhora o quadro da depressão, assim como ainda não existem evidências substanciais acerca da remissão dos sintomas da enxaqueca, da fibromialgia ou ainda de atenuação da obesidade frente esse tratamento. Apesar de existirem dados acerca da eficácia do tratamento na depressão maior, alguns trabalhos relatam que parte, cerca de 55%, dos pacientes não apresenta melhora clínica com o uso dessas drogas, sendo necessário o aumento da dose do SSRI, ou a combinação com outros fármacos, em geral, inibidores da recaptação de dopamina ou noradrenalina ou noradrenalina e 5-HT (FOURNIER *et al.*, 2013; GARTLEHNER *et al.*, 2011; JACOBSEN; MEDVEDEV; CARON, 2012; KIRSCH *et al.*, 2008; LACASSE; LEO, 2005; LANG; BORGWARDT, 2013; MURROUGH; CHARNEY, 2012; SKAPINAKIS *et al.*, 2010). Alguns trabalhos vão além e apontam que apenas em altas doses os SSRI são um tratamento eficaz para os espectros de depressão, contudo os efeitos colaterais em maiores doses podem ser mais intensos, inclusive pode ocorrer um maior aumento da 5-HT plasmática livre (JAKUBOVSKI *et al.*, 2016; HENSSLER; BSCHOR; BAETHGE, 2016).

1.2 Serotonina e o sistema imunológico

A interação entre a 5-HT circulante e as células do sistema imune se torna evidente pelo fato de que os leucócitos expressam receptores para 5-HT

(BAGANZ; BLAKELY, 2013), sendo, portanto susceptíveis às alterações plasmáticas dos níveis de 5-HT. Ademais, é possível detectar concentrações de até 10^{-6} M de 5-HT em tecidos linfáticos como baço, timo e linfonodos (BAGANZ; BLAKELY, 2013). Esses tecidos, inclusive, atuam ativamente no sistema serotoninérgico regulando a concentração de 5-HT, dado que podem degradar a 5-HT, pois expressam a MAO (BAGANZ; BLAKELY, 2013; O'CONNELL *et al.*, 2005). Mediadores inflamatórios como fator ativador de plaquetas e anafilatoxinas estimulam plaquetas, basófilos e mastócitos no local de lesão tecidual a secretarem 5-HT que irá atuar na coagulação, estimular a inflamação e a fagocitose, o que evidencia a cooperação entre a 5-HT e o sistema imune (KÖNIG; JAEGER; KÖNIG, 1994).

A influência da 5-HT sobre a função de células do sistema imune tem sido cada vez mais desvendada. As DC têm papel crucial na resposta imune mediando a comunicação entre imunidade inata e adaptativa ao estimular a resposta antígeno específica de linfócitos T. A produção de citocinas e quimiocinas por essas células pode ser modulada na presença de 5-HT. Alguns estudos apontam para redução da liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-12 (IL-12) e da quimiocina para T *helper* 1, CXCL10 (IDZKO *et al.*, 2004; MÜLLER *et al.*, 2009), e para aumento da secreção de IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10 e da quimiocina para T *helper* 2, CCL22 (AHERN, 2011; IDZKO *et al.*, 2004; LI, NAN *et al.*, 2011; MÜLLER *et al.*, 2009). Mais recentemente, foi visto que a 5-HT *in vitro* estimula a diferenciação de monócitos em DC com reduzida capacidade de apresentação de antígenos, visto que a diferenciação na presença de 5-HT resultou em DC com menor expressão de HLA-DR e CD86 (ARREOLA *et al.*, 2015). Além disso, em DC maduras a 5-HT atua modulando a quimiotaxia, aprimorando o direcionamento da célula e a velocidade da migração em resposta à quimiocina CCL19 (HOLST, KATRIN *et al.*, 2015b).

Nesse contexto da interação entre imunidade inata e adaptativa e do estímulo à resposta antígeno específica, foi demonstrado que a 5-HT atua na ativação e proliferação dos linfócitos T. Os estudos mostraram que essa ação da 5-HT ocorre de forma autócrina, durante a interação com a DC, o linfócito T libera 5-HT que se liga ao receptor 5-HT₇ na sua própria membrana resultando em ativação do Fator nuclear kappa B (NF- κ B), promovendo a sua proliferação. Já havia sido

demonstrado que o bloqueio à síntese de 5-HT nos linfócitos T acarretava redução da liberação de IL-2, também resultando em inibição da proliferação (AUNE; GOLDEN; MC GRATH, 1994). Corroborando esses dados, foi demonstrado que o bloqueio da Triptofano hidroxilase – 1 (TPH-1), enzima da via de síntese de 5-HT, no linfócito T *naïve* reduz a sua capacidade de proliferação (LEON-PONTE;; AHERN; O'CONNELL, 2007; O'CONNELL *et al.*, 2005).

Em relação aos linfócitos B, importantes auxiliares da resposta imune humoral através da produção de anticorpos, foi visto que durante a ativação celular, a expressão de SERT se eleva, aumentando a capacidade de estocagem de 5-HT pela célula (MEREDITH *et al.*, 2005). Além disso, a presença de 5-HT na cultura estimula a proliferação dos linfócitos B (IKEN *et al.*, 1995).

O efeito da 5-HT modulando a atividade inflamatória e fagocítica de macrófagos também foi demonstrado. Macrófagos expostos à 5-HT têm a secreção de TNF- α (DÜRK *et al.*, 2005) reduzida e a liberação de Interferon-gamma (IFN- γ), IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10 (DUERK *et al.*, 2005) aumentadas. Além disso, outro trabalho demonstrou que a presença de 5-HT na cultura modula a polarização de macrófagos, induzindo o aumento da expressão de genes relacionados com o fenótipo anti-inflamatório, M2, e reduzindo a expressão de genes relacionados ao fenótipo pró-inflamatório, M1 (DE LAS CASAS-ENGEL; DOMÍNGUEZ-SOTO; SIERRA-FILARDI; BRAGADO; NIETO; PUIG-KROGER; SAMANIEGO; LOZA; CORCUERA; GÓMEZ-AGUADO; BUSTOS; SÁNCHEZ-MATEOS; CORBÍ, 2013). Com relação aos mecanismos microbicidas dos macrófagos foi visto que na presença de 5-HT, a fagocitose de partículas de β -glucana, componente da parede celular fúngica, foi aumentada (FREIRE-GARABAL *et al.*, 2003), assim como a produção de óxido nítrico (NO) (SILVERMAN; HONG; KARNOVSKY, 1985), contudo, em cultura de leucócitos totais, a 5HT reduziu a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (PRACHAŘOVÁ *et al.*, 2010).

No contexto do papel da 5-HT na biologia de neutrófilos, células de maior abundância no sangue, essenciais na resposta imune contra bactérias extracelulares e fungos, foi demonstrado que a 5-HT *in vitro* reduz a internalização de células tumorais (NANNMARKA; SENNERBYA, 1992), assim como também reduz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e inibe a atividade da mieloperoxidase (MPO) (XIMENES *et al.*, 2010).

1.3 Resposta do neutrófilo contra *Candida albicans*

A *Candida albicans* é um micro-organismo comensal presente na pele e nos tratos genitourinário e gastrointestinal (SCHULZE; SONNENBORN, 2009). A presença do fungo na superfície epitelial da mucosa ocorre de forma assintomática no epitélio íntegro devido a presença de imunoglobulinas, mucinas e bactérias também comensais (SENET, 1997). *C. albicans* pode tornar-se patogênica e causar infecções em indivíduos imunocomprometidos, ou mesmo infecções brandas, em indivíduos saudáveis (KABIR; HUSSAIN; AHMAD, 2012).

Desequilíbrios na interação hospedeiro-comensal desencadeiam a infecção por *C. albicans*, que se inicia com a adesão da levedura à superfície epitelial e invasão do tecido causando inflamação (WÄCHTLER *et al.*, 2011). O processo de adesão-invasão da levedura envolve a formação do tubo germinativo, expondo na parede celular mais adesinas para interação com o epitélio (GOW *et al.*, 2011). A partir da formação do tubo germinativo, o fungo desenvolve a habilidade de invasão tecidual, sendo esta capacidade de alterar sua morfologia seu fator de virulência mais estudado. Sabe-se que a forma de levedura coloniza as mucosas e a forma de hifa pode invadir os tecidos mais profundos, dando ao fungo uma maior capacidade de evasão da resposta imune (GOW; BROWN; ODDS, 2002; SASSE *et al.*, 2013). Nesse contexto, o neutrófilo tem grande relevância dado que possui mecanismos microbicidas que podem conter a infecção ou mesmo eliminar o fungo em qualquer dos seus estágios morfológicos, levedura, pseudohifa e hifa.

A parede celular da *C. albicans* é composta por carboidratos e proteínas que não estão presentes no organismo humano, dessa forma, a maior parte dos componentes dessa parede celular podem ativar e modular a resposta imunológica pela interação com os receptores de padrões moleculares (PRRs) expressos nas células de defesa (ROMANI, L. 2011). Tanto a imunidade inata quanto a adaptativa estão envolvidas na manutenção do equilíbrio entre comensal e hospedeiro e também no combate à infecção quando o equilíbrio é interrompido (ROMANI, L, 2000). Já foi descrito o envolvimento das células T *helper* 1 e T *helper* 17 na imunidade contra *C. albicans*, contudo a célula mais importante nesse cenário é o neutrófilo (CONTI; GAFFEN, 2010; COSTA *et al.*, 2008; ROMANI, L, 2000).

Ao invadir o tecido, a *C. albicans* entra em contato com DC e macrófagos, células que reconhecem o micro-organismo e produzem citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-8 que contribuem para o recrutamento de neutrófilos (VILLAR; DONGARI-BAGTZOGLU, 2008).

O neutrófilo possui um arsenal de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) que interagem com estruturas da parede celular da *C. albicans* e dão início aos mecanismos efetores para erradicação da infecção. Entre os PRRs expressos na membrana celular, destaca-se o papel do receptor do tipo toll 2 (TLR2), que reconhece fosfolipomanana, e da Dectina-1, um receptor da família de receptores de lectina tipo C, que reconhece β -(1,3)-glucana (BAIN *et al.*, 2014; VIJAYAN *et al.*, 2012). O estímulo do neutrófilo via TLR2 induz a produção de ROS e de citocinas (VILLAMÓN *et al.*, 2004), enquanto que a sinalização via Dectina-1 estimula a fagocitose da *C. albicans* (BROWN, 2006) e amplifica a via de sinalização do TLR2, aumentando a produção de ROS (GANTNER *et al.*, 2003; HERRE *et al.*, 2004). Outros receptores da família TLR, como o TLR4, interage com *C. albicans* através de manose-O-ligada, e o TLR9, reconhece fragmentos de DNA do fungo (NETEA *et al.*, 2008); já entre os receptores lectinas do tipo-C, a Dectina-2 liga-se a α -mananas da parede celular das hifas e, em associação com o receptor de porção Fc γ , estimula a produção de TNF- α (SATO, K. *et al.*, 2006).

Após o reconhecimento do micro-organismo, o primeiro mecanismo efetor utilizado pelo neutrófilo é a fagocitose (BRANZK *et al.*, 2014), em que projeções da membrana plasmática envolvem a partícula a ser internalizada formando um fagossomo (NORDENFELT; TAPPER, 2011). No caso da infecção por *C. albicans*, a interação dos PRRs com β -(1-3)-glucanas promove o rearranjo do citoesqueleto e a formação do fagossomo (MA; UNDERHILL, 2013) e na membrana do fagossomo as subunidades da enzima NADPH oxidase se unem para converter o oxigênio molecular em superóxido (DUPRE-CROCHET; ERARD; NUSSE, 2013) (**Figura 4**).

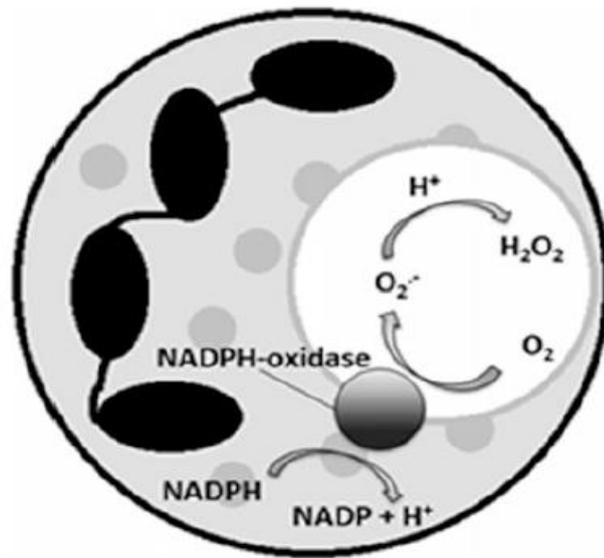


FIGURA 4: *Burst oxidativo no interior do fagossomo.* Produção de superóxido e peróxido de hidrogênio. (MANDA-HANDZLIK; DEMKOW, 2015).

Os grânulos do neutrófilo podem se unir ao fagossomo formando então um fagolisossomo onde liberam seu conteúdo. Esses grânulos estocam proteínas que podem eliminar micro-organismos, degradar a matriz extracelular e facilitar a migração do neutrófilo até o local de infecção (BORREGAARD, NIELS, 2010). Os grânulos primários, ou azurofílicos, são os primeiros a serem formados ainda na medula óssea durante a granulopoiese, seguido da formação dos grânulos secundários, ou específicos, e terciários, ou gelatinase (JOG *et al.*, 2007). Os grânulos primários liberam MPO que promove a halogenação dos radicais de oxigênio gerados na ativação da NADPH oxidase, formando ácido hipocloroso, mais potente na eliminação da levedura (ARAŻNA; PRUCHNIAK; DEMKOW, 2014). Nos grânulos primários estão contidas Catepsina G, Elastase e defensinas, enquanto que os grânulos secundários contêm lactoferrina e gelatinase de neutrófilo (SEGAL, 2005). Embora esses mecanismos microbicidas intracelulares possam causar danos ao DNA do fungo e lipoperoxidação da parede celular (COSTA *et al.*, 2008), a *C. albicans* pode se evadir do reconhecimento ou mesmo escapar do interior do fagolisossomo (DANTAS *et al.*, 2015; NETEA *et al.*, 2008; XIE *et al.*, 2012). Para conter o micro-organismo no meio extracelular o neutrófilo pode liberar o conteúdo dos seus grânulos no ambiente extracelular ou formar armadilhas extracelulares de DNA.

Em resposta a ativação do neutrófilo, os grânulos seguem uma ordem de secreção para o meio extracelular (BORREGAARD, N; COWLAND, 1997), primeiramente ocorre a exocitose dos grânulos terciários, liberando gelatinase que degrada a matriz extracelular enquanto o neutrófilo extravasa da circulação para o tecido (KJELDSEN *et al.*, 1993). Em seguida, ocorre a secreção dos grânulos secundários, que pode ser avaliada pelo aumento da expressão de CD66b na membrana do neutrófilo (JOG *et al.*, 2007), esses grânulos preferencialmente se fundem à membrana plasmática, liberando seu conteúdo no meio extracelular (NAUCLÉR *et al.*, 2002). Por fim, os grânulos primários preferencialmente se fundem ao fagossomo, contudo, podem ser também exocitados, o que pode ser avaliado pelo aumento da expressão de CD63 na membrana plasmática do neutrófilo (JOG *et al.*, 2007; NAUCLÉR *et al.*, 2002). Já foi demonstrado que tanto o conteúdo do grânulo primário quanto o do grânulo secundário contêm atividade candidicida (METZLER *et al.*, 2014; NEUMANN; VÖLLGER; *et al.*, 2014).

A formação de armadilhas extracelulares de neutrófilo (NET) tem papel fundamental na contenção da infecção por *C. albicans* no meio extracelular, principalmente no combate às hifas (URBAN *et al.*, 2006). Uma das formas de formação de NET se dá quando após a ativação do neutrófilo, os grânulos primários, sob estímulo dos produtos do *burst* oxidativo, liberam elastase que migra para o núcleo da célula onde atua na descondensação da cromatina (METZLER *et al.*, 2014), as membranas nuclear e dos grânulos citoplasmáticos são degradadas e o DNA adsorve as proteínas citoplasmáticas e granulares, como a MPO, antes de ser extrusado (**Figura 5**). Toda essa mobilização para formação da NET ocorre como parte de um mecanismo de morte celular programada diferente da apoptose ou da necrose, que recebeu o nome de NETose (FUCHS *et al.*, 2007); muito embora tenha sido levantada a hipótese do neutrófilo formar NET e ainda continuar vivo (BRANZK; PAPAYANNOPOULOS, 2013; YIPP; KUBES, 2013). Vários estímulos foram descritos como desencadeadores da formação de NET como a citocina IL-8, bactérias, fungos, vírus e anafilatoxina C5a (BYRD *et al.*, 2013; SAITOH *et al.*, 2012; SCHILCHER *et al.*, 2014; URBAN *et al.*, 2006; WARTHA *et al.*, 2007).

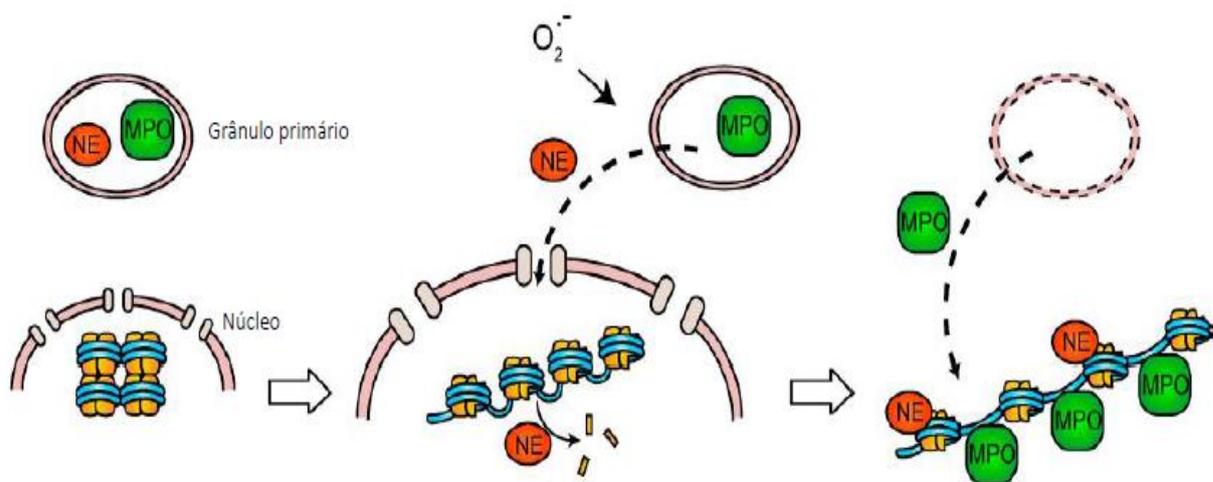


FIGURA 5: Mecanismo de formação de NET. Adaptado de PAPAYANNOPOULOS, 2010.

Uma série de componentes com atividade candidacida já foram descritos como componentes da NET, como Calprotectina (URBAN *et al.*, 2009), MPO (METZLER *et al.*, 2014), e Catelicidina LL37 (LÓPEZ-GARCÍA *et al.*, 2005; NEUMANN; BERENDS; *et al.*, 2014), comprovando que a NET exerce um papel na erradicação da infecção por esse fungo (URBAN *et al.*, 2006). Recentemente foi descrito que o neutrófilo em resposta a *C. albicans* é capaz de formar NET na ausência de ROS (BYRD *et al.*, 2015).

Vários trabalhos demonstram maior susceptibilidade à infecção por *C. albicans* dos indivíduos com deficiências nos neutrófilos (GAZENDAM *et al.*, 2014; PATIÑO *et al.*, 1999). Portanto, qualquer interferência que possa imunossuprimir as funções efetoras do neutrófilo afeta o equilíbrio entre comensal e hospedeiro aumentando a susceptibilidade à infecção por *C. albicans*.

O papel da 5-HT como moduladora do sistema imune vem sendo discutido e existem relatos de que ela pode exercer tanto um caráter supressor quanto estimulador da imunidade. Poucos trabalhos demonstram o efeito da 5-HT nos neutrófilos e ainda não se pode afirmar qual seria o impacto desse neurotransmissor em seus mecanismos efetores, tampouco se sabe quais seriam os efeitos do desequilíbrio na concentração de 5-HT plasmática na biologia dessas células. Trabalho prévio do nosso grupo demonstrou que a 5-HT inibiu o aumento da expressão de TLR2, Dectina-1, CR3, CD63 e CD66b induzido pela interação com *C. albicans*, na superfície dos neutrófilos de indivíduos saudáveis, apontando

menor capacidade dessas células em reconhecer a levedura e redução de sua ativação. A atividade fagocítica dos neutrófilos também foi inibida frente a 5-HT, assim como a produção de ROS e a formação de NET. Desta forma, os dados mostraram que a atividade candidada dos neutrófilos foi prejudicada pela exposição prévia, *in vitro*, à 5-HT (TEIXEIRA, 2016).

Nesse contexto, são essenciais estudos que avaliem o efeito da 5-HT na biologia do neutrófilo analisando as possíveis alterações do status funcional destas células em decorrência de condições que aumentem a exposição a este neurotransmissor, como pode acontecer durante o tratamento com SSRI.

2 JUSTIFICATIVA

Os antidepressivos da classe SSRI pertencem a uma categoria de medicamentos relativamente nova e já dominam a terapêutica dos transtornos de ansiedade e depressão largamente. Um aumento substancial das prescrições de SSRI tem sido observado nos últimos anos em diversos países e, apesar de serem drogas bem toleradas em geral, um maior número de indivíduos sob o uso desses fármacos está, portanto, sujeito aos seus efeitos colaterais e adversos (ILYAS; MONCRIEFF, 2012; MOORE *et al.*, 2009; STAFFORD; MACDONALD; FINKELSTEIN, 2001). Um dos efeitos do uso destes fármacos apontado por diversos trabalhos é o aumento da concentração de 5-HT livre no plasma. Embora essa alteração não seja considerada efeito colateral da medicação, sabe-se que a 5-HT tem forte característica imunomoduladora. No entanto, ainda nenhum trabalho avaliou se este possível aumento de 5-HT periférica consequente do uso de SSRI pode interferir na resposta imune, particularmente, sobre a função dos neutrófilos, o leucócito em maior quantidade do sangue periférico e de suma importância em infecções por micro-organismos extracelulares.

Desta forma, estudos que busquem analisar o status funcional destas células em indivíduos sob tratamento com SSRI podem contribuir para elucidar se a elevação da 5-HT plasmática como uma possível consequência do uso destas medicações pode afetar a competência imunológica destes pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar em neutrófilos de indivíduos em uso de SSRI a resposta contra *C. albicans* e o efeito modulador da 5-HT sobre esta resposta.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar o receptor de 5-HT envolvido nos efeitos causados por esse neurotransmissor na resposta do neutrófilo à *C. albicans*
- Avaliar a produção de ROS por neutrófilos, na presença ou não de 5-HT, estimulados com *C. albicans*
- Avaliar a formação de NET por neutrófilos, na presença ou não de 5-HT, estimulados com *C. albicans*
- Avaliar a capacidade candidacida dos neutrófilos na presença ou não de 5-HT

4 METODOLOGIA

4.1 Micro-organismo e condições de cultivo

Candida albicans, cepa ATCC 10.231, foi mantida em estoque a 4°C em meio Sabouraud líquido (Peptona 1% e glicose 4%) (Difco - BD). Para realização dos experimentos, uma alíquota do estoque (1mL) foi retirada e inoculada em 5mL de meio Sabouraud líquido e mantida em temperatura ambiente. Após 24h, as leveduras foram coletadas por centrifugação a 5000rpm, a 20°C, por 10 minutos, lavadas e ressuspendidas em PBS (10mM Tampão fosfato, 2,7mM KCl e 137mM NaCl) (Sigma-Aldrich) e contadas em câmara de Neubauer em microscópio óptico Axio Lab A1 (Zeiss) com aumento de 40x. A concentração de células foi ajustada de acordo com a necessidade de cada experimento.

4.2 Recrutamento de voluntários e análise dos Questionários de Morbidade Psiquiátrica do Adulto

O uso de amostras humanas no presente projeto foi autorizado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (CEP-UNIRIO – 0030/2010) (ANEXO A). Os voluntários foram entrevistados e convocados a participar do estudo. Durante a entrevista, foi explicado o projeto e os que concordaram em participar deram seu consentimento por escrito assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO B). Após a assinatura do TCLE, os voluntários responderam ao Questionário de Morbidades Psiquiátricas do Adulto (QMPA) (ANEXO C), que é utilizado como triagem na identificação de distúrbios neuropsiquiátricos como Depressão Maior e Transtorno de Ansiedade Generalizada. As perguntas do QMPA abrangem os sinais e sintomas mais comuns de distúrbios psiquiátricos, algumas dessas perguntas estão relacionadas à depressão ou ao transtorno de ansiedade, cada resposta positiva a uma dessas perguntas específicas soma-se 1 ponto, um determinado número de pontos determina se o entrevistado possui ou não traços de ansiedade ou depressão (ANDREOLI *et al.*, 1994). Incluíram-se perguntas ao QMPA para avaliar

o status imunológico geral do indivíduo e informações sobre o uso de qualquer medicamento. Após a análise do QMPA, foram selecionados para coleta de amostra, como grupo controle, os indivíduos que não preenchiam os critérios que identificavam morbidades psiquiátricas, suas características estão apresentadas na **tabela 2**. Como grupo de investigação foram selecionados os indivíduos com QMPA positivo para depressão e/ou ansiedade, ou com alguma outra morbidade, e em tratamento há no mínimo três meses com SSRI, suas características estão apresentadas na **tabela 2** e os dados acerca do tratamento na **tabela 3**. Foram excluídos os indivíduos que faziam uso de qualquer fármaco com caráter imunomodulador, que apresentavam sinais e/ou sintomas de infecção e/ou inflamação na época da coleta e também os portadores de doença autoimune.

Tabela 2: Características das populações estudadas

Parâmetro	SSRI	Controle
n	9	11
Idade anos [média (intervalo)]	34,66 (18-60)	22,11 (19-30)
Peso kg [média (intervalo)]	62,33 (50-82)	60,22 (43-82)
Relato Candidíase de repetição	5	0

Tabela 3: Características do tratamento com SSRI dos voluntários

Voluntário	Fármaco	Dose	Tempo
1	Fluoxetina	20mg/dia	18 meses
2	Fluoxetina	50mg/dia	18 meses
3	Escitalopram	10mg/dia	12 meses
4	Escitalopram	20mg/dia	36 meses
5	Escitalopram	20mg/dia	24 meses
6	Escitalopram	20mg/dia	30 meses
7	Citalopram	20mg/dia	12 meses
8	Citalopram	20mg/dia	6 meses
9	Sertralina	75mg/dia	72 meses

4.3 Coleta de amostra e isolamento de neutrófilos

Sangue periférico (20mL) de indivíduos saudáveis e em uso de SSRI foi coletado a vácuo por punção venosa em tubo estéril heparinizado (Vacutainer – BD). O sangue foi depositado lentamente sobre gradiente de densidade Ficoll Paque (GE – Healthcare Life Sciences) em tubo cônico de 50mL na proporção 2:1 (Sangue : Ficoll). Os tubos foram centrifugados a 2000rpm, a 20°C, por 20min em aceleração 7 e desaceleração 2. Ao final da centrifugação, o sobrenadante, constituído de plasma, células mononucleares e Ficoll foi descartado. Às hemácias e granulócitos restantes foram adicionados 20mL de solução de lise de hemácias ACK (150mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃ e 1,3mM EDTA). O *pellet* de hemácias foi homogeneizado por 6min com o ACK, e posteriormente o tubo foi centrifugado a 1900rpm, a 20°C, por 6min. A solução de lise foi descartada e novamente foram adicionados 20mL de ACK aos tubos para lisar as hemácias restantes, dessa vez, logo após a adição do ACK, os tubos foram centrifugados. Após o descarte da segunda solução de lise de hemácias, foram adicionados 20mL de PBS suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab) ao *pellet* de neutrófilos, o tubo foi centrifugado nos mesmos parâmetros utilizados para o ACK e o procedimento de lavagem foi repetido. Por fim, os neutrófilos foram ressuspendidos em meio RPMI 1640 (Gibco - Life Technologies) suplementado com 10% de SFB e 2% de estreptomicina e penicilina (Gibco - Life Technologies) (meio RPMI completo). As células foram contadas em azul de tripan 0,04% em PBS em câmara de Neubauer. A viabilidade celular encontrada nas amostras foi de 98% e a concentração de células foi ajustada para 7×10^5 /mL.

4.4 Análise da expressão e atividade de receptores de 5-HT

4.4.1 *Análise da expressão do 5-HT₇ por Western Blotting*

A fim de comprovar a presença do 5-HT₇ em neutrófilos humanos, essas células, obtidas de voluntários saudáveis, foram submetidas à técnica de *western blotting*. Após o isolamento do sangue periférico, 10^7 neutrófilos foram

ressuspendidos em tampão RIPA (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, Triton X100 1%, 0,25% deoxicolato de sódio, 100 mM EDTA) com 0,1% de coquetel inibidor de proteases e mantidas em gelo por 20min. Ao final desse tempo as amostras foram sonicadas por 5min e então centrifugadas a 14.000 rpm por 10min a 4°C com aceleração e desaceleração 9. O sobrenadante foi coletado e o *pellet* descartado.

As amostras foram então desnaturadas em tampão Laemmli (50mM Tris-HCl, 1% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol e 0,001% azul de bromofenol) sob aquecimento a 95°C por 5min. Foram submetidos à eletroforese 50µg de lisado celular total em SDS-PAGE (em gel de poliacrilamida-SDS 11%), posteriormente foi realizada a transferência para membranas de PVDF em sistema semi-seco (Trans-Blot Semi Dry), na presença de tampão de transferência (48mM Tris-HCl e 39mM Glicina). Ao final da transferência, a membrana foi incubada em tampão de bloqueio TBST (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl e 0,1% Tween 20) acrescido de 5% de leite em pó desnatado por 2h em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada *overnight* a 4°C na presença de anticorpo policlonal anti-5-HT₇ produzido em coelho (Santa Cruz), diluído 1000x em TBST-5% leite. A membrana foi então lavada 5x com TBST e posteriormente incubada por 1h com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a HRP, diluído 500x em TBST-5% leite. Novamente a membrana foi lavada 3x com TBST e 2x com TBS. A detecção da presença do receptor foi feita usando sistema ECL expondo as membranas a filme de autorradiografia. A membrana foi então estripada com NaOH (1M) e incubada *overnight* com anticorpo policlonal anti-β-actina produzido em coelho, diluído 5000x, lavada, incubada com anti-IgG de coelho e revelada como descrito anteriormente para controle da técnica.

Como controle positivo da presença do receptor foram utilizadas células da linhagem A172, provenientes de neuroglioblastoma humano, cuja expressão do 5-HT₇ é constitutiva (MAHÉ *et al.*, 2004). As células foram cultivadas por sete dias em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, ao final dos sete dias as células foram recolhidas e centrifugadas com PBS para retirar o meio de cultura. Posteriormente foram lisadas em tampão RIPA, as proteínas foram recuperadas e digeridas em tampão Laemmli e então, assim como os neutrófilos foram submetidas à eletroforese, sendo transferidas para a mesma membrana e

submetidas ao mesmo processo para detecção do receptor descrito para os neutrófilos.

4.4.2 Análise da atividade dos receptores 5-HT₄ e 5-HT₇

4.4.2.1 Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Os neutrófilos foram incubados em placa de 96 poços por 30 minutos, na presença ou ausência de SB269970 (SB) (10^{-6} M a 10^{-4} M) (Sigma-Aldrich), antagonista seletivo do receptor 5-HT₇, ou por 1h com Cisaprida (Cspd) (10^{-9} M a 10^{-5} M) (Sigma-Aldrich), agonista seletivo do receptor 5-HT₄. Ao final do tempo de incubação com SB as células foram incubadas ou não com 5-HT (10^{-8} M) (Sigma-Aldrich) por 1h, sendo essa concentração sabidamente inibitória da resposta do neutrófilo à *C. albicans* (TEIXEIRA, 2016). Por fim, foi adicionada 1,2,3 Dihidrorodamina (DHR) (10 μ M, em PBS) (Sigma-Aldrich) às culturas e os neutrófilos foram estimulados ou não por 30 minutos com *C. albicans* na proporção de 3 leveduras para cada neutrófilo. A intensidade média de fluorescência (MFI) emitida pela DHR oxidada foi então avaliada pela leitura das culturas em leitor de fluorescência de microplaca onde foi realizada a da base do poço com excitação a 480nm e emissão de 530nm. A DHR que entra na célula é oxidada na presença de peróxido de hidrogênio produzido pelo complexo NADPH oxidase, dessa forma, a produção de ROS pode ser quantificada pela oxidação da DHR em 1,2,3 Rodamina (Rh), composto que emite fluorescência entre 525-535nm.

4.4.2.2 Dosagem da formação de armadilhas extracelulares de neutrófilo

Neutrófilos foram incubados em placa de 96 poços por 30 minutos, na presença ou ausência de SB (10^{-5} M), ou por 1h Cspd (10^{-9} M a 10^{-5} M). Após a incubação com SB as células foram incubadas ou não com 5-HT (10^{-8} M) por 1h. Ao final do tratamento os neutrófilos foram estimulados ou não com *C. albicans* por 3h na proporção de 3 leveduras para cada neutrófilo. Nos 15min finais da interação as

culturas receberam 5 μ M de SYTOX Green (Life Technologies) em PBS. Finalmente, as culturas foram lidas em espectrofotômetro onde foi obtida a MFI do SYTOX Green pela varredura de 9 pontos da base do poço com excitação a 485nm e emissão de 527nm. A MFI obtida é equivalente à formação de NET, visto que o SYTOX Green é um intercalante de DNA impermeável à membrana plasmática que se torna 500x mais fluorescente quando ligado ao DNA.

4.4.2.3 Avaliação da viabilidade da *C. albicans* após interação com neutrófilos

Neutrófilos isolados foram incubados em microtubos por 30 minutos, na presença ou ausência de SB (10⁻⁵M) ou por 1h Cspd (10⁻⁹M a 10⁻⁵M). Após a incubação com SB as células foram incubadas ou não com 5-HT (10⁻⁸M) por 1h. Ao final do tratamento os neutrófilos foram estimulados ou não com *C. albicans* por 2,5h na proporção de 3 leveduras para cada neutrófilo. Ao fim da interação os neutrófilos foram lisados com uma solução estéril de deoxicolato de sódio a 0,04% para liberar as *C. albicans* internalizadas no sobrenadante. Uma alíquota desse sobrenadante foi transferida para uma placa de 96 poços e incubada por 2h com 0,01% de sal de tetrazólio XTT em PBS com 4% de Menadiona para quantificação da atividade respiratória das leveduras remanescentes. Ao final da incubação a placa foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 490nm. A D.O. obtida é proporcional à redução do XTT e equivalente a capacidade respiratória do fungo. Os resultados foram expressos como percentual da D.O. obtida nas culturas de *C. albicans* incubada na ausência de granulócitos.

4.4.2.4 Avaliação da capacidade candidacida do neutrófilo (ensaio de *killing*)

Neutrófilos isolados foram incubados em microtubos por 30 minutos, na presença ou ausência de SB (10⁻⁵M) ou por 1h Cspd (10⁻⁹M a 10⁻⁵M). Após a incubação com SB as células foram incubadas ou não com 5-HT (10⁻⁸M) por 1h. Ao final do tratamento os neutrófilos foram estimulados ou não com *C. albicans* por 2,5h na proporção de 3 leveduras para cada neutrófilo. Ao fim da interação os

neutrófilos foram lisados com uma solução estéril de deoxicolato de sódio a 0,04% para liberar as *C. albicans* internalizadas no sobrenadante. As alíquotas do sobrenadante foram diluídas 8x em PBS e plaqueadas em placas de Petri contendo meio Sabouraud sólido (Peptona 1%, glicose 4% e ágar 2%) (Difco - BD). As placas foram mantidas em temperatura ambiente e as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas após 48h de incubação.

4.5 Análise da atividade de neutrófilos de indivíduos em uso de SSRI e do efeito modulador da 5-HT sobre estas células

Os mesmos parâmetros descritos anteriormente para avaliação da produção de ROS, formação de NET e atividade candidacida foram avaliados em neutrófilos de indivíduos em uso de SSRI na presença ou ausência de 5-HT (10^{-8} M) por 1h.

4.6 Análise da modulação de neutrófilos de indivíduos saudáveis por SSRI

A fim de se avaliar se modulações na atividade dos neutrófilos poderiam ser causadas diretamente pela ação dos fármacos SSRIs nessas células, os mesmos parâmetros descritos anteriormente foram analisados em neutrófilos de indivíduos saudáveis na presença ou ausência de diferentes concentrações de Cloridrato de Fluoxetina (2×10^{-5} M, 5×10^{-5} M, 10^{-4} M, 2×10^{-4} M e 4×10^{-4} M), sendo essas concentrações equivalentes a dosagem indicada nos tratamentos, levando em consideração a biodisponibilidade de 72% (5mg, 10mg, 20mg, 50mg, e 80mg) ou Oxalato de Escitalopram (5×10^{-4} M, 2×10^{-2} M, 5×10^{-2} M e 10^{-1} M), concentrações equivalentes a dosagem indicada nos tratamentos, levando em consideração a biodisponibilidade de 80% (1mg, 5mg, 10mg, 20mg) (Lundbeck) por 1h.

4.7 Análise estatística

Os dados obtidos com os experimentos foram analisados com o programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, inc.). Os resultados foram avaliados quanto a normalidade de sua distribuição e todos apresentaram distribuição Gaussiana, portanto, para avaliar a interferência das variáveis foi aplicado o teste ANOVA one way seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. Para comparação entre os grupos estudados foi empregado o teste T de Student. Todos os testes foram conduzidos com intervalo de confiança bilateral de 95%, logo, foi considerado significativo o valor de $p < 0,05$. Nos gráficos os dados foram representados por média e desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Neutrófilos expressam 5-HT₇

A 5-HT inibiu em neutrófilos humanos a produção de ROS, a formação de NET e a atividade candidacida *in vitro* em resposta à *C. albicans* (TEIXEIRA, 2016). Segundo dados da literatura esses mecanismos de neutrófilos anteriormente citados poderiam ser inibidos pelo aumento de AMPc intracelular (BOURNE *et al.*, 1971; COX, JOYCE P.; KARNOVSKY, 1973; SHISHIKURA *et al.*, 2016; WEISSMANN; ZURIER; HOFFSTEIN, 1972) dessa forma o presente projeto foi iniciado pela investigação dos receptores de 5-HT que teriam a capacidade de aumentar o AMPc intracelular, a saber: 5-HT₄, 5-HT₆ e 5-HT₇ (MCCORVY; ROTH, 2015). Até o momento nenhum trabalho apresentou quais receptores serotoninérgicos os neutrófilos expressam.

Foi identificada por *Western blotting* a presença de 5-HT₇ (**Figura 6**) no lisado de neutrófilos periférico humano. A partir desse achado foi decidido dar continuidade ao trabalho, investigando se a expressão desse receptor nos neutrófilos era funcional, e se através dele a serotonina poderia modular a atividade do neutrófilo.

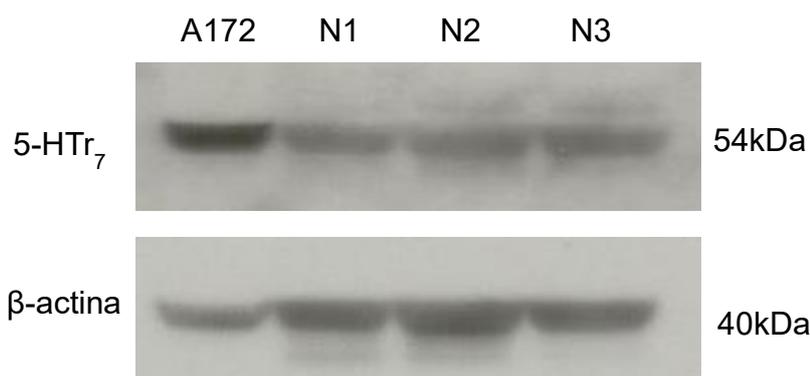


Fig.6: Identificação do receptor 5-HT₇ em neutrófilos humanos e na linhagem celular A172. Neutrófilos de três indivíduos saudáveis foram isolados do sangue periférico e lisados em tampão RIPA com inibidor de proteases. Foi realizado um *western blotting* com as proteínas do lisado para identificação do 5-HT₇. Como controle positivo da expressão do receptor foram utilizadas células da linhagem A172, de neuroglioblastoma humano, cuja expressão do 5-HT₇ é constitutiva. Como controle da técnica foi identificada a β-actina. n=3.

5.2 SB reverte a atividade inibitória da 5-HT em neutrófilos de indivíduos saudáveis: Determinação da concentração de trabalho

Primeiramente foi investigado, através de uma curva dose-resposta, qual concentração do antagonista seletivo de 5-HT₇, SB, poderia anular os efeitos da 5-HT sobre os neutrófilos. Foi visto então que a 5-HT inibiu a produção de ROS por neutrófilos de indivíduos saudáveis frente ao estímulo de *C. albicans*. Quando bloqueado o 5-HT₇ com SB nas concentrações de 10⁻⁵M e 10⁻⁴M a formação de ROS pelos neutrófilos é recuperada próximo ao nível do controle não exposto previamente ao neurotransmissor (**Figura 7**).

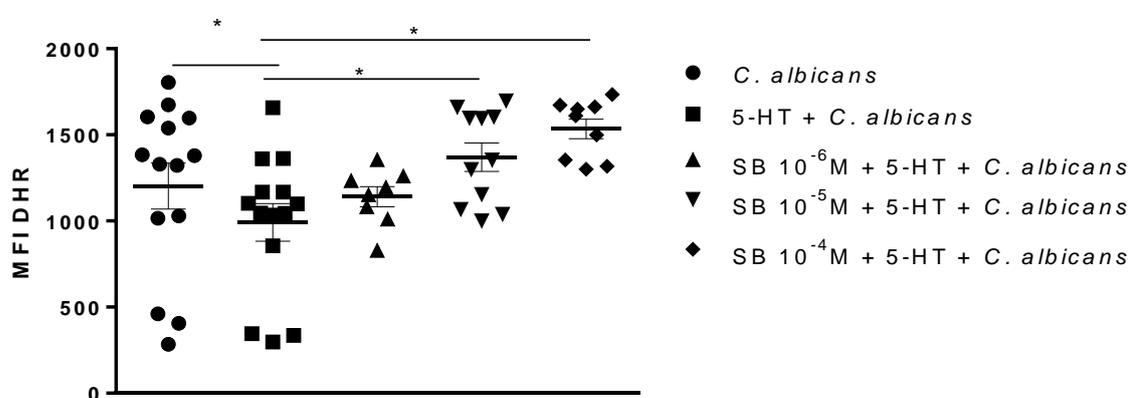


Fig.7: Efeito de diferentes concentrações de SB e da 5-HT na produção de ROS por neutrófilos de indivíduos saudáveis estimulados com *C. albicans* (MOI = 3). Após 30min de incubação com SB, 1h de incubação com 5-HT, 20min de DHR e 30min de estímulo com *C. albicans*, a fluorescência da DHR oxidada foi lida em espectrofotômetro. ANOVA one way seguido do pós teste de tukey. n=8. *p<0,05.

Observando-se que a pré-exposição dos neutrófilos ao antagonista seletivo do 5-HT₇ reverteu os efeitos inibitórios da 5-HT sobre a produção de ROS, a concentração de 10⁻⁵M, menor concentração onde o efeito do antagonista foi observado, foi escolhida para os ensaios posteriores.

5.3 SB reverte a atividade inibitória da 5-HT em neutrófilos de indivíduos saudáveis

Como pode ser observado na figura 2, a 5-HT inibiu a produção de ROS (**Figura 8A**) e a formação de NET por neutrófilos de indivíduos saudáveis (**Figura 8B**) em resposta à *C. albicans*, e a exposição prévia ao SB 10^{-5} M reverteu o efeito da 5-HT significativamente, restaurando os mecanismos microbicidas avaliados a nível semelhante ao controle na ausência de 5-HT.

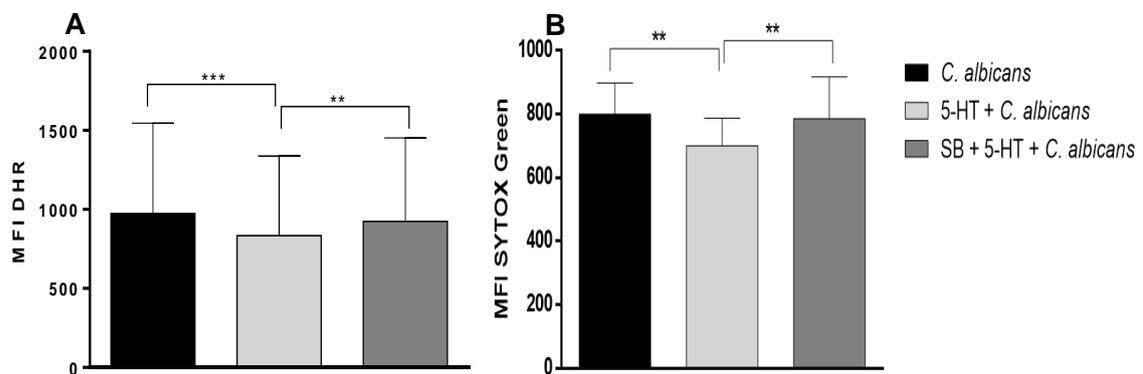


Fig. 8: Impacto da 5-HT na resposta do neutrófilo à *C. albicans* e efeito do SB sobre esse mecanismo. Neutrófilos de indivíduos saudáveis foram pré-incubados com SB (10^{-5} M) por 30 minutos e então foram expostos à 5-HT (10^{-8} M) por 1h. Os neutrófilos foram estimulados com *C. albicans* (MOI = 3) por 30 minutos para quantificação de ROS (A); e por 3h para quantificação da formação de NETs (B). Dados analisados por ANOVA com pós teste de Tukey, n=11. ** p<0,01, ***p<0,001.

De forma semelhante, a pré-incubação com SB também reverteu o efeito inibidor da 5-HT sobre a atividade candidada dos neutrófilos. Na **figura 9** é possível perceber que na presença de 5-HT houve menor redução da atividade respiratória das leveduras após interação com neutrófilos em comparação com o controle sem exposição ao neurotransmissor. Interessantemente, ao bloquear o 5-HT₇ esse efeito supressor da 5-HT não é mais observado.

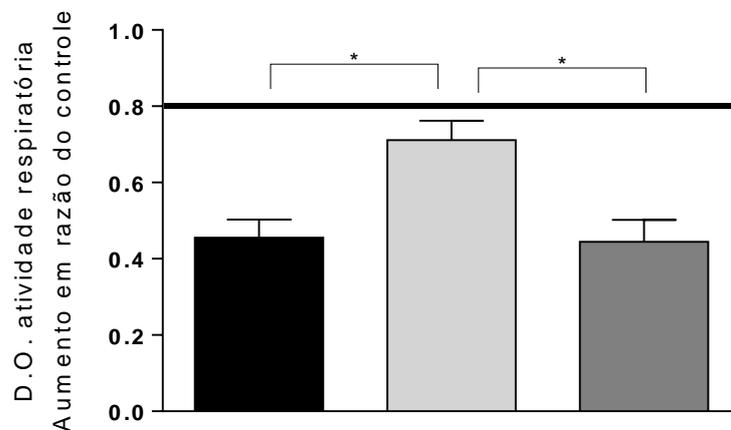


Fig. 9: Neutrófilos de indivíduos saudáveis foram pré-incubados com SB ($10^{-5}M$) por 30 minutos e então foram expostos à 5-HT ($10^{-8}M$) por 1h. Os neutrófilos foram estimulados com *C. albicans* (MOI = 3) por 2,5h para quantificação da atividade candidacida, que foi apresentada como razão da D.O. obtida no controle *C. albicans* incubado na ausência de neutrófilos, representada pela linha preta. Dados analisados por ANOVA com pós teste de Tukey, n= 11. * $p < 0,05$.

5.4 Cisaprida não exerce efeito na resposta do neutrófilo contra *C. albicans*

Decidiu-se avaliar ainda outro receptor de 5-HT, o 5-HT_{r4}, que ao ser ativado, assim como o 5-HT_{r7}, promove o aumento da concentração de AMPc no meio intracelular. Para tanto foi utilizado cisaprida, um agonista seletivo do 5-HT_{r4}.

Foi então observado que a pré-exposição *in vitro* de neutrófilos de indivíduos saudáveis a concentrações crescentes de cisaprida não alterou a produção de ROS (**Figura 10A**) e a formação de NET (**Figura 10B**) em resposta à *C. albicans* em comparação ao controle apenas estimulado com a levedura, na ausência de cisaprida. Consequentemente a atividade candidacida dos neutrófilos também não foi alterada pela cisaprida (**Figura 10C**).

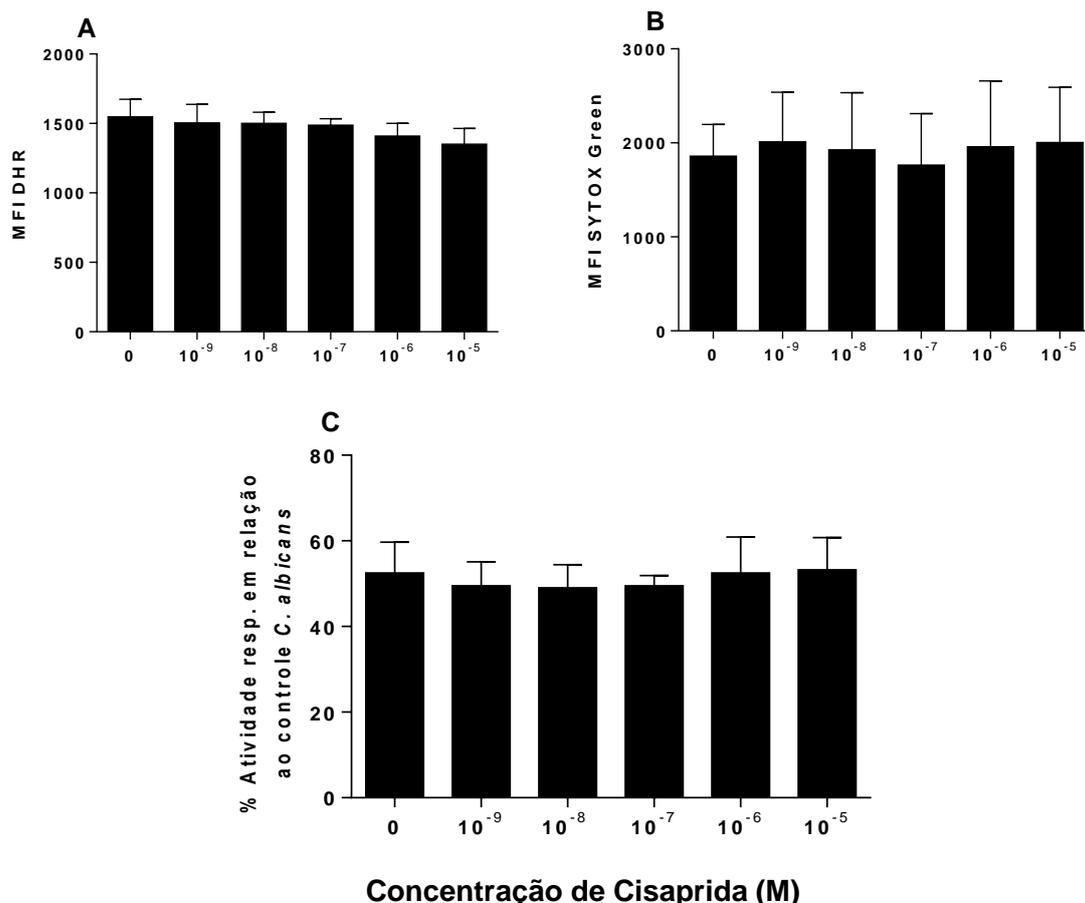


Fig.10: Efeito de diferentes concentrações de Cisaprida na produção de ROS (A), formação de NET (B) e atividade candidacida (C) de neutrófilos de indivíduos saudáveis. (A) Após 1h de incubação com Cisaprida, 20min de DHR e 30min de estímulo com *C. albicans* (MOI = 3) para produção de ROS, ou (B) 3h de estímulo com *C. albicans* (MOI = 3) seguido de 20min de incubação com SYTOX green para quantificação da formação de NET, a fluorescência da DHR oxidada ou do SYTOX green foi lida em espectrofotômetro. (C) Ao final da incubação com cisaprida os neutrófilos estimulados com *C. albicans* (MOI = 3) por 2,5h para quantificação da atividade candidacida, através da redução do XTT pela atividade respiratória da *C. albicans* remanescente no sobrenadante, que foi apresentada como porcentagem em relação ao controle *C. albicans* incubado na ausência de neutrófilos. Dados analisados por ANOVA com pós teste de Tukey, n= 4.

5.5 Neutrófilos de indivíduos em tratamento com SSRI não são estimulados à produção de ROS e formação de NET em resposta à *C. albicans*

Interessantemente, de maneira diferente do que já foi relatado em estudo anterior do nosso grupo (TEIXEIRA, 2016) com neutrófilos de indivíduos saudáveis, os neutrófilos dos indivíduos em uso de SSRI não produziram ROS e não formaram NET de forma significativa sob estímulo de *C. albicans*. Contudo, essas células, assim como o que foi visto anteriormente nas células de indivíduos saudáveis,

ainda respondem à 5-HT, dado que quando pré-expostas a esse neurotransmissor têm a produção de ROS e a formação de NET em resposta à *C. albicans* reduzida de forma significativa quando comparados aos neutrófilos estimulados na ausência do neurotransmissor (**Figura 11**).

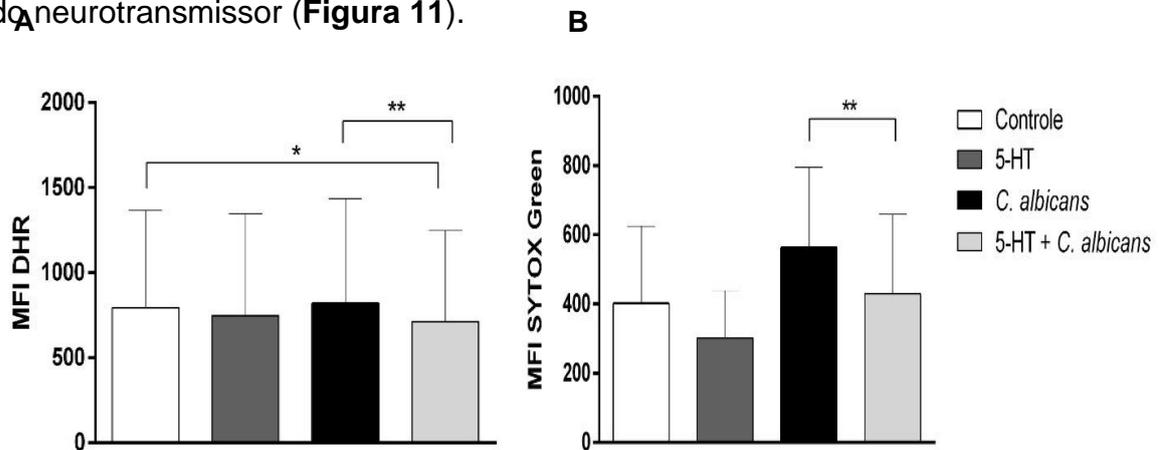


Fig. 11: Impacto da 5-HT na resposta de neutrófilos de indivíduos em tratamento com SSRI à *C. albicans*. Neutrófilos de indivíduos em uso de SSRI foram pré-incubados com 5-HT (10^{-8} M) por 1h seguidos de 20min de DHR e 30min de estímulo com *C. albicans* (MOI = 3) para quantificação da produção de ROS (A), ou (B) 3h de estímulo com *C. albicans* (MOI = 3) seguido de 20min de incubação com SYTOX green para quantificação da formação de NET, a fluorescência da DHR oxidada ou do SYTOX green foi lida em espectrofotômetro. Dados analisados por ANOVA com pós teste de Tukey, n=9. *p<0,05 e **p<0,01.

Embora tendo sido observado que os mecanismos microbicidas estudados não foram ativados de forma significativa, os neutrófilos dos indivíduos em uso de SSRI ainda apresentaram atividade candidacida, e essa foi limitada significativamente quando esses neutrófilos foram pré-tratados com 5-HT, dado que a atividade respiratória das leveduras recuperadas do sobrenadante foi maior naquelas culturas expostas à 5-HT (**Figura 12A**). Efeito este associado ao maior número de UFC recuperadas no sobrenadante destas culturas em comparação com as culturas não expostas ao neurotransmissor (**Figura 12B**).

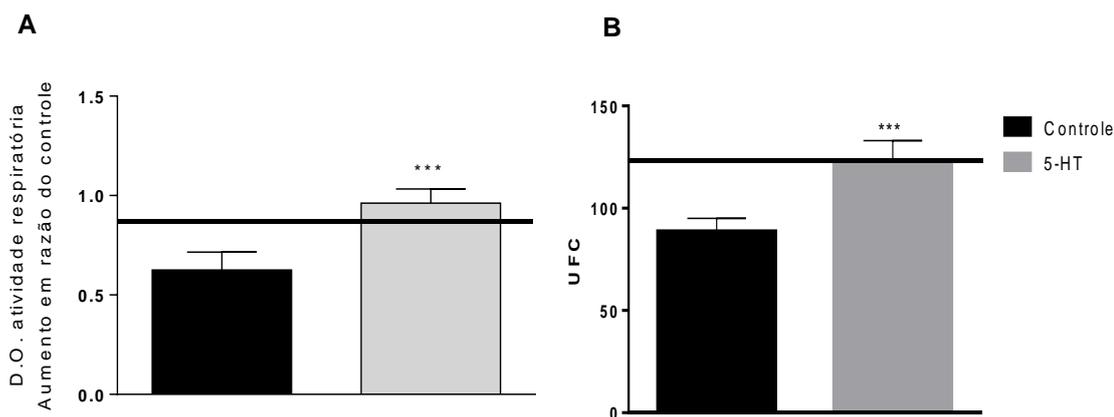


Fig. 12: Efeito da 5-HT na atividade candidada de neutrófilos de indivíduos em uso de SSRI. Neutrófilos de indivíduos em uso de SSRI foram pré-incubados com 5-HT (10^{-8} M) por 1h e foram então estimulados com *C. albicans* (MOI = 3) por 2,5h. Após a incubação os neutrófilos foram lisados e as leveduras recuperadas no sobrenadante e incubadas com XTT para quantificação da atividade respiratória (A); e plaqueadas para contagem de UFC (B). Ambas as análises foram demonstradas como razão em relação ao controle *C. albicans* incubado na ausência de neutrófilos representado pela linha preta. Dados analisados por ANOVA com pós-teste de Tukey, n=9. ***p<0,001.

5.6 Neutrófilos de indivíduos em tratamento com SSRI têm menor capacidade responsiva à *C. albicans in vitro* quando comparados a neutrófilos de indivíduos que não utilizam essa classe de fármaco.

Uma vez demonstrado que neutrófilos de indivíduos em tratamento com SSRI não produzem quantidades significativas de ROS e NET em resposta à *C. albicans*, quando comparados aos neutrófilos não estimulados, decidiu-se investigar se, quando comparados a neutrófilos de pessoas não tratadas com esses fármacos, esses neutrófilos apresentariam menor capacidade de resposta à *C. albicans in vitro*.

De maneira interessante foi observado que os neutrófilos de indivíduos em uso de SSRI demonstraram menor capacidade de produção de ROS (**Figura 13A**) e formação de NET (**Figura 13B**) frente à exposição de *C. albicans* quando comparados com neutrófilos de indivíduos saudáveis.

Visto isso, como era de se esperar, os neutrófilos dos indivíduos sob uso de SSRI, conseqüentemente, apresentaram atividade candidada significativamente inferior à dos neutrófilos de indivíduos saudáveis, (**Figura 14**) sendo possível observar maior atividade respiratória das leveduras recuperadas do sobrenadante de neutrófilos de indivíduos em uso de SSRI, quando comparado à cultura de neutrófilos de indivíduos saudáveis (**Figura 14A**). Dado esse associado

ao maior número de UFC recuperado das culturas dos indivíduos em tratamento (Figura 14B).

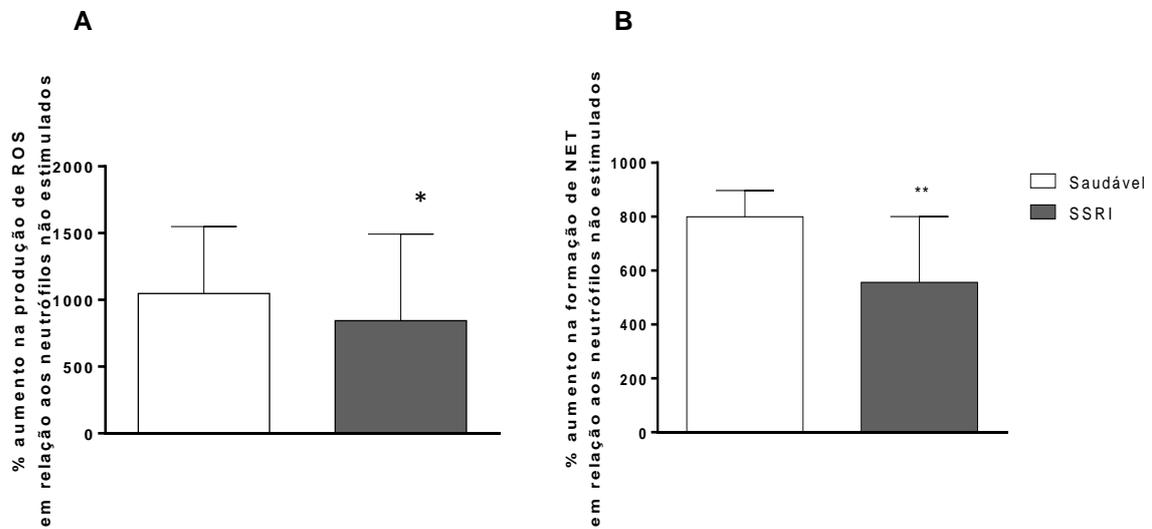


Fig. 13: Comparação da resposta à *C. albicans* de neutrófilos de indivíduos em uso de SSRI e de indivíduos saudáveis. Neutrófilos de indivíduos saudáveis e de indivíduos em uso de SSRI foram (A) incubados por 20min com DHR e estimulados com *C. albicans* (MOI = 3) por 30 minutos para quantificação de ROS ou (B) estimulados por 3h com *C. albicans* (MOI = 3) seguido de 20min de incubação com SYTOX green para quantificação da formação de NET, a fluorescência da DHR oxidada ou do SYTOX green foi lida em espectrofotômetro. A resposta à *C. albicans* dos grupos saudáveis e SSRI foi calculada como porcentagem dos respectivos controles de neutrófilos incubados na ausência de *C. albicans*. Dados analisados por Teste T de Student, Saudáveis n=11, SSRI n= 9. *p<0,05 e **p<0,01.

A

B

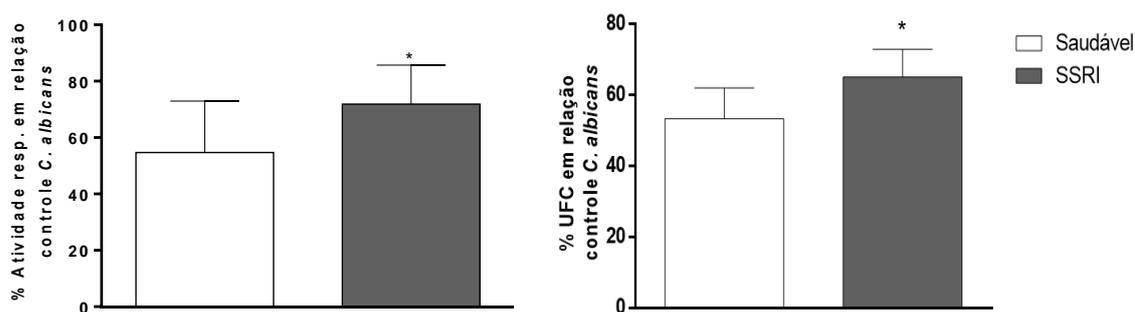


Fig. 14: Comparação da atividade candidacida de neutrófilos de indivíduos em uso de SSRI e de indivíduos saudáveis. Neutrófilos de indivíduos saudáveis e de indivíduos em uso de SSRI foram estimulados com *C. albicans* (MOI = 3) por 2,5h. Após a incubação os neutrófilos foram lisados e as leveduras recuperadas no sobrenadante e incubadas com XTT para quantificação da atividade respiratória (A), e plaqueadas para contagem de UFC (B). Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle *C. albicans* incubada na ausência de neutrófilos. Dados analisados por Teste T de Student, Saudáveis n=11, SSRI n= 9. *p<0,05.

5.7 SSRIs não alteram a resposta *in vitro* de neutrófilos de indivíduos saudáveis à *C. albicans*

Visto que, *in vitro*, neutrófilos de indivíduos em uso de SSRI possuem resposta reduzida à *C. albicans*, foi decidido avaliar se essa inibição poderia ser decorrente diretamente da atuação do fármaco no neutrófilo.

Para tanto foram selecionados dois fármacos SSRI, o cloridrato de fluoxetina e o oxalato de escitalopram, em concentrações *in vitro* correspondentes a concentrações utilizadas no tratamento, levando em consideração a biodisponibilidade plasmática, de diversas morbidades que poderiam responder aos SSRI.

Observou-se que o cloridrato de fluoxetina não exerceu nenhum efeito, em nenhuma das concentrações testadas, na produção de ROS (**Figura 15A**), formação de NET (**Figura 15B**) e atividade candidacida (**Figura 15C**) de neutrófilos de indivíduos saudáveis.

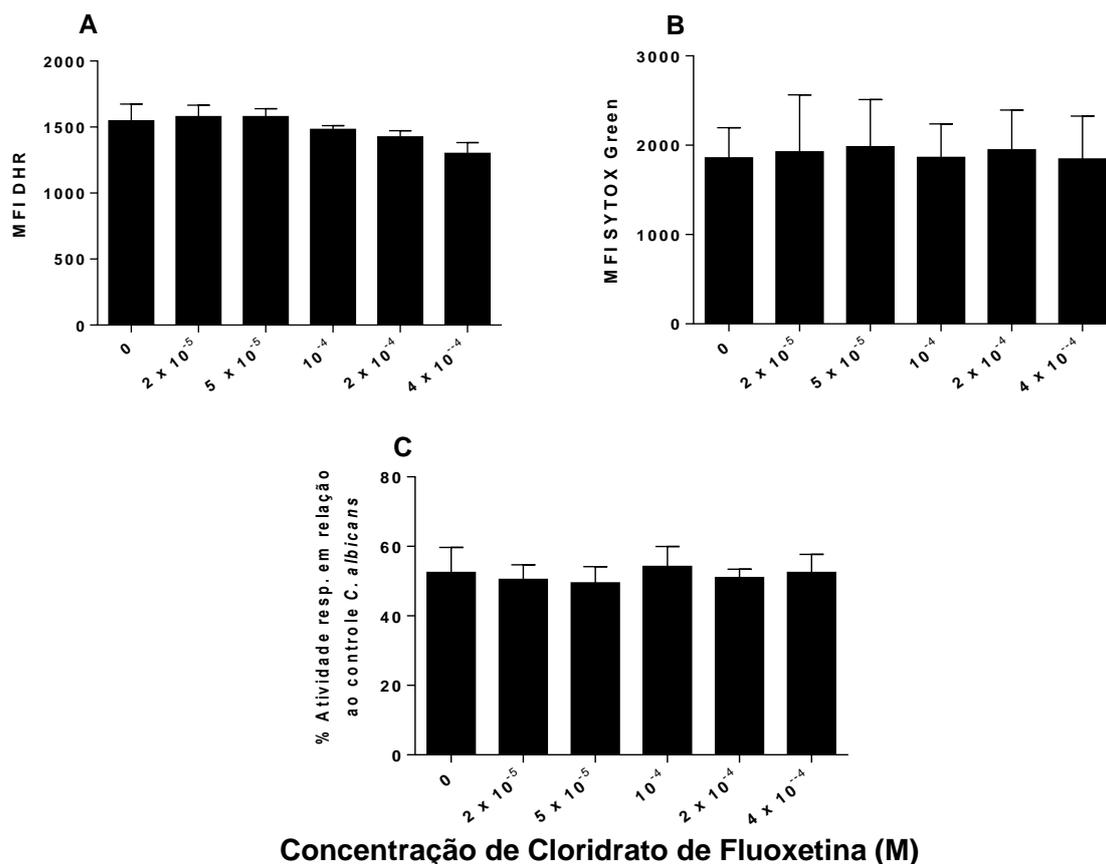


Fig. 15. Efeito de diferentes concentrações de Cloridrato de fluorecetina na produção de ROS (A), formação de NET (B) e atividade candidacida (C) de neutrófilos de indivíduos saudáveis. (A) Após 1h de incubação com Fluorecetina, 20min de DHR e 30min de estímulo com *C. albicans* (MOI = 3) para quantificação da produção de ROS, ou (B) 3h de estímulo com *C. albicans* (MOI = 3) seguido de 20min de incubação com SYTOX green para quantificação da formação de NET, a fluorescência da DHR oxidada ou do SYTOX green foi lida em espectrofotômetro. (C) Neutrófilos de indivíduos saudáveis foram pré-incubados com Fluorecetina por 1h e estimulados com *C. albicans* (MOI = 3) por 2,5h para quantificação da atividade candidacida, através da redução do XTT pela atividade respiratória da *C. albicans* remanescente no sobrenadante, que foi apresentada como porcentagem em relação ao controle *C. albicans* incubado na ausência de neutrófilos. Dados analisados por ANOVA com pós-teste de Tukey, n=4.

Da mesma forma que o Cloridrato de Fluorecetina, o Oxalato de Escitalopram também não exerceu nenhum efeito *in vitro*, em nenhuma das concentrações estudadas na produção de ROS (Figura 16A) formação de NET (Figura 16B) ou atividade microbicida (Figura 16C) por neutrófilos de indivíduos saudáveis à *C. albicans*.

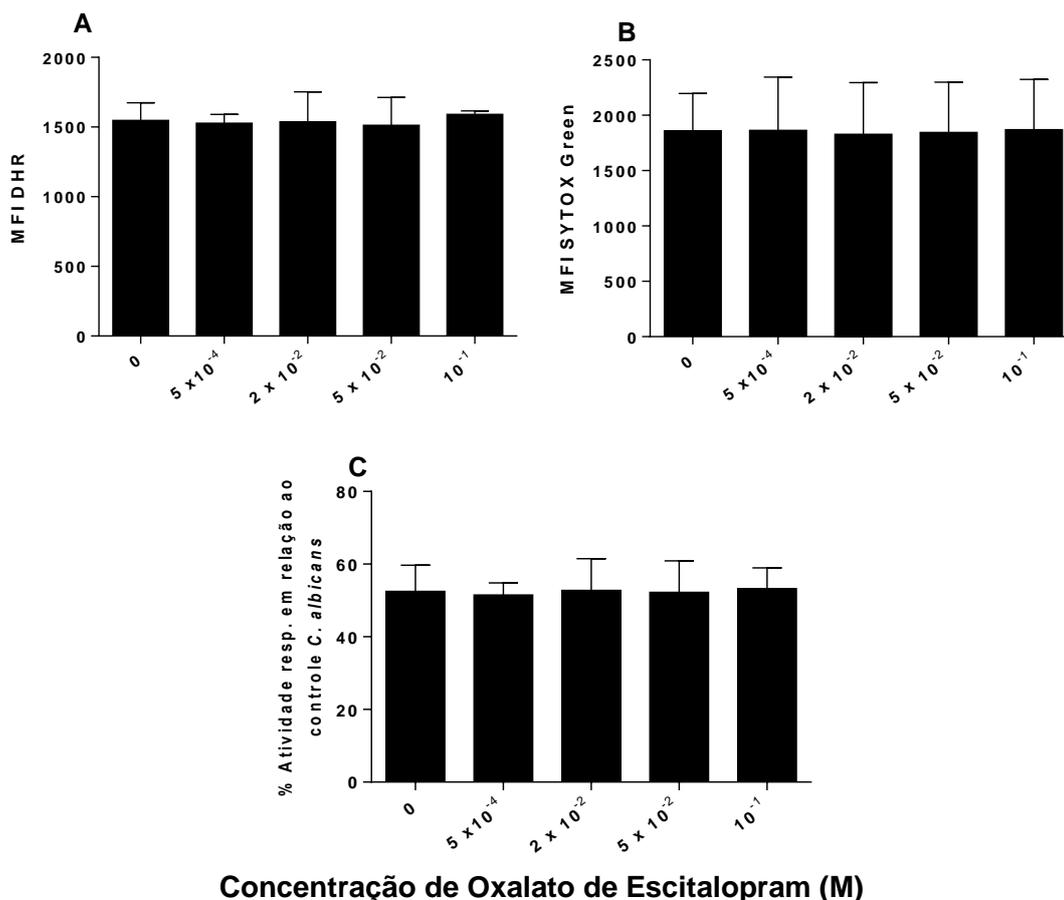


Fig. 16: Efeito de diferentes concentrações de Oxalato de Escitalopram na produção de ROS (A), formação de NET (B) e atividade candidacida (C) de neutrófilos de indivíduos saudáveis. (A) Após 1h de incubação com Escitalopram, 20min de DHR e 30min de estímulo com *C. albicans* (MOI = 3) para quantificação da produção de ROS, ou (B) 3h de estímulo com *C. albicans* (MOI = 3) seguido de 20min de incubação com SYTOX green para quantificação da formação de NET, a fluorescência da DHR oxidada ou do SYTOX green foi lida em espectrofotômetro. (C) Neutrófilos de indivíduos saudáveis foram pré-incubados com Escitalopram por 1h e estimulados com *C. albicans* (MOI = 3) por 2,5h para quantificação da atividade candidacida, através da redução do XTT pela atividade respiratória da *C. albicans* remanescente no sobrenadante, que foi apresentada como porcentagem em relação ao controle *C. albicans* incubado na ausência de neutrófilos. Dados analisados por ANOVA com pós-teste de Tukey, n=4.

6 DISCUSSÃO

O papel da 5-HT no SNC tem sido explorado e estão bem estabelecidas as diversas funções dessa monoamina atuando como neurotransmissor. No entanto, a maior concentração de 5-HT no organismo se encontra fora do SNC, no plasma, onde uma pequena fração circula livre e a maior parte é transportada pelas plaquetas, que têm a mesma capacidade de recaptação, estoque e liberação de 5-HT do que os neurônios serotoninérgicos (DA PRADA *et al.*, 1988). As plaquetas fazem a recaptação de 5-HT do plasma através do SERT, uma proteína carreadora que utiliza do potencial de membrana gerado durante transporte de Na^+/K^+ contra o gradiente, para transportar a 5-HT do meio extracelular para o citosol. Dessa forma, a ação do SERT nas plaquetas regula a concentração de 5-HT plasmática, e assim, as drogas da classe SSRI, que atuam bloqueando esse transportador, podem atuar tanto no SNC, aumentando a concentração de 5-HT na fenda pré-sináptica, mas também na periferia, alterando a concentração de 5-HT plasmática. Diversos estudos demonstraram que o uso desses fármacos aumenta a concentração de 5-HT no plasma (ALMEIDA-MONTES, LUIS G. *et al.*, 2000; BENNINGHOFF *et al.*, 2012; BLARDI *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2013), contudo, alguns outros demonstraram que esta concentração diminui após o uso de SSRI (ALVAREZ *et al.*, 1999; LI, XIA *et al.*, 2015). Essa discrepância de resultados pode estar relacionada ao período de tratamento com os fármacos, que entre esses trabalhos varia de algumas horas até 2 anos, ou a técnica utilizada para dosagem da 5-HT.

Já foi demonstrado que a 5-HT pode apresentar tanto efeito imunoestimulador quanto imunossupressor em diversos leucócitos, uma consequência da presença de receptores para 5-HT na membrana plasmática dessas células e do contato com a 5-HT periférica, seja no plasma ou no tecido. Alguns trabalhos já relataram que a 5-HT pode estimular células dendríticas imaturas via 5-HT₄ e as maduras via 5-HT₇ (HOLST, KATRIN *et al.*, 2015a), enquanto que um outro trabalho mostrou que a 5-HT pode induzir um fenótipo anti-inflamatório em macrófagos, fenótipo M2, pela via dos 5-HT₂ e 5-HT₇ (DE LAS CASAS-ENGEL; DOMÍNGUEZ-SOTO; SIERRA-FILARDI; BRAGADO; NIETO; PUIG-KROGER; SAMANIEGO; LOZA; CORCUERA; GÓMEZ-AGUADO;

BUSTOS; SÁNCHEZ-MATEOS; CORBÍ; *et al.*, 2013). Até o momento apenas três estudos avaliaram o efeito da 5-HT em neutrófilos periféricos humanos, demonstrando que esse neurotransmissor pode inibir a produção de ROS (CÍZ *et al.*, 2007; SCHUFF-WERNER *et al.*, 1995) via 5-HT₂ (PRACHAŘOVÁ *et al.*, 2010). Dados prévios do nosso grupo demonstraram que a 5-HT, *in vitro*, inibe a resposta de neutrófilos de indivíduos saudáveis contra *C. albicans* e dando continuidade a estas análises, o presente estudo se propôs a identificar por qual, ou quais, dos receptores esse efeito poderia estar ocorrendo. Segundo nossos dados, na presença de 5-HT, os neutrófilos apresentavam, entre outros efeitos, sua capacidade de produção de ROS, degranulação e formação de NET reduzidas, e segundo dados da literatura, esses mecanismos poderiam ser inibidos pelo aumento da concentração de AMPc citoplasmático (BOURNE *et al.*, 1971; COX, J P; KARNOVSKY, 1973; SHISHIKURA *et al.*, 2016; WEISSMANN; ZURIER; HOFFSTEIN, 1972). Dentre os sete possíveis receptores de 5-HT descritos, apenas três têm como via de sinalização a ativação da enzima adenilato ciclase e, conseqüentemente, o aumento do segundo mensageiro citoplasmático AMPc (MCCORVY; ROTH, 2015). O AMPc atua na via da proteína quinase A (PKA) ativando proteínas tirosinas fosfatases contendo o domínio 2 de homologia à Src (SHP-1) envolvidas na inibição das vias de ativação celular (CERNY *et al.*, 2015), o que vem reforçar nossa hipótese de que a 5-HT, ao interagir com seus receptores na membrana de neutrófilos, induziria elevação de AMPc e conseqüentemente promoveria inibição das funções efetoras destas células. Assim, o presente estudo se deteve na investigação da expressão dos receptores que têm o AMPc como segundo mensageiro, 5-HT₄, 5-HT₆ e 5-HT₇ (MCCORVY; ROTH, 2015) demonstrando pela primeira vez que neutrófilos expressam o 5-HT₇. Ademais, foi demonstrado que esse receptor é funcional, dado que a 5-HT deixa de inibir a produção de ROS, formação de NET e atividade candidacida dos neutrófilos quando esses são pré-incubados com SB, antagonista seletivo desse receptor. A possibilidade da resposta do neutrófilo à 5-HT ocorrer através do receptor 5-HT₄, que também sinaliza via AMPc, foi também avaliada. Foi visto que na presença de cisaprida, agonista seletivo de 5-HT₄, não há modulação da resposta de neutrófilos à *C. albicans*, ao menos em relação aos parâmetros investigados nesse estudo. Não tendo sido demonstrada a expressão deste receptor através da identificação

da proteína, apenas pode-se apontar que o estímulo do neutrófilo por um agonista de 5-HT₄ não modula os mecanismos microbicidas ativados por *C. albicans* avaliados nesse estudo. Outros trabalhos já demonstraram a presença de 5-HT₇ em outras células do sistema imune. Dürk e colaboradores (2005) demonstraram que monócitos humanos estimulados com agonistas de 5-HT₄ e 5-HT₇, de fato, apresentam aumento nos níveis de AMPc intracelular e que, através destes receptores, a 5-HT induz nestas células inibição da produção de TNF- α e aumento da produção de IL-6 e IL-8 (DÜRK *et al.*, 2005). Mais recentemente, De Las Casas-Engel e colaboradores (2013) mostraram que monócitos humanos diferenciados em macrófagos M2 *in vitro*, quando estimulados por LPS mantêm sua diferenciação em M2 na presença de 5-HT, que exerce este efeito através da interação com o 5-HT₇ (DE LAS CASAS-ENGEL; DOMÍNGUEZ-SOTO; SIERRA-FILARDI; BRAGADO; NIETO; PUIG-KROGER; SAMANIEGO; LOZA; CORCUERA; GÓMEZ-AGUADO; BUSTOS; SÁNCHEZ-MATEOS; CORBÍ; *et al.*, 2013).

Ao demonstrar a expressão e a atividade de um receptor de 5-HT por neutrófilos, fica evidente a possibilidade de modulação destas células pela 5-HT, de tal forma que a exposição a maiores níveis do neurotransmissor, possível efeito do uso de SSRI, pode afetar as funções destas células. Em modelo murino, foi visto que o tratamento com fluoxetina, através da elevação de 5-HT plasmática, induziu aumento da expressão de CD62L em leucócitos favorecendo a interação com o endotélio e, conseqüentemente, a migração dessas células (HERR *et al.*, 2014).

Até o momento nenhum trabalho havia avaliado especificamente a função de neutrófilos de indivíduos em tratamento com SSRI. No presente estudo foi demonstrado que os neutrófilos desses indivíduos, quando estimulados *in vitro* com *C. albicans*, não produzem quantidades significativas de ROS e também não formam NET, quando comparados aos neutrófilos sem estímulo. Embora menos responsivos, ao menos nos parâmetros estudados nesse trabalho, os neutrófilos desses indivíduos em tratamento ainda possuem atividade candidacida, a qual é possivelmente relacionada a outros mecanismos microbicidas eficazes na eliminação do fungo que não tenham sido afetados pelo uso de SSRI, como a degranulação, por exemplo. Entretanto, quando comparadas estas mesmas atividades entre neutrófilos de indivíduos em uso de SSRI e de indivíduos que não fazem tratamento com esses fármacos, dados interessantes foram observados. A

atividade candidada dos neutrófilos de indivíduos em uso de SSRI foi significativamente menor, o que pode ser devido justamente à menor capacidade de produção de ROS e formação de NET em resposta à *C. albicans* apresentadas por estas células.

Interessantemente, os neutrófilos dos pacientes em tratamento com SSRI, embora não tenham demonstrado resposta significativa à *C. albicans*, ainda possuem alguma responsividade à presença de 5-HT em cultura, assim como ocorre em neutrófilos de indivíduos sem tratamento (TEIXEIRA, 2016), essas células possuem sua produção de ROS e formação de NET inibidas, além de redução de sua atividade candidada. Na literatura científica não são incomuns os relatos de infecções virais ou bacterianas em indivíduos sob o uso de SSRI (DETKE *et al.*, 2004b; ROGERS *et al.*, 2013; SATO, YASUSHI; NAKAMURA; YASUI-FURUKORI, 2015), já tendo sido inclusive, relatado o risco de reativação do Herpes simplex durante o tratamento com estes fármacos (REED; GLICK 1991). Nenhum destes estudos investigou as causas ou os mecanismos associados a estas correlações, contudo, à luz dos dados demonstrados no presente estudo, é plausível sugerir que a maior disponibilidade de 5-HT plasmática pode contribuir para afetar as funções imunes destes indivíduos.

A constatação que a 5-HT inibiu a atividade de neutrófilos de indivíduos em uso de SSRI e que estas células foram menos responsivas ao estímulo da *C. albicans* do que as células de indivíduos saudáveis, sugere que o mecanismo pelo qual os SSRI poderiam causar esse efeito nos neutrófilos seria através do aumento da concentração de 5-HT plasmática. Contudo, não se pode descartar a hipótese de ser um efeito direto do fármaco no neutrófilo, visto que diversos trabalhos já demonstraram a capacidade anti-inflamatória e imunossupressora dessas drogas. Nesse contexto, foi visto que a fluoxetina reduziu a sinalização do TCR via bloqueio da saída de Ca^{2+} dos retículos endoplasmáticos de linfócitos T ativados com anti-CD3 e anti-CD28, dessa forma inibindo a ativação e proliferação dessas células (GOBIN, V. *et al.*, 2015). Por outro lado, um trabalho mais antigo, realizado em modelo murino, aponta que a inibição da proliferação dos linfócitos T pela fluoxetina ocorre devido ao aumento da concentração de 5-HT no meio extracelular, seguido da inibição da recaptação da 5-HT pelo bloqueio do SERT expresso nos linfócitos T (PELLEGRINO; BAYER, 2000). A maioria dos trabalhos investigou a atuação

anti-inflamatória dos SSRI nos linfócitos e a aplicação desses fármacos na atenuação de doenças autoimunes e na rejeição a transplantes, como revisado por V. Gobin e colaboradores (GOBIN, VEERLE *et al.*, 2014). Nenhum trabalho demonstrou até então os efeitos do uso destes fármacos em neutrófilos. Visto isso e a fim de verificar se a inibição da atividade dos neutrófilos também poderia ser determinada por efeito direto dos fármacos, dois dos SSRI, a fluoxetina, o mais antigo, liberado pela FDA em 1987, e com maior número de efeitos colaterais, e o escitalopram, o mais recente, liberado em 2001, com menor número de efeitos colaterais e o mais prescrito entre os SSRI, foram testados (GARTLEHNER; HANSEN; THIEDA; *et al.*, 2007; SGHENDO; MIFSUD, 2012; WADE; DESPIEGEL; REINES, 2006), quanto à capacidade de modular neutrófilos de indivíduos saudáveis. Nossos dados demonstraram que nenhum dos dois fármacos testados, em nenhuma das doses avaliadas, doses essas relativas às utilizadas no tratamento clínico, foi capaz de modular a resposta *in vitro* de neutrófilos à *C. albicans* em relação à produção de ROS, formação de NET e atividade candidada. Esse dado, apesar de preliminar, reforça a hipótese de que a inibição da atividade de neutrófilos vista em indivíduos em tratamento com SSRI acontece em decorrência do aumento de 5-HT plasmática, consequente da ação dos SSRI.

A infecção por *C. albicans* gera inflamação ativando as plaquetas a liberarem 5-HT no local de infecção, o que promove elevação da concentração deste neurotransmissor que se soma à concentração basal presente no plasma (BOEHME *et al.*, 2004; KONIG; JAEGER; KONIG, 1994; KUSHNIR-SUKHOV *et al.*, 2006; MÖSSNER; LESCH, 1998). Indivíduos sob o uso de SSRI podem ter uma elevação dos níveis basais plasmáticos de 5-HT e esse aumento somado à elevação normal que ocorre durante a infecção poderia refletir em supressão da atividade de neutrófilos como a encontrada no presente trabalho (ALMEIDA-MONTES, L G *et al.*, 2000; BENNINGHOFF *et al.*, 2012; BLARDI *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2013). A venda de SSRI nos últimos dez anos dobrou em todo o mundo (MATHERS; LONCAR, 2005; MOUSSAVI *et al.*, 2007; NIELSEN; HANSEN; GØTZSCHE, 2013). Mais indivíduos são expostos a essas drogas, as quais ainda não têm todos os seus efeitos colaterais e adversos e seu mecanismo de ação totalmente elucidados. Esses fármacos apenas estão liberados pelo FDA e pela ANVISA para o tratamento de Transtorno depressivo maior e seus espectros, e,

embora a incidência de depressão tenha aumentado na população mundial, parte do aumento das vendas desses fármacos é devida a prescrição para tratamentos não preconizados pelas agências reguladoras. Além disso, a recomendação é que apenas psiquiatras receitem essas drogas, porém, diversas especialidades médicas são encontradas entre as receitas retidas durante a venda dos SSRI (MATHERS; LONCAR, 2005; MOUSSAVI *et al.*, 2007; STONE; VIERA; PARMAN, 2003). Ademais, a eficácia do uso desses fármacos ainda não foi comprovada em nenhuma das suas indicações, sejam elas recomendadas ou não (FOURNIER *et al.*, 2013; GARTLEHNER; HANSEN; MORGAN; *et al.*, 2007; JACOBSEN; MEDVEDEV; CARON, 2012; KIRSCH *et al.*, 2008; LACASSE; LEO, 2005; LANG; BORGWARDT, 2013; MURROUGH; CHARNEY, 2012; SKAPINAKIS *et al.*, 2010). Esse trabalho, embora preliminar, demonstrou que neutrófilos têm sua atividade inibida pela 5-HT através da interação com o receptor 5-HT₇ e que os neutrófilos de pacientes em uso de SSRI são menos responsivos a um estímulo infeccioso, sugerindo mais uma possível intercorrência do uso de SSRI.

7 CONCLUSÃO

Neutrófilos isolados de sangue periférico humano expressam o receptor de 5-HT 5-HT₇, e através deste receptor foi inibida a produção de ROS, formação de NET e atividade microbicida de neutrófilos de indivíduos saudáveis estimulados *in vitro* com *C. albicans*. Já o receptor 5-HT₄ não teve envolvimento na modulação da atividade das células.

A resposta *in vitro* à *C. albicans* demonstrada por neutrófilos de indivíduos em uso de SSRI foi passível de inibição pela 5-HT e foi significativamente menor do que a resposta de neutrófilos de indivíduos saudáveis. Tal comportamento observado nos neutrófilos de pacientes não foi devido à ação direta dos fármacos, fluoxetina ou escitalopram, sobre estas células.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, Milan; PURI, Veena; PURI, Sanjeev. Serotonin and CGRP in migraine. *Annals of Neurosciences*, v. 19, n. 2, p. 88–94, 2012.

AHERN, Gerard P. 5-HT and the immune system. *Current opinion in pharmacology*, v. 11, n. 1, p. 29–33, 2011.

AHLENIUS, Sven; LARSSON, Knut; SVENSSON, Lennart. Further evidence for an inhibitory role of central 5-HT in male rat sexual behavior. *Psychopharmacology*, v. 68, n. 3, p. 217–220, 1980.

ALMEIDA-MONTES, L G *et al.* Relation of serum cholesterol, lipid, serotonin and tryptophan levels to severity of depression and to suicide attempts. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN*, v. 25, n. 4, p. 371–7, set. 2000.

ALMEIDA-MONTES, Luis G. *et al.* Relation of serum cholesterol, lipid, serotonin and tryptophan levels to severity of depression and to suicide attempts. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN*, v. 25, n. 4, p. 371–7, set. 2000.

ALVAREZ, Jean Claude *et al.* Plasma serotonin level after 1 day of fluoxetine treatment: A biological predictor for antidepressant response? *Psychopharmacology*, v. 143, n. 1, p. 97–101, 1999.

ANDREOLI, Sérgio Baxter *et al.* Estrutura fatorial do questionário de morbidade psiquiátrica de adultos aplicado em amostras populacionais de cidades brasileiras * The factor structure of the adult psychiatry morbidity questionnaire (QMPA) in a community sample of Brazilian cities. 1994.

ARAŻNA, Magdalena; PRUCHNIAK, Michał P.; DEMKOW, Urszula. Reactive Oxygen Species, Granulocytes, and NETosis. *Adv Exp. Medicine, Biology-Neuroscience and respiration*. [S.l: s.n.], 2014. p. 1–7.

ARREOLA, Rodrigo *et al.* Immunomodulatory effects mediated by serotonin. *Journal of Immunology Research*, v. 2015, 2015.

BAGANZ, Nicole L.; BLAKELY, Randy D. A dialogue between the immune system and brain, spoken in the language of serotonin. *ACS Chemical Neuroscience*, v. 4, n. 1, p. 48–63, 2013.

BAIN, Judith M *et al.* Candida albicans Hypha Formation and Mannan Masking of beta-Glucan Inhibit Macrophage Phagosome Maturation. *mBio*, v. 5, n. 6, p. e01874-14, 2014.

BENNINGHOFF, Jens *et al.* The complex role of the serotonin transporter in adult neurogenesis and neuroplasticity. A critical review. *The World Journal of Biological Psychiatry*, v. 13, n. 4, p. 240–247, 2012.

BERGER, Miles; GRAY, John A.; ROTH, Bryan L. The Expanded Biology of Serotonin. *Annual Review of Medicine*, v. 60, n. 1, p. 355–366, 2009.

BLARDI, Patrizia *et al.* Serotonin and fluoxetine levels in plasma and platelets after fluoxetine treatment in depressive patients. *Journal of clinical psychopharmacology*, v. 22, n. 2, p. 131–136, 2002.

BOEHME, Stefen a. *et al.* Cutting edge: serotonin is a chemotactic factor for eosinophils and functions additively with eotaxin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 173, n. 6, p. 3599–603, 2004.

BORREGAARD, N; COWLAND, J B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, v. 89, n. 10, p. 3503–21, 1997.

BORREGAARD, Niels. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity*, v. 33, n. 5, p. 657–670, 2010.

BOURNE, Henry R *et al.* Human Leukocyte : Synthesis , Degradation , and Effects on Neutrophil Candidacidal Activity. *Journal of Clinical Investigation*, v. 50, n. December 1970, p. 920–929, 1971.

BRANZK, Nora *et al.* Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nature Immunology*, v. 15, n. 11, p. 1017–1025, 2014.

BRANZK, Nora; PAPAYANNOPOULOS, Venizelos. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Seminars in Immunopathology*, v. 35, n. 4, p. 513–530, 2013.

BROWN, Gordon D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nature Reviews Immunology*, v. 6, n. 1, p. 33–43, 2006.

BYRD, A. S. *et al.* An Extracellular Matrix-Based Mechanism of Rapid Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Candida albicans*. *The Journal of Immunology*, v. 190, n. 8, p. 4136–4148, 2013.

BYRD, ANGEL S. *et al.* NETOSIS IN NEONATES: EVIDENCE OF A ROS-INDEPENDENT PATHWAY IN RESPONSE TO FUNGAL CHALLENGE. *Journal of Infectious Diseases*, 2015.

CERNY, Ondrej *et al.* Bordetella pertussis Adenylate Cyclase Toxin

Blocks Induction of Bactericidal Nitric Oxide in Macrophages through cAMP-Dependent Activation of the SHP-1 Phosphatase. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 194, n. 10, p. 4901–13, 2015.

CÍZ, Milan *et al.* Serotonin modulates the oxidative burst of human phagocytes via various mechanisms. *Platelets*, v. 18, n. 8, p. 583–590, 2007.

CONTI, H R; GAFFEN, S L. Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells and mucosal candidiasis. *Microbes Infect*, v. 12, n. 7, p. 518–527, 2010.

COSTA, Ivete Conchon *et al.* Immune response to *Candida albicans*. *Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina*, v. 29, n. 1, p. 27–40, 2008.

COX, J P; KARNOVSKY, M L. The depression of phagocytosis by exogenous cyclic nucleotides, prostaglandins, and theophylline. *The Journal of cell biology*, v. 59, n. 2 Pt 1, p. 480–90, 1973.

COX, Joyce P.; KARNOVSKY, Manfred L. The depression of phagocytosis by exogenous cyclic nucleotides, prostaglandins, and theophylline. *Journal of Cell Biology*, v. 59, n. 2, p. 480–490, 1973.

DA PRADA, M. *et al.* Platelets as a model for neurones? *Experientia*, v. 44, n. 2, p. 115–126, 1988.

DANTAS, Alessandra Da Silva *et al.* Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules*, v. 5, n. 1, p. 142–165, 2015.

DARMON, Michèle *et al.* Insights into Serotonin Receptor Trafficking: Cell Membrane Targeting and Internalization. *Trafficking of GPCRs*, v. 132, p. 97–126, 2015.

DE LAS CASAS-ENGEL, Mateo; DOMÍNGUEZ-SOTO, Angeles; SIERRA-FILARDI, Elena; BRAGADO, Rafael; NIETO, Concha; PUIG-KROGER, Amaya; SAMANIEGO, Rafael; LOZA, Mabel; CORCUERA, María Teresa; GÓMEZ-AGUADO, Fernando; BUSTOS, Matilde; SÁNCHEZ-MATEOS, Paloma; CORBÍ, Angel L; *et al.* Serotonin Skews Human Macrophage Polarization through HTR2B and HTR7. *The Journal of Immunology*, v. 190, n. 5, p. 2301–2310, 2013.

DE LAS CASAS-ENGEL, Mateo; DOMÍNGUEZ-SOTO, Angeles; SIERRA-FILARDI, Elena; BRAGADO, Rafael; NIETO, Concha; PUIG-KROGER, Amaya; SAMANIEGO, Rafael; LOZA, Mabel; CORCUERA, María Teresa; GÓMEZ-AGUADO, Fernando; BUSTOS, Matilde; SÁNCHEZ-MATEOS, Paloma; CORBÍ,

Angel L. Serotonin skews human macrophage polarization through HTR2B and HTR7. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 190, n. 5, p. 2301–10, 2013.

DE VERNEJOU, Marie-Christine; COLLET, Corinne; CHABBI-ACHENGLI, Yasmine. Serotonin: good or bad for bone. *BoneKEy reports*, v. 1, n. May, p. 120, 2012.

DETKE, Michael J. *et al.* Duloxetine in the acute and long-term treatment of major depressive disorder: A placebo- and paroxetine-controlled trial. *European Neuropsychopharmacology*, v. 14, n. 6, p. 457–470, 2004a.

DETKE, Michael J. *et al.* Duloxetine in the acute and long-term treatment of major depressive disorder: A placebo- and paroxetine-controlled trial. *European Neuropsychopharmacology*, v. 14, n. 6, p. 457–470, 2004b.

DICKSON, Eamonn J; HEREDIA, Dante J; SMITH, Terence K. Generation , and Propagation of the Murine Colonic Migrating Motor Complex. n. 9, p. 144–157, 2010.

DIENER, Hans-Christoph *et al.* New therapeutic approaches for the prevention and treatment of migraine. *The Lancet. Neurology*, v. 14, n. 10, p. 1010–22, 2015.

DOUGLAS, I J *et al.* The effectiveness of pharmaceutical interventions for obesity: Weight loss with orlistat and sibutramine in a United Kingdom population-based cohort. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 79, n. 6, p. 1020–1027, 2015.

DUERSCHMIED, Daniel *et al.* Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood*, v. 121, n. 6, p. 1008–1015, 2013.

DUPRE-CROCHET, S.; ERARD, M.; NUSSE, O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? *Journal of Leukocyte Biology*, v. 94, n. 4, p. 657–670, 2013.

DÜRCK, Thorsten *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, 2005.

DUSSOR, Greg. Serotonin, 5HT1 agonists, and migraine. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, v. 8, n. 2, p. 137–142, jun. 2014.

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

FIDALGO, Sara; IVANOV, Dobril K.; WOOD, Shona H. Serotonin: From top to bottom. *Biogerontology*, v. 14, n. 1, p. 21–45, 2013.

FIORICA-HOWELLS, Elena *et al.* 5-HT(2A) receptors: location and functional analysis in intestines of wild-type and 5-HT(2A) knockout mice. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, v. 282, n. 5, p. G877-93, 2002.

FOURNIER, J.C. *et al.* Antidepressant Drug effects and Depression Severity: A Patient- Level Meta-Analysis. *Jama*, v. 303, n. 1, p. 47–53, 2013.

FREIRE-GARABAL, M *et al.* Serotonin upregulates the activity of phagocytosis through 5-HT1A receptors. *British journal of pharmacology*, v. 139, n. 2, p. 457–463, 2003.

FRÖBE, A N A *et al.* Plasma Free Serotonin as a Marker for Early Detection of Breast Cancer Recurrence. v. 1170, p. 1167–1169, 2014.

FUCHS, T. A. *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology*, v. 176, n. 2, p. 231–241, 2007.

FULLER, RAY W.; WONG, DAVID T. Serotonin Uptake and Serotonin Uptake Inhibition. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 600, n. 1, p. 68–80, 1990.

GANTNER, B. N. *et al.* Collaborative Induction of Inflammatory Responses by Dectin-1 and Toll-like Receptor 2. *Journal of Experimental Medicine*, v. 197, n. 9, p. 1107–1117, 2003.

GARTLEHNER, G; HANSEN, RA; MORGAN, LC; *et al.* Comparative Effectiveness of Second-Generation Antidepressants in the Pharmacologic Treatment of Adult Depression. *Health San Francisco*, n. 7, p. 954, 2007.

GARTLEHNER, G; HANSEN, RA; THIEDA, P; *et al.* Comparative Effectiveness of Second-Generation Antidepressants in the Pharmacologic Treatment of Adult Depression. *European Psychiatry Agency for Healthcare Research and Quality: Comparative Effectiveness Review*, v. 7, n. 7, p. 1–450, 2007.

GARTLEHNER, G *et al.* Comparative Effectiveness of Second-Generation Antidepressants in the Pharmacologic Treatment of Adult

Depression. *European Psychiatry Agency for Healthcare Research and Quality: Comparative Effectiveness Review*, an up date. [S.l: s.n.], 2011.

GAZENDAM, Roel P. *et al.* Two independent killing mechanisms of *Candida albicans* by human neutrophils: Evidence from innate immunity defects. *Blood*, v. 124, n. 4, p. 590–597, 2014.

GOBIN, V. *et al.* Fluoxetine suppresses calcium signaling in human T lymphocytes through depletion of intracellular calcium stores. *Cell Calcium*, v. 58, n. 3, p. 254–263, 2015.

GOBIN, Veerle *et al.* Selective serotonin reuptake inhibitors as a novel class of immunosuppressants. *International Immunopharmacology*, v. 20, n. 1, p. 148–156, 2014.

GOLDSTEIN, D J *et al.* Efficacy and safety of long-term fluoxetine treatment of obesity--maximizing success. *Obesity research*, v. 3 Suppl 4, n. 30, p. 481S–490S, 1995.

GOW, Neil A. R. *et al.* *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology*, v. 10, n. 2, p. 112–122, 2011.

GOW, Neil A.R.; BROWN, Alistair J.P.; ODDS, Frank C. Fungal morphogenesis and host invasion. *Current Opinion in Microbiology*, v. 5, n. 4, p. 366–371, 2002.

HALBREICH, U; TWOREK, H. Altered serotonergic activity in women with dysphoric premenstrual syndromes. *International journal of psychiatry in medicine*, v. 23, n. 1, p. 1–27, 1993.

HALE, Matthew W.; SHEKHAR, Anantha; LOWRY, Christopher A. Stress-related Serotonergic Systems: Implications for Symptomatology of Anxiety and Affective Disorders. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 32, n. 5, p. 695–708, jul. 2012.

HÄUSER, Winfried *et al.* Serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs) for fibromyalgia syndrome. *The Cochrane database of systematic reviews*, v. 1, n. 4, p. CD010292, 2013.

HERR, Nadine *et al.* Acute fluoxetine treatment induces slow rolling of leukocytes on endothelium in mice. *PLoS ONE*, v. 9, n. 2, 2014.

HERRE, Jurgen *et al.* The role of Dectin-1 in antifungal immunity. *Critical*

reviews in immunology, v. 24, n. 3, p. 193–203, 2004.

HODGES, Matthew R; RICHERSON, George B. The role of medullary serotonin (5-HT) neurons in respiratory control: contributions to eupneic ventilation, CO₂ chemoreception, and thermoregulation. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, v. 108, n. 5, p. 1425–1432, 2010.

HOLST, Katrin *et al.* The serotonin receptor 5-HT₇R regulates the morphology and migratory properties of dendritic cells. *Journal of cell science*, v. 128, n. 15, p. 2866–80, 1 ago. 2015a.

HOLST, KATRIN *et al.* SEROTONIN RECEPTOR 5-HT₇ REGULATES MORPHOLOGY AND MIGRATORY PROPERTIES OF DENDRITIC CELLS. *Journal of cell science*, n. JUNE, 2015b.

HOYER, D *et al.* International Union of Pharmacology Classification of Receptors for 5-Hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological reviews*, v. 46, n. 2, p. 157–203, 1994.

HUMPHREY, P P; HARTIG, P; HOYER, D. A proposed new nomenclature for 5-HT receptors. *Trends in pharmacological sciences*, v. 14, n. 6, p. 233–236, 1993.

IDZKO, Marco *et al.* The serotonergic receptors of human dendritic cells: Identification and coupling to cytokine release. *J. Immunol.*, v. 172, n. 10, p. 6011–6019, 2004.

IKEN, Khadija *et al.* Serotonin Upregulates Mitogen-Stimulated B Lymphocyte Proliferation through 5-HT_{1A}Receptors. *Cellular Immunology*, v. 163, n. 1, p. 1–9, jun. 1995.

ILYAS, Stephen; MONCRIEFF, Joanna. Trends in prescriptions and costs of drugs for mental disorders in England, 1998-2010. *British Journal of Psychiatry*, v. 200, n. 5, p. 393–398, 2012.

JACOBSEN, J. P. R.; MEDVEDEV, I. O.; CARON, M. G. The 5-HT deficiency theory of depression: perspectives from a naturalistic 5-HT deficiency model, the tryptophan hydroxylase 2Arg439His knockin mouse. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 367, n. 1601, p. 2444–2459, 2012.

JANČINOVÁ, Viera *et al.* Inhibition of FMLP-stimulated neutrophil chemiluminescence by blood platelets increased in the presence of the serotonin-

liberating drug chloroquine. *Thrombosis Research*, v. 109, n. 5–6, p. 293–298, 2003.

JOG, Neelakshi R *et al.* The actin cytoskeleton regulates exocytosis of all neutrophil granule subsets. *American journal of physiology. Cell physiology*, v. 292, n. January 2007, p. C1690–C1700, 2007.

JUHL, John H. Fibromyalgia and the serotonin pathway. *Alternative Medicine Review*, v. 3, n. 5, p. 367–375, 1998.

KABIR, M. Anaul; HUSSAIN, Mohammad Asif; AHMAD, Zulfiqar. *Candida albicans: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. International Scholarly Research Network Microbiology*, v. 2012, p. 1–15, 2012.

KATO, Shinichi. Role of serotonin 5-HT₃ receptors in intestinal inflammation. *Biological & pharmaceutical bulletin*, v. 36, n. 9, p. 1406–9, 2013.

KIRSCH, Irving *et al.* Initial severity and antidepressant benefits: A meta-analysis of data submitted to the food and drug administration. *PLoS Medicine*, v. 5, n. 2, p. 0260–0268, 2008.

KJELDSEN, L *et al.* Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase-containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation. *Blood*, v. 82, n. 10, p. 3183–91, 1993.

KONIG, B.; JAEGER, K.-E.; KONIG, W. Induction of inflammatory mediator release (12-hydroxyeicosatetraenoic acid) from human platelets by *Pseudomonas aeruginosa*. *International Archives of Allergy and Immunology*, v. 104, n. 1, p. 33–41, 1994.

KÖNIG, B; JAEGER, K E; KÖNIG, W. Induction of inflammatory mediator release (12-hydroxyeicosatetraenoic acid) from human platelets by *Pseudomonas aeruginosa*. *International archives of allergy and immunology*, v. 104, n. 1, p. 33–41, 1994.

KUSHNIR-SUKHOV, Nataliya M. *et al.* 5-Hydroxytryptamine Induces Mast Cell Adhesion and Migration. *The Journal of Immunology*, v. 177, n. 9, p. 6422–6432, 2006.

LACASSE, Jeffrey R. R.; LEO, Jonathan. Serotonin and depression: A disconnect between the advertisements and the scientific literature. *PLoS Medicine*, v. 2, n. 12, p. 1211–1216, 2005.

LANG, Undine E.; BORGWARDT, Stefan. Molecular mechanisms of

depression: Perspectives on new treatment strategies. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 31, n. 6, p. 761–777, 2013.

LECHIN, Fuad; VAN DER DIJS, Bertha; LECHIN, Alex E. Circulating serotonin, catecholamines, and central nervous system circuitry related to some cardiorespiratory, vascular, and hematological disorders. *Journal of Applied Research*, v. 5, n. 4, p. 605–621, 2005.

LEE, Y C; CHEN, P P. A review of SSRIs and SNRIs in neuropathic pain. *Expert Opin Pharmacother*, v. 11, n. 17, p. 2813–2825, 2010.

LEON-PONTE, M.; AHERN, Gerard P; O'CONNELL, P. J. Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT7 receptor. *Blood*, v. 109, n. 8, p. 3139–3146, 15 abr. 2007.

LI, Nan *et al.* Serotonin activates dendritic cell function in the context of gut inflammation. *The American journal of pathology*, v. 178, n. 2, p. 662–71, 2011.

LI, Xia *et al.* Decreased platelet 5-hydroxytryptamin (5-HT) levels: A response to antidepressants. *Journal of Affective Disorders*, v. 187, p. 84–90, 2015.

LIU, Hong-Nian *et al.* Serotonin augments gut pacemaker activity via 5-HT3 receptors. *PloS one*, v. 6, n. 9, p. e24928, 2011.

LIU, Mintsai *et al.* Expression and function of 5-HT4 receptors in the mouse enteric nervous system. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, v. 289, n. 6, p. G1148–G1163, 2005.

LÓPEZ-GARCÍA, Belén *et al.* Anti-fungal activity of cathelicidins and their potential role in *Candida albicans* skin infection. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 125, n. 1, p. 108–115, 2005.

MA, J.; UNDERHILL, D. M. B-glucan signaling connects phagocytosis to autophagy. *Glycobiology*, v. 23, n. 9, p. 1047–1051, set. 2013.

MAHÉ, Cécile *et al.* Functional expression of the serotonin 5-HT7 receptor in human glioblastoma cell lines. *British journal of pharmacology*, v. 143, n. 3, p. 404–10, 2004.

MANDA-HANDZLIK, Aneta; DEMKOW, Urszula. Neutrophils: The Role of Oxidative and Nitrosative Stress in Health and Disease. *Adv Exp. Medicine, Biology-Neuroscience and respiration*. [S.l: s.n.], 2015. p. 51–60.

MARSTON, Oliver J.; GARFIELD, Alastair S.; HEISLER, Lora K. Role of central serotonin and melanocortin systems in the control of energy balance.

European Journal of Pharmacology, v. 660, n. 1, p. 70–79, 2011.

MATHERS, C D; LONCAR, D. Updated projections of global mortality and burden of disease, 2002-2030: data sources, methods and results. . 2005.

MCCORVY, John D.; ROTH, Bryan L. Structure and function of serotonin G protein-coupled receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 150, p. 129–142, 2015.

MEREDITH, Elizabeth J. *et al.* The serotonin transporter (SLC6A4) is present in B-cell clones of diverse malignant origin: probing a potential antitumor target for psychotropics. *The FASEB Journal*, v. 24, n. 9, p. 1–24, 2005.

METZLER, Kathleen D. *et al.* Myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Reports*, v. 8, n. 3, p. 883–896, 2014.

MEYERSON, BENGT J.; LEWANDER, TOMMY. SEROTONIN SYNTHESIS INHIBITION AND ESTROUS BEHAVIOR IN FEMALE RATS. *Life Sciences*, v. 9, p. 661–671, 1970.

MILANO, W *et al.* The pharmacological options in the treatment of eating disorders. *ISRN pharmacology*, v. 2013, p. 352865, 2013.

MOORE, M. *et al.* Explaining the rise in antidepressant prescribing: a descriptive study using the general practice research database. *Bmj*, v. 339, n. oct15 2, p. b3999–b3999, 2009.

MÖSSNER, R; LESCH, K P. Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain, behavior, and immunity*, v. 12, n. 4, p. 249–71, 1998.

MOUSSAVI, Saba *et al.* Depression, chronic diseases, and decrements in health: *Lancet*, p. 851–858, 2007.

MÜLLER, Tobias *et al.* 5-hydroxytryptamine modulates migration, cytokine and chemokine release and T-cell priming capacity of dendritic cells in vitro and in vivo. *PLoS ONE*, v. 4, n. 7, p. 1–8, 2009.

MURROUGH, James W.; CHARNEY, Dennis S. Is there anything really novel on the antidepressant horizon? *Current Psychiatry Reports*, v. 14, n. 6, p. 643–649, 2012.

NANNMARKA, U; SENNERBYA, L. Inhibition of leukocyte phagocytosis by serotonin possible role in tumour cell destruction and its. *October*, v. 62, p. 83–

86, 1992.

NAUCLÉR, Claes *et al.* Signaling to localized degranulation in neutrophils adherent to immune complexes. *Journal of leukocyte biology*, v. 71, n. 4, p. 701–10, abr. 2002.

NETEA, Mihai G. *et al.* An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, n. 1, p. 67–78, 2008.

NEUMANN, Ariane; VÖLLGER, Lena; *et al.* Novel role of the antimicrobial peptide LL-37 in the protection of neutrophil extracellular Traps against degradation by bacterial nucleases. *Journal of Innate Immunity*, v. 6, n. 6, p. 860–868, 2014.

NEUMANN, Ariane; BERENDS, Evelien T. M.; *et al.* The antimicrobial peptide LL-37 facilitates the formation of neutrophil extracellular traps. *Biochemical Journal*, v. 464, n. 1, p. 3–11, 2014.

NIELSEN, Margrethe; HANSEN, Ebba Holme; GÖTZSCHE, Peter C. Dependence and withdrawal reactions to benzodiazepines and selective serotonin reuptake inhibitors. How did the health authorities react? *International Journal of Risk and Safety in Medicine*, v. 25, n. 3, p. 155–168, 2013.

NORDENFELT, Pontus; TAPPER, Hans. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 90, n. 2, p. 271–284, 2011.

O'CONNELL, Peta J. *et al.* A novel form of immune signaling revealed by transmission of the inflammatory mediator serotonin between dendritic cells and T cells. *Blood*, v. 107, n. 3, p. 1010–1017, 13 out. 2005.

ORTIZ, J.; ARTIGAS, F.; GELPÍ, E. serotonergic status in human blood. *Life Sciences*, v. 43, p. 983–990, 1988.

PARK, Young-Min; LEE, Bun-Hee; LEE, Seung-Hwan. The association between serum lipid levels, suicide ideation, and central serotonergic activity in patients with major depressive disorder. *Journal of Affective Disorders*, v. 159, p. 62–65, 2014.

PATÍÑO, P J *et al.* Molecular characterization of autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by a defect of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form) oxidase component p67-phox. *Blood*, v. 94,

n. 7, p. 2505–2514, 1999.

PELLEGRINO, Trisha C.; BAYER, Barbara M. Specific serotonin reuptake inhibitor-induced decreases in lymphocyte activity require endogenous serotonin release. *NeuroImmunoModulation*, v. 8, n. 4, p. 179–187, 2000.

PRACHAŘOVÁ, Lucie *et al.* Serotonin and its 5-HT₂ receptor agonist DOI hydrochloride inhibit the oxidative burst in total leukocytes but not in isolated neutrophils. *Life Sciences*, v. 86, n. 13–14, p. 518–523, 2010.

RAY, R. S. RS *et al.* Impaired Respiratory and Body Temperature Control Upon Acute Serotonergic Neuron Inhibition. *Science*, v. 333, n. 6042, p. 637–642, 29 jul. 2011.

ROGERS, Mary A M *et al.* Depression, antidepressant medications, and risk of *Clostridium difficile* infection. *BMC medicine*, v. 11, n. 1, p. 121, 2013.

ROMANI, L. Innate and adaptive immunity in *Candida albicans* infections and saprophytism. *Journal of leukocyte biology*, v. 68, n. 2, p. 175–9, 2000.

ROMANI, Luigina. Immunity to fungal infections. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, n. 4, p. 275–288, 2011.

SAITOH, Tatsuya *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Mediate a Host Defense Response to Human Immunodeficiency Virus-1. *Cell Host & Microbe*, v. 12, n. 1, p. 109–116, 2012.

SANGKUHL, K; KLEIN, T E; ALTMAN, R B. Selective serotonin reuptake inhibitors pathway. *Pharmacogenetics and genomics*, v. 19, n. 11, p. 907–909, 2009.

SARGENT, Bruce J.; MOORE, Nicholas A. New central targets for the treatment of obesity. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 68, n. 6, p. 852–860, 2009.

SASSE, Christoph *et al.* White-opaque switching of *Candida albicans* allows immune evasion in an environment-dependent fashion. *Eukaryotic Cell*, v. 12, n. 1, p. 50–58, 2013.

SATO, K. *et al.* Dectin-2 Is a Pattern Recognition Receptor for Fungi That Couples with the Fc Receptor Chain to Induce Innate Immune Responses. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 50, p. 38854–38866, 2006.

SATO, Yasushi; NAKAMURA, Kazuhiko; YASUI-FURUKORI, Norio. Serotonin syndrome induced by the readministration of escitalopram after a short-

term interruption in an elderly woman with depression: A case report. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, v. 11, p. 2505–2507, 2015.

SCHILCHER, Katrin *et al.* Increased neutrophil extracellular trap-mediated Staphylococcus aureus clearance through inhibition of nuclease activity by clindamycin and immunoglobulin. *Journal of Infectious Diseases*, v. 210, n. 3, p. 473–482, 2014.

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, 1995.

SCHULZE, Jürgen; SONNENBORN, Ulrich. Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. *Deutsches Arzteblatt international*, v. 106, n. 51–52, p. 837–842, 2009.

SEGAL, Anthony W. How Neutrophils Kill Microbes. *Annual Review of Immunology*, v. 23, n. 1, p. 197–223, 2005.

SENET, J M. Risk factors and physiopathology of candidiasis. *Revista iberoamericana de micologia : organo de la Asociacion Espanola de Especialistas en Micologia*, v. 14, n. 1, p. 6–13, 1997.

SGHENDO, Lino; MIFSUD, Janet. Understanding the molecular pharmacology of the serotonergic system: Using fluoxetine as a model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 64, n. 3, p. 317–325, 2012.

SHAJIB, M. S.; KHAN, W. I. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. *Acta Physiologica*, v. 213, n. 3, p. 561–574, 2015.

SHISHIKURA, Kyosuke *et al.* Prostaglandin E2 inhibits neutrophil extracellular trap formation through production of cyclic AMP. *British Journal of Pharmacology*, v. 173, n. 2, p. 319–331, 2016.

SILVERMAN, Daniel H.S.; HONG, Wu; KARNOVSKY, Manfred L. Muramyl peptides and serotonin interact at specific binding sites on macrophages and enhance superoxide release. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 131, n. 3, p. 1160–1167, 1985.

SKAPINAKIS, P *et al.* Efficacy and acceptability of selective serotonin reuptake inhibitors for the treatment of depression in Parkinson's disease: a

systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Neurol*, v. 10, p. 49, 2010.

SPARKES, C. G.; SPENCER, P. S.J. Antinociceptive activity of morphine after injection of biogenic amines in the cerebral ventricles of the conscious rat. *British Journal of Pharmacology*, v. 42, n. 2, p. 230–241, 1971.

STAFFORD, Randall S.; MACDONALD, Ellen A.; FINKELSTEIN, Stan N. National Patterns of Medication Treatment for Depression, 1987 to 2001. *Primary care companion to the Journal of clinical psychiatry*, v. 3, n. 6, p. 232–235, 2001.

STONE, Kimberly J.; VIERA, Anthony J.; PARMAN, Christopher L. Off-label applications for SSRIs. *American Family Physician*, v. 68, n. 3, p. 498–504, 2003.

SUMARA, Grzegorz *et al.* Gut-derived serotonin is a multifunctional determinant to fasting adaptation. *Cell Metabolism*, v. 16, n. 5, p. 588–600, 2012.

SUMPTON, Janice E.; MOULIN, Dwight E. Fibromyalgia: Presentation and management with a focus on pharmacological treatment. *Pain Research and Management*, v. 13, n. 6, p. 477–483, 2008.

SUPLICY, H *et al.* A comparative study of five centrally acting drugs on the pharmacological treatment of obesity. *International Journal of Obesity*, v. 38, n. 8, p. 1097–1103, 2014.

TEIXEIRA, B. Avaliação do impacto da serotonina na resposta do neutrófilo à *Candida albicans*. 84p 2016. Monografia. Dados ainda não publicados.

THIJSEN, A. Y. *et al.* Alterations in serotonin metabolism in the irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, n. October, p. n/a-n/a, 2015.

URBAN, Constantin F. *et al.* Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* and hyphal forms. *Cellular Microbiology*, v. 8, n. 4, p. 668–676, 2006.

URBAN, Constantin F. *et al.* Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*, v. 5, n. 10, 2009.

VARIGONDA, Anjali L.; JAKUBOVSKI, Ewgeni; BLOCH, Michael H. Systematic review and meta-analysis: Early treatment responses of selective serotonin reuptake inhibitors and clomipramine in pediatric obsessive-compulsive

disorder. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, v. 55, n. 10, p. 851–859.e2, 2016.

VERSTEEG, R. I. *et al.* Serotonin, a possible intermediate between disturbed circadian rhythms and metabolic disease. *Neuroscience*, v. 301, n. June, p. 155–167, 2015.

VIJAYAN, Dipti *et al.* Mincle polarizes human monocyte and neutrophil responses to *Candida albicans*. *Immunology and Cell Biology*, v. 90, n. 9, p. 889–895, 2012.

VILLAMÓN, Eva *et al.* Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microbes and Infection*, v. 6, n. 1, p. 1–7, 2004.

VILLAR, Cristina Cunha; DONGARI-BAGTZOGLU, Anna. Immune defence mechanisms and immunoenhancement strategies in oropharyngeal candidiasis. *Expert reviews in molecular medicine*, v. 10, p. e29, 2008.

WÄCHTLER, Betty *et al.* From Attachment to Damage: Defined Genes of *Candida albicans* Mediate Adhesion, Invasion and Damage during Interaction with Oral Epithelial Cells. *PLoS ONE*, v. 6, n. 2, p. e17046, 2011.

WADE, A; DESPIEGEL, N; REINES, E H. Escitalopram in the long-term treatment of major depressive disorder. *Annals of Clinical Psychiatry*, v. 18, n. 2, p. April/June, 2006.

WANG, C *et al.* Comparison of the neurobiological effects of attribution retraining group therapy with those of selective serotonin reuptake inhibitors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 46, p. 318–326, 2013.

WARTHA, Florian *et al.* Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, v. 10, n. 1, p. 52–56, 2007.

WATANABE, Hitoshi *et al.* Peripheral serotonin enhances lipid metabolism by accelerating bile acid turnover. *Endocrinology*, v. 151, n. 10, p. 4776–4786, 2010.

WEISSMANN, G; ZURIER, R B; HOFFSTEIN, S. Leukocytic proteases and the immunologic release of lysosomal enzymes. *American Journal of Pathology*, v. 68, n. 3, p. 539–564, 1972.

XIE, Z. *et al.* *Candida albicans* Biofilms Do Not Trigger Reactive Oxygen Species and Evade Neutrophil Killing. *Journal of Infectious Diseases*, v. 206, n. 12, p. 1936–1945, 2012.

YADAV, Vijay K *et al.* Pharmacological inhibition of gut-derived serotonin synthesis is a potential bone anabolic treatment for osteoporosis. *Nature Medicine*, v. 16, n. 3, p. 308–312, 7 fev. 2010.

YIPP, Bryan G.; KUBES, Paul. NETosis: How vital is it? *Blood*, v. 122, n. 16, p. 2784–2794, 2013.

9 ANEXOS

ANEXO A -Autorização conselho de ética em pesquisa UNIRIO



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP-UNIRIO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UNIRIO

PARECER CONSUBSTANCIADO

TTDD:232

Assunto: Projetos de Pesquisa – Avaliação.

Protocolo CEP-UNIRIO: 0030/2010 **FR** 391014 **CAAE:** 0025.0.313.000-10

Projeto de Pesquisa: Impacto dos neuromediadores de estresse na função de monócitos de indivíduos saudáveis e de pacientes com distúrbios neuropsiquiátricos.

Versão do Protocolo e Data: 27/12/2010

Pesquisador(a) Responsável: Vera Carolina Bordallo Bittencourt.

Instituição: Instituto Biomédico - UNIRIO.

Sumário do protocolo:

- **Objetivos:** avaliar o impacto dos neuromediadores do estresse na função fagocítica e produção de citocinas dos macrófagos originários de monócitos de indivíduos saudáveis e de pacientes portadores de desordens psiquiátricas.
- **Súmula do Projeto:** pesquisa exploratória onde pretende-se estudar o efeito dos neuromediadores do estresse sobre a produção de citocinas e sobre a função fagocítica e microbicida de macrófagos originários de monócitos. Para a realização do estudo serão avaliados as atividade de macrófagos obtidos de pacientes portadores de desordens psiquiátricas e de indivíduos sadios estimulados com *Cândida Albicans*.
- **Comentários do Relator:** a pesquisa se justifica em razão dos poucos estudos relativos ao tema, bem como pela importância da questão e possíveis benefícios para uma melhor qualidade de vida da população a ser estudada. A etapa de coleta de sangue, bem como a identificação e acondicionamento das amostras foram incluídos no texto da metodologia. Foi retirada a identificação no instrumento.
- **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:** o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está de acordo com as normas da Resolução 196/96.
- Informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada á apresentação do resumo do estudo proposto á apresentação do Comitê.

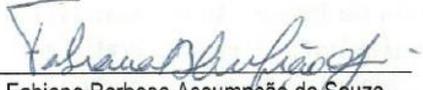


COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP-UNIRIO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UNIRIO

Diante do exposto, o Comitê de ética em Pesquisa da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – CEP –UNIRIO, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS196/96 e suas complementares, manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

Emitimos, portanto, parecer que classifica o projeto como **APROVADO**.

Rio de Janeiro, 18 de abril de 2011.


Fabiana Barbosa Assumpção de Souza
Coordenadora do CEP-UNIRIO

Fabiana B. Assumpção de Souza
Coordenadora
CEP - UNIRIO
PROPG-DPQ

ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido-TCLE



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
LABORATÓRIO DE IMUNIDADE INATA – LIMIN

TERMO DE CONSENTIMENTO

Título do Projeto

“Impacto dos neuromediadores do estresse na função dos fagócitos de indivíduos saudáveis e de pacientes com distúrbios neuropsiquiátricos”

Pesquisador responsável: Dra. Vera Carolina Bordallo Bittencourt – Prof. de Imunologia.
Contatos: 2531-7906, 993123537.

Objetivo do Estudo: Verificar a influência do estresse na competência de células fagocíticas e assim compreender mecanismos que possam estar associados à maior susceptibilidade dos indivíduos com estresse crônico às infecções.

Procedimento: Serão feitas perguntas com o objetivo de investigar aspectos psicológicos, imunológicos e nutricionais. Estas perguntas, organizadas em um questionário, têm o objetivo de avaliar seu estado nutricional e relatos de intercorrências clínicas como reações alérgicas, episódios de infecções e outras patologias, tais como doenças auto-imunes.

Após o seu consentimento oral e por escrito, um pesquisador habilitado irá colher o volume total de 20 mL de sangue periférico que será utilizado para realizar uma avaliação quantitativa e qualitativa de seu sistema imunológico.

Riscos e desconfortos: A aplicação das perguntas não oferece nenhum tipo de risco ou desconforto. Caso você esteja se sentindo desrespeitado, pode interrompê-lo a qualquer momento. A obtenção do sangue periférico será conduzida por pessoal treinado que utilizará todo o material estéril em condições adequadas. Você poderá interromper a entrevista ou não permitir a coleta de seu sangue a qualquer momento, sem nenhum problema para você.

Custos e compensações: ***Você não pagará nada para participar nesse estudo. Você não será pago por estar no estudo.***

Confidenciabilidade: Este estudo envolve informações confidenciais. Essas informações serão mantidas estritamente confidenciais entre os membros envolvidos na pesquisa. Qualquer publicação científica dos resultados não identificará você.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu,.....,,,
.....,

(nome completo)

(nacionalidade) (idade)

(RG)

estou sendo convidado a participar de um estudo denominado "**Impacto dos neuromediadores do estresse na função dos fagócitos de indivíduos saudáveis e de pacientes com distúrbios neuropsiquiátricos**", cujos objetivos e justificativas são: **Verificar a influência do estresse na competência de células fagocíticas e assim compreender mecanismos que possam estar associados à maior susceptibilidade às infecções que os indivíduos com estresse crônico apresentam.**

A minha participação no referido estudo será no sentido **de responder a um questionário, com o objetivo de avaliar meu estado físico geral e de verificar relatos de intercorrências clínicas como reações alérgicas, episódios de infecções e outras patologias, como doenças auto-imunes. Após meu consentimento oral e por escrito, um pesquisador habilitado irá colher o volume total de 20 mL do meu sangue periférico que será utilizado para análise do comportamento das células do sistema imune.**

Recebi os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do procedimento, levando-se em conta que é uma pesquisa, os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização.

Estou ciente de que **minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo.**

Também fui informado de que **posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar apresentar justificativas.**

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são **Dra. Vera Bittencourt (professora) e Bruna Teixeira (aluna de Iniciação Científica), ambas vinculadas à UNIRIO e com elas poderei manter contato pelos telefones 993123537 (Dra. Vera) e 984665541(Bruna)**

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, **manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.**

Data

Assinatura do voluntário no estudo

Pesquisador responsável

Testemunha

ANEXO C - Questionário de morbidades psiquiátricas do adulto – QMPA

Nome: _____ Peso atual: _____ Bairro onde mora: _____
 Curso: Biologia Biomedicina Enfermagem Medicina Nutrição outro _____
 Contatos (e-mail/telefone): _____ Sexo: () F () M

	Sim	Não
1- Você possui alguma patologia? (Qual?)		
2- Você sofre de algum distúrbio alérgico? () Rinite/Sinusite () Asma () Sintomas gastrointestinais () Dermateite		
3- Você faz uso de alguma terapia anti-alérgica? () Sim, já fiz () Sim, faço		
4- Você faz uso de algum medicamento regularmente? (Qual?)		
5- (Para as meninas) Sobre candidíase vaginal de repetição: Nº médio de episódios por ano: Nº médio de episódios por ano diagnosticados pelo médico:		
	Sim	Não
6- O seu trânsito intestinal é normal?		
7- Você sente que doenças comuns (como gripe, infecção de garganta etc.) nas outras pessoas costumam ser mais sérias em você?		
8- Sofre de falta de apetite?		
9- Come em demasia?		
10- Tem dificuldades para dormir?		
11- Se queixa de zumbidos nos ouvidos, agonia na cabeça?		
12- Sente dores ou pontadas frequentes na cabeça?		
13- Sente fraqueza nas pernas, dores nos nervos?		
14- Fica agressivo, explode com facilidade?		
15- Fica período triste, com desânimo excessivo?		
16- Sente bolo na garganta, queimação ou empachamento no estômago?		
17- Sente tremores ou frieza nas mãos?		
18- Tem com frequência crises de irritação?		
19- Tem dificuldade de aprender, lembrar ou entender as coisas?		
20- Às vezes fica parado, chorando muito?		
21- Já pensou em dar fim na vida?		
22- Já esteve descontrolado, fora de si, como se fosse doente da cabeça?		
23- Não consegue trabalhar por nervosismo ou doença mental?		
24- Já ficou sem falar ou enxergar?		
25- Fica muito tempo fechado no quarto sem querer ver ninguém?		
26- Se embriaga pelo menos uma vez por semana?		
27- Se queixa de palpitação ou aperto no coração?		
28- Sofre de nervosismo ou está sempre intranquilo?		
29- Se preocupa muito com doença? Se queixa sempre?		
30- Já sofreu um ataque depois de um susto ou contrariedade?		
31- Tem medo excessivo de certas coisas ou de lugares fechados?		
32- Após fechar as portas verifica várias vezes se estão bem fechadas?		
33- Se queixa de ouvir vozes ou vê coisas que os outros não vêem?		
34- Fala ou ri sozinho?		
35- Se acha perseguido, que estão querendo lhe fazer mal?		
36- Sente que está sendo controlado por telepatia, por rádio ou espírito?		
37- Às vezes fica muito tempo numa posição estranha?		
38- Fica períodos exageradamente alegre sem saber por quê?		
39- Já utilizou ou usa atualmente remédio para dormir ou acalmar os nervos?		
40- Sofre de acesso de loucura?		
41- Tem mania exagerada de limpeza ou arrumação?		
42- Recebe tratamento para nervosismo ou doença mental?		
43- É dado ao uso de drogas?		
44- Tem membros em sua família que se vestem desleixados, urinam ou defecam nas roupas?		