

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA

ISIS PAIVA TRAJANO

**Efeito do pré-tratamento com fluoxetina sobre a hipotermia induzida por  
endotoxemia**

*Effect of fluoxetine pretreatment on LPS-induced hypothermia*

Ribeirão Preto

2024

ISIS PAIVA TRAJANO

**Efeito do pré-tratamento com fluoxetina sobre a hipotermia induzida por endotoxemia**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco  
Coorientador: Dr. Luis Henrique Angenendt da Costa

Ribeirão Preto

2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Trajano, Isis Paiva

Efeito do pré-tratamento com fluoxetina sobre a hipotermia induzida por endotoxemia. Ribeirão Preto, 2024.

44 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Branco, Luiz Guilherme de Siqueira.

1. Inflamação. 2. Termorregulação. 3. Serotonina. 4. ISRS.

Nome: TRAJANO, Isis P.

Título: Efeito do pré-tratamento com fluoxetina sobre a hipotermia induzida por endotoxemia.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a  
obtenção do título de Mestra em Ciências (área de  
concentração: Fisiologia).

Aprovada em: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_.

### **Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo  
Presidente

---

Profa. Dra. Glauce Crivelaro do Nascimento  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

---

Profa. Dra. Angelita Maria Stábile  
Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Aos meus pais, Dorinha e Trajano.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco pela oportunidade, confiança, apoio e enorme contribuição para o meu crescimento profissional.

Ao Dr. Luis Henrique Angenendt da Costa pela grande parceria durante o mestrado e dedicação a este trabalho e à minha formação.

À Dra. Patricia Passaglia e Dra. Bruna Maitan dos Santos pelos ensinamentos, colaboração e amizade desde o primeiro dia de trabalho.

Aos meus colegas de laboratório Wanderson, Emily e Katiuscia que, assim como os outros membros, fizeram deste importante período de trabalho mais leve e divertido.

Aos funcionários Junia Ramos, Nadir Fernandes, Mauro Silva, Marcelo Batalhão, Patrícia Basile, Karol Klemp, Edson Santos, Thiago Pereira, Cláudia Vanzela e Silvia Penha pela imensa contribuição para que cada etapa da execução deste projeto, da minha formação e participação nos processos decisivos dentro da universidade pudessem ocorrer da melhor maneira possível.

Aos professores da FMRP pela contribuição à minha formação por meio da troca de conhecimento e experiência e apoio na participação de outras atividades extracurriculares.

Aos colegas de representação discente e outros membros dos conselhos e comissões da USP, especialmente aos membros da Comissão de Direitos Humanos, pela paciência, disponibilidade e grandes ensinamentos durante esses anos de representação.

Às minhas irmãs Raquel, Thais e Marianna por compartilharem essa viagem comigo.

À minha mãe Dorinha pelo exemplo, força, apoio e amor incondicional. Minha família, Igor, Jéssica, Julia, Livia e Antonio, e família estendida em Ribeirão Preto, Claudia, Maurício, Helena, Netto, Joaquim e Beatriz.

Ao Rodrigo pelo suporte, incentivo, amor, amizade e parceria de vida.

Aos animais que contribuíram para a realização deste trabalho com suas vidas.

À FAPESP (Processo No. 2022/01783-8), CNPq e CAPES, pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

TRAJANO, Isis P. **Efeito do pré-tratamento com fluoxetina sobre a hipotermia induzida por endotoxemia.** 2023. 44 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de concentração: Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

As síndromes associadas à inflamação sistêmica são acompanhadas de alta mortalidade e permanecem um desafio na medicina de emergência. A administração de lipopolissacarídeo (LPS) mimetiza experimentalmente um quadro de inflamação sistêmica que produz citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, além de mudanças na temperatura corporal, como a febre e a hipotermia, de acordo com a dose e a temperatura ambiente. A alta mortalidade resultante de casos graves de inflamação sistêmica e o comprometimento que ela causa faz com que a compreensão dos mecanismos envolvidos se torne essencial para a descoberta de novas terapias. Nosso laboratório demonstrou recentemente que a administração central de serotonina (5-HT) exógena tem efeito anti-inflamatório em modelo animal de inflamação. Nesse sentido, formulamos a hipótese que a manipulação da via serotoninérgica é um potencial alvo terapêutico, sendo a fluoxetina (medicamento inibidor seletivo de recaptção de serotonina - ISRS), um potencial imunomodulador via mecanismos serotoninérgicos. Assim, o objetivo deste projeto foi avaliar o possível papel do tratamento prévio com fluoxetina sobre os parâmetros termorregulatórios e neuroimunes em animais com inflamação sistêmica. Para esta avaliação, os animais foram pré-tratados com fluoxetina durante 7 dias e submetidos à endotoxemia por meio da administração de LPS no dia do experimento. Após o experimento, os animais foram eutanasiados para a coleta de plasma, encéfalo, baço e tecido adiposo marrom, para a dosagem de citocinas anti e pró-inflamatórias séricas e esplênicas, além da PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub> no hipotálamo e no plasma e quantificação de UCP-1 no tecido adiposo marrom, somando-se à medida de temperatura corporal interna, temperatura da cauda (para cálculo do Índice de Perda de Calor) e consumo de O<sub>2</sub> (para mensuração da termogênese sem tremor) que foram realizadas durante o experimento. Os resultados mostraram níveis plasmáticos reduzidos de 5-HT, bem como níveis aumentados de NO e citocinas no plasma e baço e PGE<sub>2</sub> no hipotálamo durante a SI. Curiosamente, a FLX atenuou a hipotermia induzida por LPS, acompanhada por uma redução nos NOs esplênico e plasmático, além das interleucinas (IL) 6 e 10. Esses dados indicam que níveis reduzidos de 5-HT durante SI estão associados ao aumento do estado pró-inflamatório observado durante a hipotermia. Além disso, os resultados estão alinhados com a hipótese de que a hipotermia, atenuada pela FLX, se desenvolve de forma regulada como uma estratégia adaptativa, e que o efeito anti-inflamatório da FLX é aparentemente o resultado do recrutamento de mais de uma via de sinalização, como a via anti-inflamatória esplênica, junto ao efeito da FLX diretamente nas células do sistema imune.

Palavras-chave: inflamação; termorregulação; serotonina; ISRS.

## ABSTRACT

TRAJANO, Isis P. **Effect of fluoxetine pretreatment on LPS-induced hypothermia**. 2023. 44 sheets. Dissertation (Master's in Sciences, area of concentration: Physiology) – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Syndromes associated with systemic inflammation are accompanied by high mortality and remain a challenge in emergency medicine. The administration of lipopolysaccharide (LPS) experimentally mimics a systemic inflammation that produces pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6, in addition to changes in body temperature, such as fever and hypothermia, depending on dose and room temperature. The high mortality resulting from severe cases of systemic inflammation and the impairment it causes makes understanding the mechanisms involved essential for the discovery of new therapies. Our laboratory recently demonstrated that central administration of exogenous serotonin (5-HT) has an anti-inflammatory effect in an animal model of inflammation. In this sense, we formulate the hypothesis that manipulation of the serotonergic pathway is a potential therapeutic target, with fluoxetine (a selective serotonin reuptake inhibitor - SSRI) being a potential immunomodulator via serotonergic mechanisms. Thus, the aim of this project is to evaluate the possible role of fluoxetine pretreatment on thermoregulatory and neuroimmune parameters in animals with systemic inflammation. For this, animals were pre-treated with fluoxetine for 7 days and subjected to endotoxemia through the administration of LPS on the day of the experiment. Animals were then euthanized to collect plasma, brain, spleen and brown adipose tissue, for the measurement of serum and splenic anti- and pro-inflammatory cytokines, in addition to PGE<sub>2</sub> and PGD<sub>2</sub> in the hypothalamus and plasma and quantification of UCP-1 in brown adipose tissue, adding to the measurement of internal body temperature, tail temperature (to calculate the Heat Loss Index) and O<sub>2</sub> consumption (to measure thermogenesis without shivering) that were carried out during the experiment. The results showed reduced plasma levels of 5-HT, as well as increased levels of NO and cytokines in plasma and spleen and PGE<sub>2</sub> in the hypothalamus during SI. Interestingly, FLX attenuated LPS-induced hypothermia, accompanied by a reduction in splenic and plasma NOs, as well as interleukins (IL) 6 and 10. These data indicate that reduced 5-HT levels during SI are associated with increased pro-inflammatory observed during hypothermia. Additionally, the results align with the hypothesis that hypothermia, blunted by FLX, develops in fact in a regulated form, as an adaptive strategy, and that FLX anti-inflammatory effect is apparently the result from the recruitment of more than one signalling pathway, such as the splenic anti-inflammatory pathway and FLX effect directly upon immune cells.

Keywords: inflammation; thermoregulation; serotonin; SSRI.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1. Objetivo geral .....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
3.1. Animais .....	15
3.2. Fármacos .....	16
3.3. Procedimento cirúrgico .....	17
3.4. Delineamento experimental.....	17
3.5. Medida indireta de termogênese sem tremor por consumo de oxigênio .....	18
3.6. Medida do Índice de Perda de Calor ( <i>Heat Loss Index</i> – HLI).....	19
3.7. Coleta e preparo de amostras.....	19
3.8. <i>Western Blotting</i> .....	20
3.9. Dosagem de citocinas e prostaglandinas no plasma, baço e hipotálamo .....	20
3.10. Dosagem de nitrito/nitrato (NOX) .....	20
3.11. Dosagem de serotonina .....	20
3.12. Análise estatística.....	21
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>21</b>
4.1. A administração da fluoxetina atenuou a hipotermia desenvolvida por animais com inflamação sistêmica aguda.....	21
4.2. A hipotermia foi controlada pelo mecanismo termorregulador de perda de calor pela pele da causa .....	22
4.3. A fluoxetina modulou as respostas imunes periférica e esplênica 6 horas após a administração de LPS.....	26
4.4. O pré-tratamento com fluoxetina afetou a produção hipotalâmica de PGE <sub>2</sub> .....	30
4.5. A concentração de serotonina plasmática foi reduzida nos animais pré-tratados com fluoxetina e submetidos à endotoxemia .....	32
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>38</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A inflamação é um fenômeno fisiológico que pode ser analisado dentro de um espectro que abrange desde a resposta imune de proteção a um potencial dano tecidual ao monitoramento e reforço da integridade estrutural e funcional dos tecidos, associando o processo inflamatório a uma imensa variedade de distúrbios (FURMAN et al., 2019; MEDZHITOV, 2021). A interpretação desse fenômeno como fator inerente às condições de saúde que dominam as causas de morbidade e mortalidade na população mundial gera interesse na compreensão dos processos bioquímicos e fisiológicos que orquestram essa resposta e posiciona a pesquisa sobre a inflamação no topo das prioridades de saúde pública (SLAVICH, 2015).

Em um extremo do espectro desse fenômeno temos a inflamação aguda, uma reação rápida e de curta duração que origina os sinais cardinais de inflamação (edema, calor, rubor, dor e perda de função) (MEDZHITOV, 2008). No outro extremo, os mesmos agentes que atuam para a instalação do processo inflamatório também agem durante a ausência da sinalização de danos teciduais, contribuindo para o decorrer habitual dos processos homeostáticos. Dessa forma, uma diversidade de células imune e de mediadores da inflamação, como citocinas, quimiocinas e eicosanoides desempenham um papel crucial na regulação do equilíbrio entre a inflamação e a homeostase, tornando a compreensão dos mecanismos subjacentes à regulação da resposta inflamatória, especialmente o equilíbrio entre as ações pró e anti-inflamatórias das citocinas, essencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e direcionadas no tratamento de condições inflamatórias.

Em condições normais, a liberação controlada de citocinas durante a resposta inflamatória aguda ajuda a restaurar o ambiente tecidual ao seu estado basal após a resolução do estímulo agressor. No entanto, em situações de desequilíbrio ou disfunção, quando a liberação de mediadores inflamatórios é exacerbada, a ação desses agentes pode resultar em uma resposta prolongada e excessiva, potencialmente causando prejuízos a órgãos e sistemas e representando, assim, potencial de risco à vida. Quando este conjunto de manifestações é acompanhado por uma infecção, caracteriza-se na clínica um quadro de sepse (SINGER et al., 2016), disfunção considerada prioridade de saúde pública pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

Uma hierarquia natural de prioridades no restabelecimento do estado homeostático determina uma ação inicial da resposta inflamatória no sentido de reparação da estrutura comprometida, seguida pela recuperação da função e finalmente regulação e remodelação (MEDZHITOV, 2021).

A resposta é desafiada de modo prospectivo a partir da ação de receptores de reconhecimento de padrões, ou retrospectivo, com a identificação de dano tecidual já instaurado. Esse desafio inicial pode ser imposto por Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs<sup>1</sup>), moléculas endógenas ativadores da inflamação em caso de trauma, queimadura, reação adversa à medicação, entre outros; ou Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs<sup>2</sup>), que promovem a inflamação a partir do reconhecimento de agente infecciosos (bactérias, fungos, vírus) (PATEL, 2018). Independentemente do caráter do estímulo, a resposta inflamatória é iniciada com o recrutamento de células do sistema imune, gerando a secreção de uma série de mediadores inflamatórios como citocinas, prostaglandinas (PGs), leucotrienos, óxido nítrico (NO), fatores de necrose e de ativação plaquetária de forma a identificar e eliminar o agente causador do dano, reparar e recuperar a função tecidual, exercendo assim um papel remodelador fundamental (WYNN, 2008).

Alguns aspectos da resposta imune imposta pela sepse podem ser parcialmente mimetizados experimentalmente por meio da administração de lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina proveniente da membrana externa de bactérias gram-negativas caracterizada como PAMP e agente do quadro inflamatório denominado endotoxemia. Ao ser inoculado, o LPS estabelece uma ligação com uma glicoproteína de fase aguda denominada Proteína de Ligação ao LPS (LBP<sup>3</sup>) e com o CD14, formando o completo LPS-LBP-CD14 que, por sua vez, é reconhecido pelo receptor *toll-like* 4 (TLR-4), expresso em células imunes como macrófagos, células dendríticas e células *natural killer*. A ligação com TLR-4 ativa o fator nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), um fator de transcrição de citocinas que inicia a produção de mediadores pró-inflamatórios como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucinas 6 (IL-6) e 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), biomarcadores da inflamação aguda, assim como a síntese e liberação de mediadores anti-inflamatórios como a interleucina 10 (IL-10) (INUI, 2001; KAKIZAKI et al., 1999; OBERHOLZER; OBERHOLZER; MOLDAWER, 2002).

As principais citocinas pró-inflamatórias recrutadas para regular a resposta imunológica durante o processo inflamatório são as interleucinas 6 (IL-6) e 1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e o interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Elas são secretadas por diferentes células imunes, como macrófagos e células dendríticas, para estimular a resposta inflamatória e coordenar mecanismos de defesa. IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  são particularmente importantes para o crescimento, ativação

---

<sup>1</sup> Do inglês *Damage Associated Molecular Pattern*

<sup>2</sup> Do inglês *Pathogen Associated Molecular Pattern*

<sup>3</sup> Do inglês *Lipopolysaccharide Binding Protein*

celular, diferenciação e direcionamento de células imunológicas para locais de infecção. A IL-6 atua como fator de crescimento autócrino, regulando reações imunológicas e respostas proteicas de fase aguda (FARAJ; JALAL, 2023; YOSHIDA et al., 2002), enquanto IL-1 $\beta$  regula positivamente a IL-6. O TNF- $\alpha$ , por sua vez, é uma potente citocina pró-inflamatória que induz a síntese de IL-6 em diversas células, além de mediar a ativação de células imunes e aumentar a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, permitindo que os leucócitos cheguem ao local de inflamação.

A concentração periférica de citocinas pode ser modulada pelo Sistema Nervoso Central (SNC) por meio de uma via de sinalização colinérgica por meio de aferências do nervo vago denominada reflexo inflamatório. Este reflexo consiste numa via responsável por modular a resposta imune, controlando a inflamação por meio da subunidade  $\alpha 7$  do receptor nicotínico de acetilcolina ( $\alpha 7nAChR$ ) presente em células do sistema imune. O baço também atua neste reflexo por meio da noradrenalina (NE) liberada pelas terminações nervosas, que interage com os receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos presente nos linfócitos T e libera a acetilcolina que desencadeia a ação anti-inflamatória (VIDA et al., 2011). As aferências do reflexo inflamatório também envolvem terminais vagais subdiafragmáticos que detectam os níveis periféricos de citocinas (KOMEAGAE et al., 2018) e se projetam para o núcleo do trato solitário (BERTHOUD; NEUHUBER, 2000), induzindo a liberação de noradrenalina no hipotálamo (VILLANUEVA et al., 2009), região encefálica responsável pela regulação da temperatura corporal (FELEDER; PERLIK; BLATTEIS, 2007).

O hipotálamo responde a estímulos internos e externos, detectando mudanças de temperatura e equilibrando mecanismos de perda e produção de calor por meio da coordenação de diferentes agentes, como a pele, glândulas sudoríparas e vasos sanguíneos de modo a desencadear respostas apropriadas para a manutenção da temperatura corporal adequada. No contexto específico da inflamação, o hipotálamo detecta mediadores da resposta inflamatória, como as citocinas pirogênicas IL-1 $\beta$  e IL-6, ativando mecanismos de aumento produção e diminuição da perda de calor, produzindo, assim, o aumento regulado da temperatura corporal que estabelece um ambiente favorável ao combate de agentes patogênicos, resposta conhecida como febre.

A febre é considerada o marco da inflamação sistêmica e surge como produto de mecanismos termorreguladores autonômicos e comportamentais que agem no sentido de aumentar a produção e reduzir a perda de calor. Nesse contexto, um fator crucial para o desenvolvimento da resposta

febril é o estímulo à produção de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) na área pré-óptica do hipotálamo (AVPO<sup>4</sup>) pelas citocinas circulantes. A PGE<sub>2</sub>, conhecida como mediadora proximal da febre, liga-se ao receptor EP<sub>3</sub> ligado à proteína Gi, inibindo a adenilato ciclase e consequentemente os níveis intracelulares de AMPc, resultando em menor atividade dos receptores de calor e aumento da Tb (IVANOV; ROMANOVSKY, 2004; STEINER; ANTUNES-RODRIGUES; BRANCO, 2002), o que favorece a atividade imunológica (EVANS; REPASKY; FISHER, 2015; JIANG et al., 2000; KLUGER et al., 1998) e é considerado um parâmetro de avaliação primário em termos de sinalização imune ao sistema nervoso central (SNC).

Os mesmos mecanismos centrais e periféricos, responsáveis por produzir e liberar PGE<sub>2</sub>, também produzem outras prostaglandinas, como a prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), cujos níveis no plasma e AVPO estão aumentados durante o desafio imune induzido por LPS (KRALL et al., 2010). Há evidências que associam esses níveis elevados de PGD<sub>2</sub> a um mecanismo de contrarregulação da febre e consequente desenvolvimento de hipotermia (FORSTERMANN; HELDT; HERTTING, 1983; UENO et al., 1982), embora os estudos de PGD<sub>2</sub> sobre termorregulação ainda sejam insuficientes. Há também evidências que sugerem o desenvolvimento de hipotermia a partir de um estado febril promovido pelo aumento da produção de TNF- $\alpha$  (LEON, LISA, 2004), assim como a ciclooxigenase-1 (COX-1) é um potencial mediador da indução da hipotermia em modelo de LPS (STEINER et al., 2009). Esses estudos representam, no entanto, um corpo relativamente pequeno de evidência a respeito da mediação da hipotermia induzida por LPS, cujos mecanismos subjacentes permanecem pouco conhecidos quando comparados ao que se sabe sobre os mecanismos da reposta febril.

Assim como a febre, a hipotermia é produzida por mecanismos termorreguladores autonômicos e comportamentais, porém seu desenvolvimento é mais característico nos casos mais graves de inflamação sistêmica. A visão predominante a respeito da hipotermia espontânea em pacientes com sepsis é de que ela representa uma deficiência imunológica prejudicial devido à sua relação com o aumento da mortalidade (CLEMMER et al., 1992; KUSHIMOTO et al., 2013), sendo especificamente associada ao aumento do risco de linfopenia persistente (DREWRY et al., 2015), níveis plasmáticos elevados de IL-6, TNF- $\alpha$  e excreção urinária de mediadores lipídicos derivados da ciclooxigenase (ARONS et al., 1999), o que implica a existência de uma disfunção inflamatória. No entanto, a maioria dos estudos clínicos sobre o efeito da queda acentuada da Tb

---

<sup>4</sup> Do inglês *Antero-Ventral Preoptic area*

tem se limitado à hipotermia terapêutica ou acidental, deixando uma lacuna de conhecimento a respeito de pacientes com sepse que desenvolvem hipotermia devido a uma resposta imune desregulada ou por outro motivo ainda não determinado. Conseqüentemente, a correlação estabelecida entre a resposta hipotérmica e o aumento da mortalidade tem sido contestada por estudos em animais que avaliam sua fisiopatologia, bem como os elementos que contribuem para o mau prognóstico de pacientes hipotérmicos (FONSECA et al., 2016; PERES BOTA et al., 2004).

Romanovsky e colaboradores (1998) propuseram que, assim como a febre, a hipotermia representa uma estratégia adaptativa para combater a inflamação sistêmica e esta hipótese tem sido repetidamente validada por estudos em diferentes modelos de inflamação (LI et al., 2015; LIU et al., 2012; ROMANOVSKY; SZÉKELY, 1998), mostrando que ela pode resultar em redução de danos aos órgãos e menores taxas de mortalidade, por vezes de modo independente à capacidade do hospedeiro de combater ou tolerar a inflamação. Este elemento deu início a uma base para incorporar os conceitos de Resistência à Doenças e de Teoria da Tolerância da imunologia animal (MEDZHITOV; SCHNEIDER; SOARES, 2012), estabelecendo um paralelo com a termorregulação na inflamação. Sob esta perspectiva, a hipotermia e o hipometabolismo promoveriam tolerância ao desafio imunológico, enquanto a febre seria um mecanismo de resistência a essa condição (GANESHAN et al., 2019; GARAMI; STEINER; ROMANOVSKY, 2018; STEINER; ROMANOVSKY, 2019). Além disso, há evidências que sustentam que durante a endotoxemia ainda há equilíbrio entre a oferta e o consumo de oxigênio, prevenindo a hipóxia tecidual quando as respostas hipometabólicas e hipotérmicas não são prevenidas (CORRIGAN et al., 2014) e que a hipotermia pode diminuir a disfunção pulmonar ao prevenir infiltração de neutrófilos (LIU et al., 2012).

Mota et al. (2017, 2019) demonstraram a modulação da hipotermia a partir da injeção central de serotonina (5-HT) exógena, assim como a atenuação de marcadores inflamatórios em animais endotoxêmico. Outros estudos também contribuem para demonstrar o potencial anti-inflamatório da 5-HT por meio de subtipos de receptores (5-HTR) presentes nas células do sistema imunológico, modulando a produção de citocinas inflamatórias (BLESSING, 2004; BROWN et al., 2008; GARGAGLIONI; STEINER; BRANCO, 2005; NAUMENKO; KONDAUROVA; POPOVA, 2011), além de uma ação via reflexo anti-inflamatório, uma vez que a 5-HT mostrou modular essa via agindo sobre o baço (HERR; BODE; DUERSCHMIED, 2017; MOTA et al., 2019). A 5-HT é ainda capaz de influenciar a migração e a ativação de células imunológicas e a função das células

endoteliais e das plaquetas (DUERSCHMIED et al., 2013; HERR et al., 2014; HERR; BODE; DUERSCHMIED, 2017) modulando ainda mais o processo inflamatório, no entanto, os mecanismos subjacentes da ação da 5-HT no controle da inflamação sistêmica, especialmente via ativação do reflexo inflamatório, ainda não foram completamente esclarecidos.

Os trabalhos sobre a relação de mecanismos imunomoduladores com o sistema serotoninérgico incluem, além da 5-HT, inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRSs), uma classe de medicamentos amplamente prescritos para o tratamento da depressão e outros transtornos psiquiátricos, com capacidade de atuar no sistema serotoninérgico por meio da inibição da recaptação de 5-HT, aumentando sua concentração na fenda sináptica. Os ISRS têm como alvo a proteína transportadora de serotonina (SERT<sup>5</sup>), prevenindo a recaptação da serotonina nos terminais pré-sinápticos e prolongando sua disponibilidade na fenda sináptica. Além disso, eles modulam os receptores pós-sinápticos de 5-HT (subtipos HTR1 e HTR2), mediando sinais por meio de cascatas de segundos mensageiros. Os ISRS podem ainda influenciar a resposta inflamatória por meio da regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias, da modulação da atividade de células do sistema imune e da influência sobre as vias de sinalização inflamatória, como a via do NF- $\kappa$ B (LEE et al., 2022), além de demonstrarem capacidade de reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio e a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais.

O uso de ISRSs foi sugerido para o estudo dos efeitos imunomoduladores e termorregulatórios do aumento da biodisponibilidade de 5-HT, investigando o efeito de um ISRS sobre os parâmetros neuroimunes em animais com inflamação sistêmica induzida por LPS. Para isto, a escolha da fluoxetina (FLX) entre os ISRS disponíveis comercialmente foi baseada na sua alta afinidade por receptores 5-HT<sub>2</sub> (BYMASTER et al., 2002; HYTTEL, 1994), via pela qual a 5-HT age no baço modulando o reflexo anti-inflamatório. Além disso, a FLX é amplamente utilizada por pessoas com depressão e ansiedade (PEREZ-CABALLERO et al., 2014), sendo o único ISRS listado na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename), instrumento para o tratamento e controle de patologias prevalentes no país por meio do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

O potencial papel imunomodulador da FLX tem sido investigado em uma variedade de condições inflamatórias, incluindo doenças autoimunes, inflamação neurogênica e condições associadas à resposta inflamatória exacerbada (BHAT et al., 2017; CAKIR et al., 2023; CREEDEN

---

<sup>5</sup> Do inglês *Serotonin Transporter*

et al., 2021; LIU et al., 2017b). No entanto, efeito do aumento da biodisponibilidade de 5-HT causada por causada pela FLX durante a inflamação, especialmente no que diz respeito aos aspectos termorregulatórios, ainda permanece pouco elucidado. Desta forma, acreditamos no estudo da fluoxetina como forma de explorar o potencial translacional de trabalhos sobre o papel neuroimune da 5-HT já publicados, assim como os mecanismos termorregulatórios envolvidos, de maneira a investigar uma nova estratégia terapêutica frente às complicações impostas pelas formas graves de inflamação sistêmica.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar o efeito do pré-tratamento com fluoxetina sobre a resposta imune e os mecanismos termorreguladores em animais com inflamação sistêmica induzida por LPS.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito da fluoxetina sobre a produção de mediadores inflamatórios durante a inflamação sistêmica.
- Investigar se a fluoxetina apresenta efeito termorregulador frente ao desafio imune por meio das medidas de temperatura corporal, bem como dos termofetores: termogênese sem tremor (por meio da medida do consumo de oxigênio) e perda de calor (por meio da medida da temperatura cutânea da cauda).

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Animais**

Foram utilizados ratos *Sprague Dawley* de massa corporal entre 250 e 320g, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto (USP-RP). Os animais foram alojados no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP), e permaneceram em ambiente com temperatura controlada ( $25 \pm 1$  °C), sistema de



exaustão de ar e ciclo claro/escuro de 12 horas. Além disso, os animais foram mantidos em grupos de 3 animais em caixa moradia (dimensões de 40cmx33cmx17cm) com ração padrão e água filtrada *ad libitum*. No dia anterior e no dia do experimento os animais foram submetidos à temperatura ambiente de  $22 \pm 1$  °C, valor que determina uma zona subtermoneutra para ratos (ROMANOVSKY; IVANOV; SHIMANSKY, 2002). Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (Protocolo CEUA nº 2021.1.592.58.0), e os protocolos e procedimentos estão de acordo com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do Conselho Nacional para o Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

### 3.2. Fármacos

A indução da inflamação sistêmica em ratos por meio do LPS tem sua fisiopatologia bem descrita na literatura, sendo o modelo experimental usualmente utilizado para o estudo da termorregulação durante o desafio imune (GARAMI; STEINER; ROMANOVSKY, 2018). Sendo assim, foi utilizado LPS extraído de *Escherichia coli* (sorotipo 0111: B4, lote 0000122174, Sigma-Aldrich, EUA), diluído em solução salina 0,9% estéril e administrado via intravenosa (iv) na dose de 1,5 mg/kg. A dose escolhida é baseada na demonstração prévia de sua capacidade de induzir hipotermia (GIUSTI-PAIVA et al., 2003; MOTA et al., 2019).

O cloridrato de fluoxetina (Prozac®, Eli Lilly and Company, USA) foi dissolvido em solução salina 0,9% estéril e administrado via intragástrica (gavagem) na dose de 10 mg/kg. A escolha da dose de fluoxetina foi baseada em estudos previamente publicados (HRDINA; VU, 1993; LE POUL et al., 2000; ROUMESTAN et al., 2007; ZHENG et al., 2021).

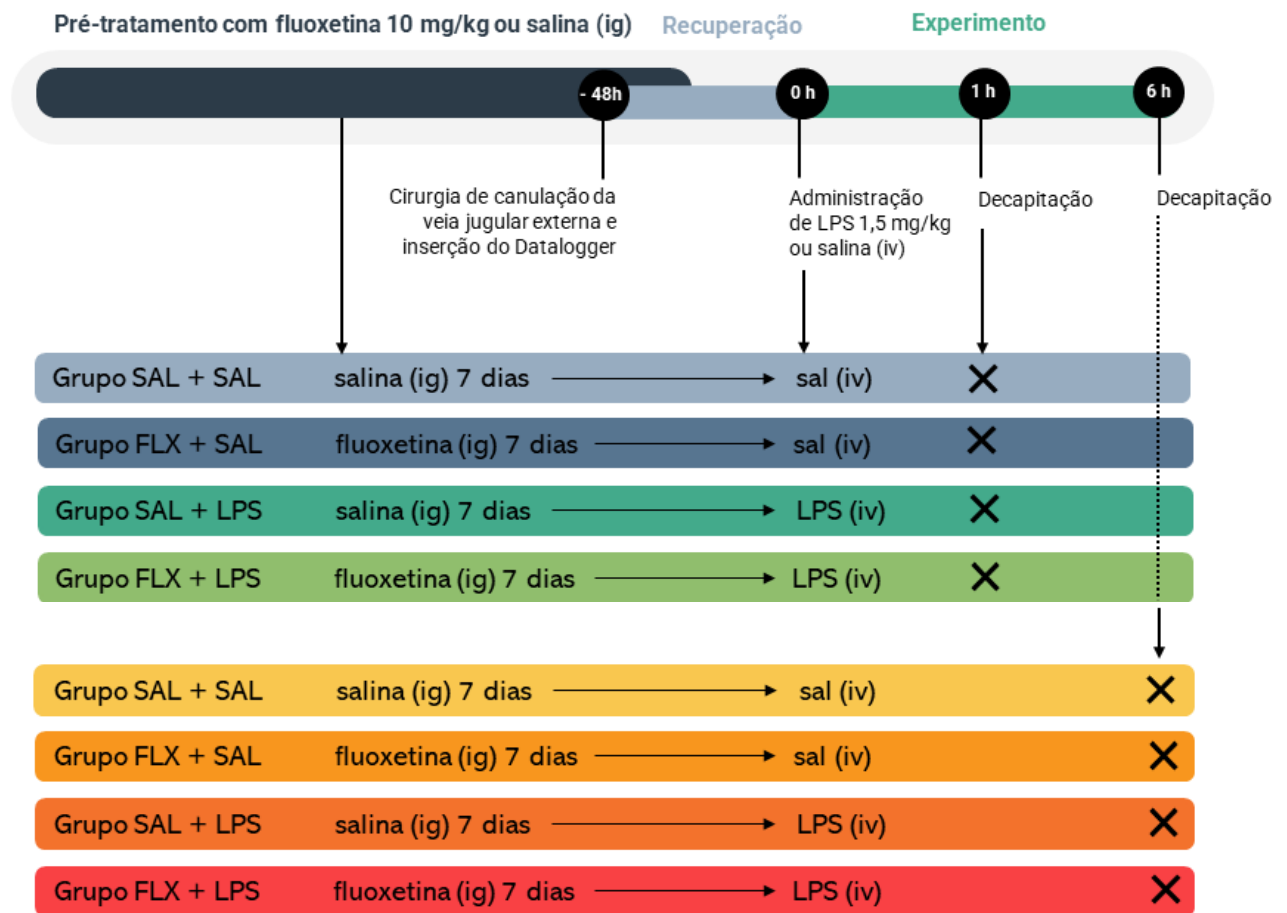
Para a cirurgia de canulação da veia jugular externa e inserção do *datalogger* na cavidade peritoneal os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (90 mg/kg, ip) e xilazina (9 mg/kg, ip). No período de recuperação, foi administrado o analgésico tramadol (20 mg/kg, sc).

### 3.3. Procedimento cirúrgico

*Canulação da veia jugular externa e inserção do datalogger:* 48 horas antes da indução da inflamação sistêmica, os animais foram anestesiados (9 mg/kg xilazina e 90 mg/kg cetamina, ip) em campo cirúrgico asséptico e foi realizada a canulação da veia jugular externa a partir da incisão longitudinal de 1 cm na superfície ventral do pescoço, a 1 cm da traqueia. A veia foi exposta, isolada dos tecidos conectivos e amarrada. Uma cânula de silicone (Silastic, Dow Corning CO, Midland, MI, EUA, com 10 cm de comprimento, 0,51 mm de diâmetro interno e 0,94 mm de diâmetro externo) foi introduzida na veia e presa por linhas de sutura estéril, enquanto a porção livre da cânula foi transpassada por baixo da pele e exteriorizada no dorso do animal. Salina heparinizada (4 mL heparina/10 mL salina) foi utilizada para manter a cânula desobstruída. Em seguida, foi realizada a incisão das camadas abdominais superficiais até a abertura do peritônio para inserção do mini *datalogger* (SubCue, Calgary, AB, Canadá) para o registro da temperatura corpórea (Tb). As camadas incisionadas foram suturadas e, após a cirurgia, os animais foram tratados com analgésico (Tramadol, 20 mg/kg, sc), observados até a recuperação e deixados sem perturbações em caixas individuais.

### 3.4. Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos experimentais e foram pré-tratados com 10 mg/kg de fluoxetina ou o seu veículo durante 7 dias por gavagem. No sexto dia de pré-tratamento, os ratos foram submetidos a uma cirurgia de canulação da veia jugular externa e inserção de *datalogger* na cavidade peritoneal. No sétimo e último dia de pré-tratamento, os animais foram realocados para uma sala com temperatura controlada a  $22 \pm 1$  °C para aclimação em zona subtermoneutra. No dia seguinte, foi realizada a injeção intravenosa via cânula de LPS a 1,5 mg/kg ou de seu veículo. Os animais foram eutanasiados 1 ou 6 horas após a administração de LPS para a coleta de sangue, do baço, do hipotálamo e do tecido adiposo marrom, a fim de avaliar temporalmente os efeitos da fluoxetina durante a hipotermia (Figura 1).



### 3.5. Medida indireta de termogênese sem tremor por consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio foi determinado em ratos conscientes e sem restrição, no estado alimentado e alojados em uma câmara individual de acrílico hermeticamente fechada. Os ratos foram aclimatados e adaptados ao aparato um dia antes da medida basal. A coleta de amostras de  $O_2$  no primeiro dia de experimento foi realizada 1 hora antes e durante as 6 horas seguintes à administração intravenosa de solução salina nos animais. No dia seguinte, os mesmos animais passaram coleta de amostras de  $O_2$  1 hora antes e 6 horas após a injeção intravenosa de LPS. As amostras de ar passaram por um analisador Oxylet Physiocage™ (PanLab, Barcelona, Spain). Para o cálculo do consumo de  $O_2$  ( $VO_2$ ), os dados de  $FO_{2IN}$ ; fração de  $O_2$  na saída da câmara ( $FO_{2OUT}$ ), fluxo de ar em mililitros por minuto e o peso do animal em kilogramas ( $P_c$ ) foram plotados para o cálculo, segundo a fórmula:

$$VO_2 = Fluxo\ de\ ar\ (FO_{2IN} - FO_{2OUT})\ P_c^{-1}$$

### 3.6. Medida do Índice de Perda de Calor (*Heat Loss Index – HLI*)

Foram coletadas a temperatura corporal ( $T_b$ ), a temperatura cutânea da cauda ( $T_{sk}$ ) e a temperatura ambiente ( $T_a$ ) para o cálculo do HLI (ROMANOVSKY; IVANOV; SHIMANSKY, 2002a) de acordo com a fórmula:

$$HLI = (T_{sk} - T_a)(T_b - T_a)^{-1}$$

A  $T_b$  foi aferida pelo mini sensor de temperatura *datalogger* programado para o período do experimento, com dados registrados a cada 5 minutos e acessados via software SubCue. A  $T_{sk}$  foi determinada por uma câmera termográfica (sensibilidade de 0,1°C; FLIR ONE; FLIR Systems Inc.) com foco no segundo terço médio do comprimento da cauda como referência. Esta aferição foi realizada 30 minutos antes e a cada 30 minutos após a administração de LPS ou seu veículo. A  $T_a$  foi mantida em  $22 \pm 1$  °C e verificada a cada 30 minutos por dois termômetros.

### 3.7. Coleta e preparo de amostras

O sangue dos animais foi coletado em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e centrifugado (3500 rpm, 20 minutos, 4 °C) para a coleta do plasma. As amostras de hipotálamo, baço e tecido adiposo foram extraídos imediatamente após a decaptação e congelados em nitrogênio líquido. Todas as amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C. As amostras de baço foram homogeneizadas em PBS com coquetel de inibidores de proteases e fosfatases e centrifugadas (4300 rpm, 20 minutos, 4 °C) para coleta do sobrenadante. As amostras de hipotálamo e de tecido adiposo marrom foram homogeneizadas em RIPA buffer (Sigma-Aldrich, R0278), contendo 10% de coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich, P2714) e 0,5% de fluoreto de fenilmetilsufonil (PMSF). O homogeneizado resultando foi centrifugado (hipotálamo a 4300 rpm a 4 °C por 20 minutos e TAM a 15000 RCF a 4 °C por 10 minutos) e o sobrenadante coletado. A dosagem de proteína total foi determinada nos sobrenadantes de acordo com protocolo baseado no ensaio de proteína BCA Pierce (Thermo Fisher Scientific, USA Laboratories, EUA) e usado para a normalização de todos os ensaios.

### **3.8. Western Blotting**

Quantidades iguais (30 µg) de proteínas foram separadas por eletroforese em géis de Tris-glicina SDS-PAGE 12% (50 V por 20 min, 125 V, 120 min) e transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 µm; Millipore) em tanques de eletroforese (100 V, 120 min). As membranas foram então bloqueadas em solução de albumina de soro bovino (BSA 5 % em TBS, com 0.2 % Tween 20) durante 1 h em temperatura ambiente e incubadas de um dia para o outro a 4 °C em agitação leve com o anticorpo primário anti-UCP-1 (1:4000, AbCam) e  $\alpha$ -tubulina (1:10000, Cell Signaling). Depois, foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com HRP (1:10000, Cell Signaling), durante 2 h em agitação leve a 4 °C. As bandas foram visualizadas usando o sistema ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories, EUA), quantificadas utilizando o software ImageLab (Bio-Rad Laboratories, EUA) e normalizadas de acordo com o controle interno de  $\alpha$ -tubulina.

### **3.9. Dosagem de citocinas e prostaglandinas no plasma, baço e hipotálamo**

As citocinas do plasma (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IFN- $\gamma$ ), do baço (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10) e do hipotálamo (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) foram analisadas por kits para ensaio de imun absorção enzimática (ELISA) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

### **3.10. Dosagem de nitrito/nitrato (NOX)**

A dosagem dos níveis plasmáticos de nitrato será realizada por meio do método de quimioluminescência NO/O<sub>3</sub>. O conteúdo proteico das amostras será analisado pelo método de Lowry (Bio-Rad, EUA) via analisador *Sievers® Nitric Oxide Analyzer 280* (GE Analytical Instruments, Boulder, CO, EUA). Os resultados serão normalizados pela concentração proteica de cada amostra.

### **3.11. Dosagem de serotonina**

Os níveis de 5-HT foram determinados no plasma e no hipotálamo por kits para ensaio de imun absorção enzimática (ELISA) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

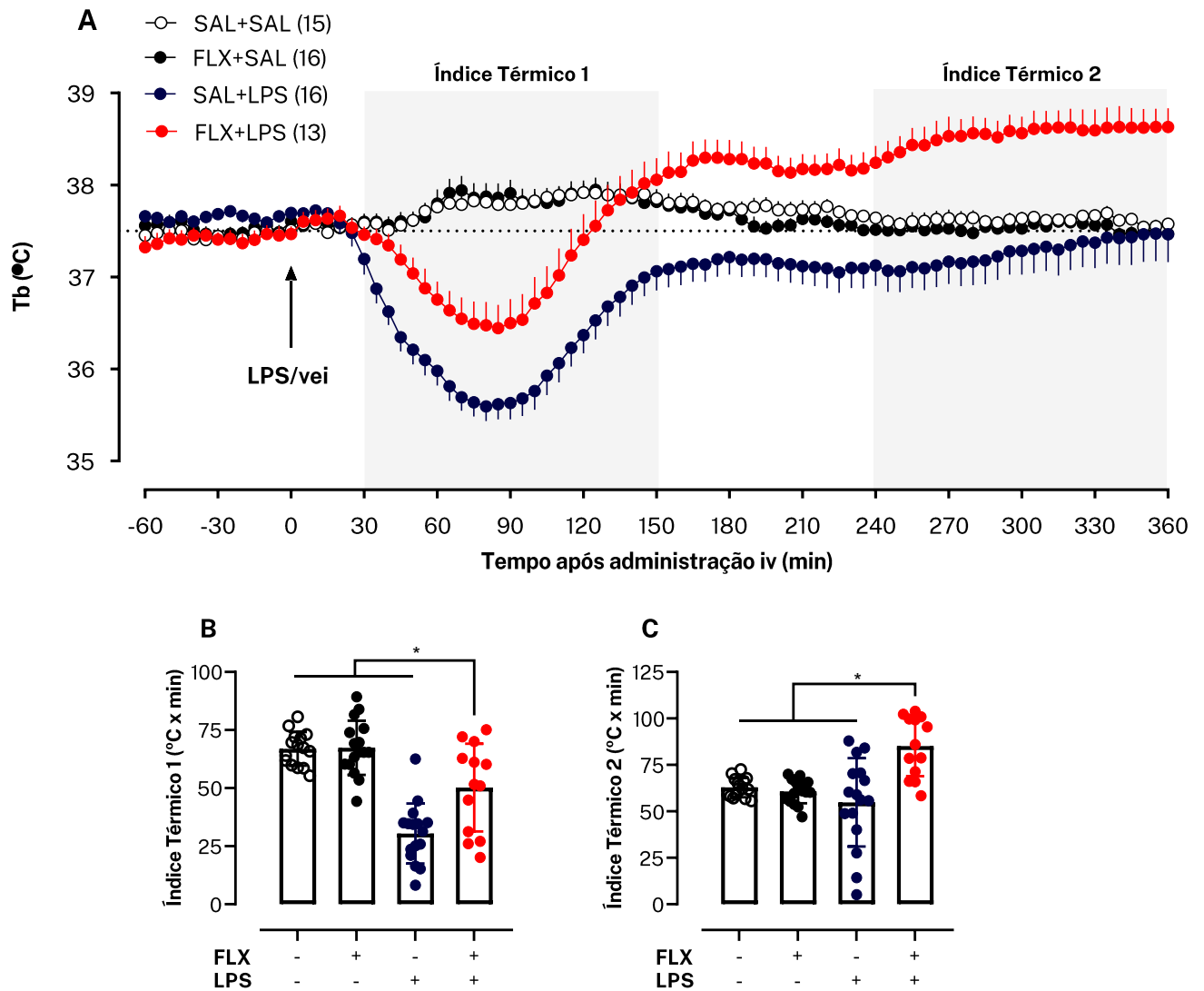
### **3.12. Análise estatística**

Em variáveis com distribuição normal foi utilizado o teste estatístico ANOVA, enquanto as sem distribuição normal foram submetidas à análise não paramétrica pelo teste de *Kruskal-Wallis*, seguida dos pós-testes adequados a cada análise – *Tukey* (paramétricos) e *Dunn* (não-paramétricos). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Diferenças são consideradas significativas quando  $P < 0.05$ .

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. A administração de fluoxetina atenuou a hipotermia desenvolvida por animais com inflamação sistêmica aguda.**

Os animais pré-tratados com fluoxetina na dose de 10 mg/kg (FLX+SAL) permaneceram eutérmicos durante todo o período experimental quando comparados com o seu grupo controle (SAL+SAL), mostrando que a droga não apresenta efeito termogênico em condições fisiológicas. Por outro lado, no quadro de endotoxemia induzido por LPS a 1,5 mg/kg, a fluoxetina demonstrou atenuar o quadro de hipotermia desenvolvido nas 2 horas seguintes à administração iv de LPS, modulando a Tb durante todo o período experimental (Figura 1). Desta maneira, foi demonstrado o efeito termorregulador da fluoxetina sobre os animais submetidos à endotoxemia (FLX+LPS), mas não sobre os animais controle (FLX+SAL), afirmando, portanto, a ação da fluoxetina sobre o controle da temperatura corporal especificamente durante o desafio imune sistêmico.

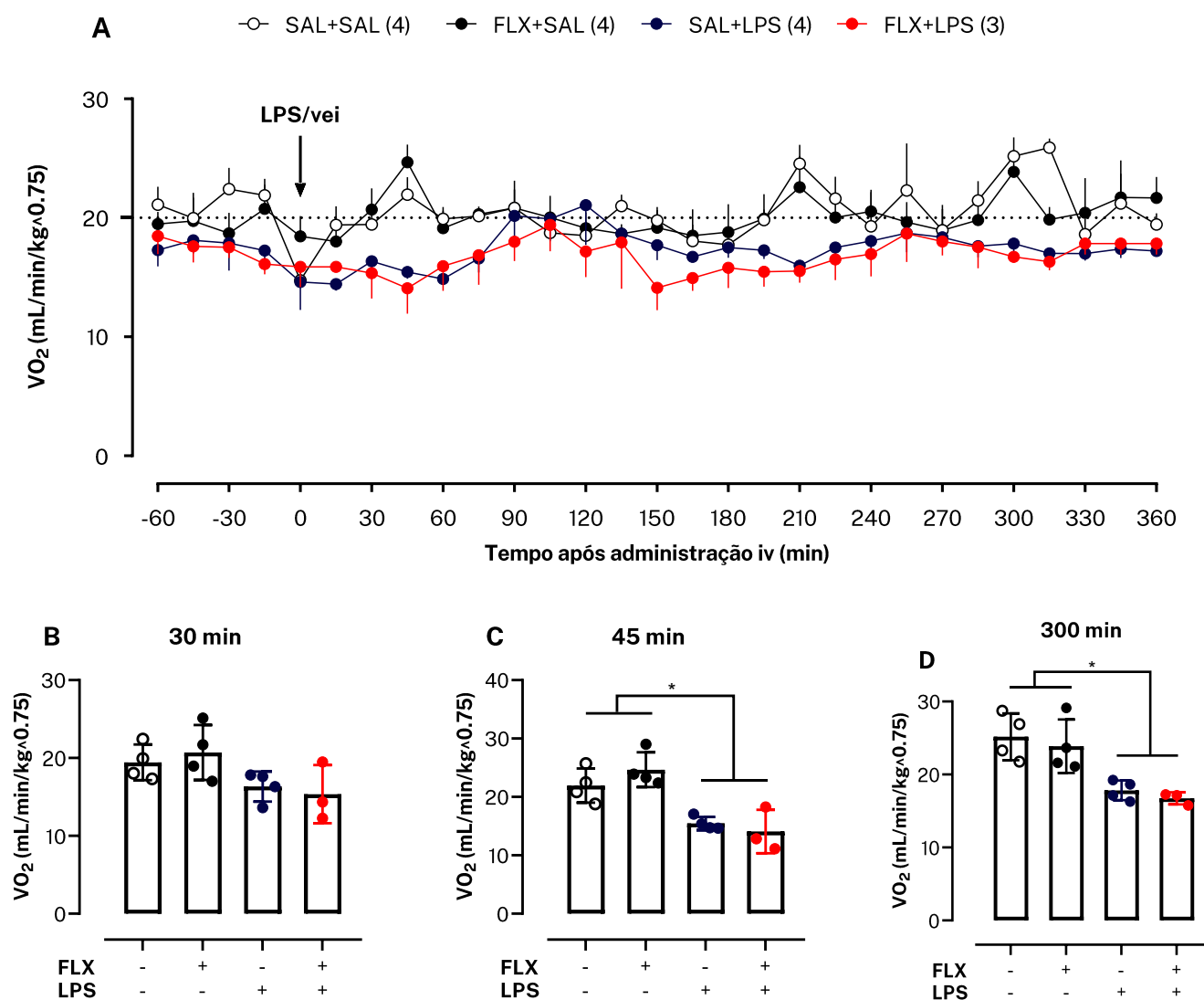


**Figura 1.** (A) Variação temporal da Tb de ratos tratados com fluoxetina ou veículo ig e LPS ou veículo iv. Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA de duas vias e pós-teste de Tukey. Índices térmicos (°C x min) dos períodos entre 30 e 150 minutos (B) e entre 240 e 360 minutos (C) representado pela área sob a curva do período correspondente. Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão (DP). \* $p < 0,05$ . 13-16 animais por grupo.

#### 4.2. A hipotermia foi controlada pelo mecanismo termorregulador de perda de calor pela pele da cauda.

Para se investigar as respostas termoeferas autonômicas que determinam o desenvolvimento da hipotermia e da febre, foi avaliado o  $VO_2$  (Figura 2) e concentração de UCP-1 no TAM (Figura 3), medidas indiretas de termogênese de não-tremor, bem como o tônus vasomotor cutâneo, mensurado indiretamente pelo Índice de Perda de Calor (Figura 4).

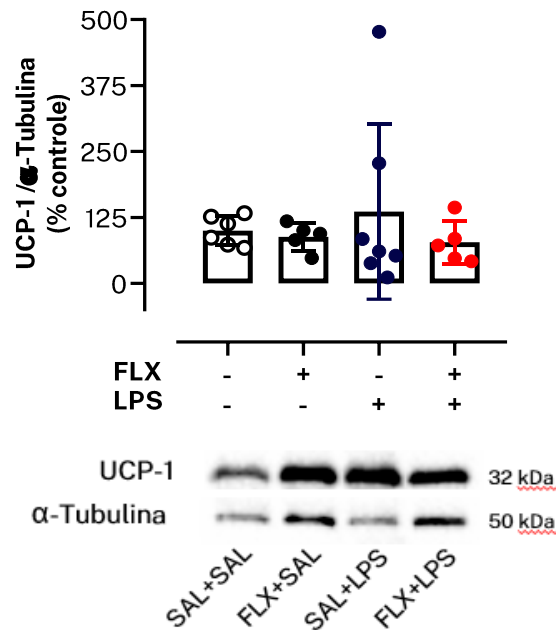
Os ratos endotoxêmicos (SAL+LPS e FLX+LPS) mostraram queda do  $VO_2$  em 45 (Figura 2C) e 300 minutos (Figura 2D) após o desenvolvimento da hipotermia quando comparados com os grupos controle (SAL+SAL e FLX+SAL). Não houve diferença significativa de consumo de oxigênio entre os mesmos grupos durante o desenvolvimento da hipotermia (30 a 150 minutos), ou entre os grupos endotoxêmicos (FLX+LPS e SAL+LPS) em ambos os períodos (Figura 2A).



**Figura 2.** (A) Consumo de  $O_2$  de ratos tratados com fluoxetina ou veículo ig e LPS ou veículo iv. Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA de duas vias e pós-teste de Tukey. Consumo de  $O_2$  em 30 min (B), 45 min (C) e 300 min (D) após a administração de LPS ou veículo. Para a análise estatística foi utilizado o teste o teste ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão (DP). \* $p < 0,05$ . 3-4 animais por grupo.

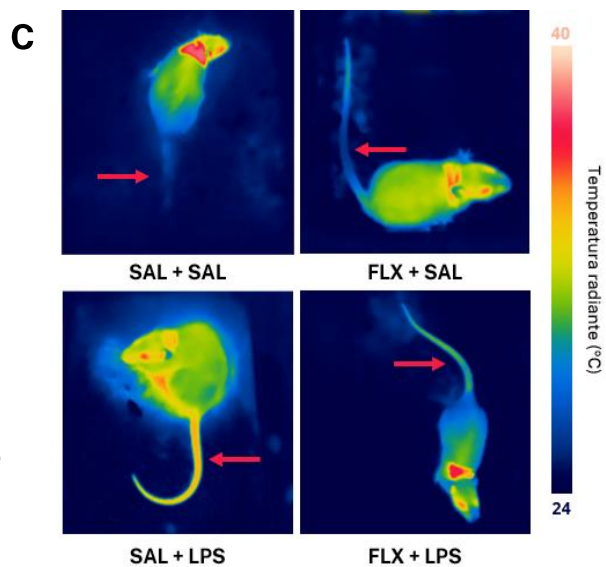
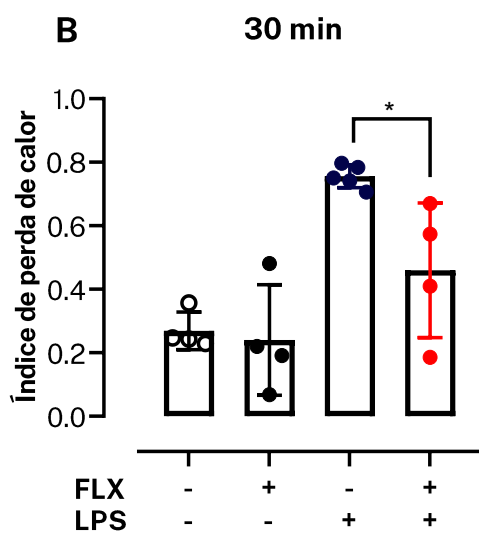
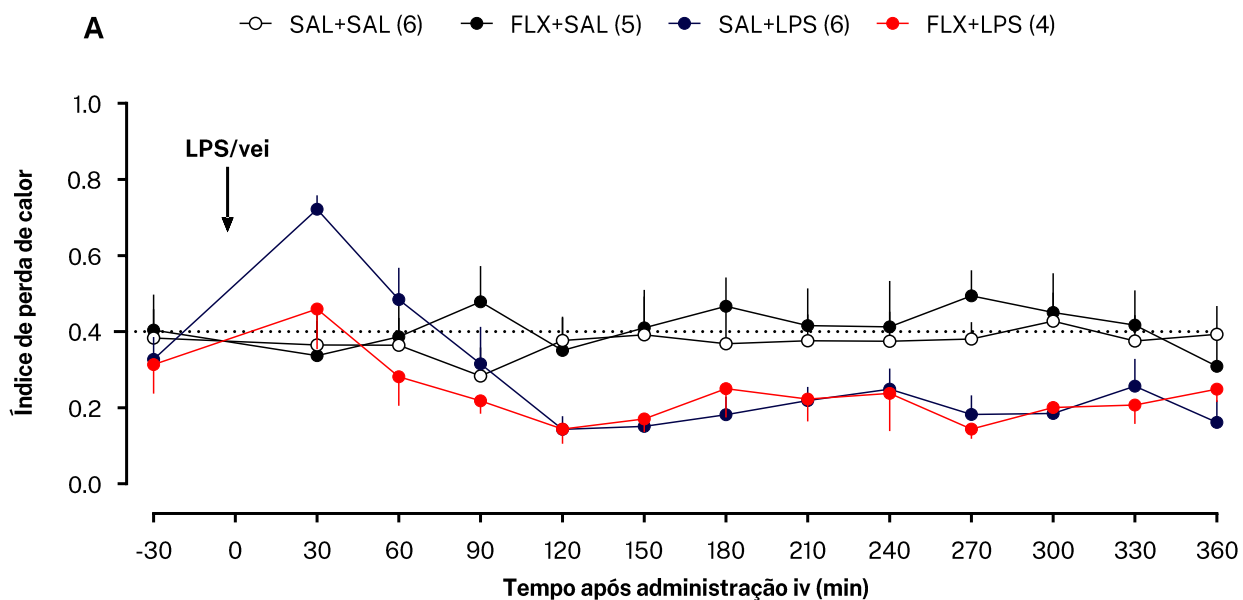


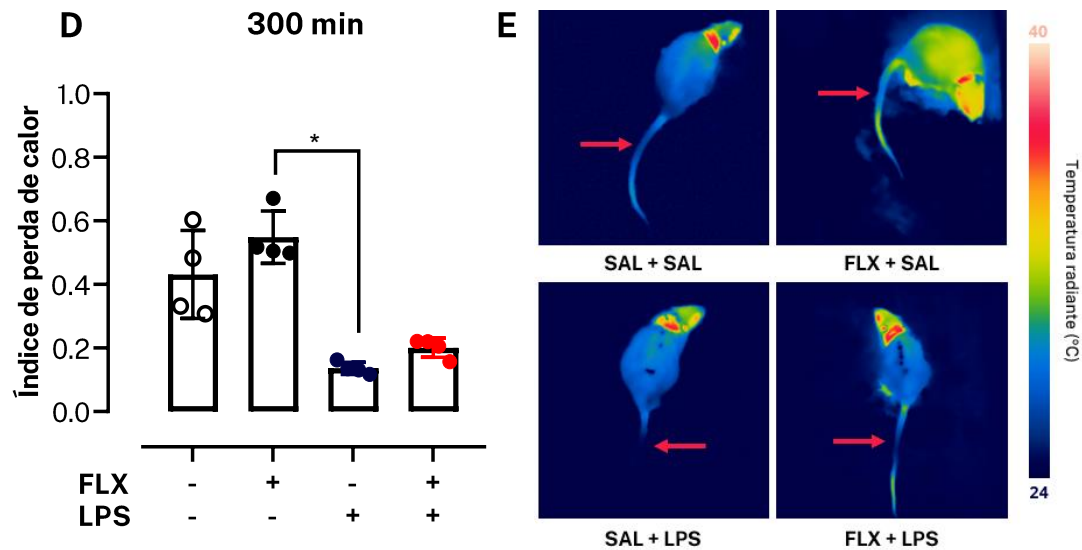
Para aprofundar a avaliação do papel termogênico do TAM, foi quantificada a expressão de UCP-1 neste tecido (Figura 3) e os dados gerados confirmaram o resultado do consumo de O<sub>2</sub>, uma vez que não houve diferença significativa entre os grupos avaliados. Estes resultados indicam a não participação ou uma ação coadjuvante do TAM sobre o desenvolvimento da hipotermia induzida pelo LPS, bem como na atenuação da queda da Tb com o tratamento com FLX.



**Figura 3.** Expressão de UCP-1 no tecido adiposo marrom de ratos tratados com fluoxetina ou veículo ig e LPS ou veículo iv em 6 horas. Para a análise estatística foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão (DP). \* $p < 0,05$ . 5-7 animais por grupo.

O cálculo do Índice de Perda de Calor, a partir dos dados da termografia de cauda, temperatura corporal e temperatura ambiente, mostrou intensa atividade vasomotora cutânea durante a hipotermia observada nos primeiros 30 minutos após administração do LPS (Figura 4B), demonstrando que esta resposta autonômica parece contribuir de maneira mais significativa para a termorregulação durante o desafio imune. A perda de calor mais acentuada nos grupos experimentais hipotérmicos (SAL+LPS e FLX+LPS) revela o desenvolvimento controlado de temperaturas subtermoneutras diante da endotoxemia aguda.

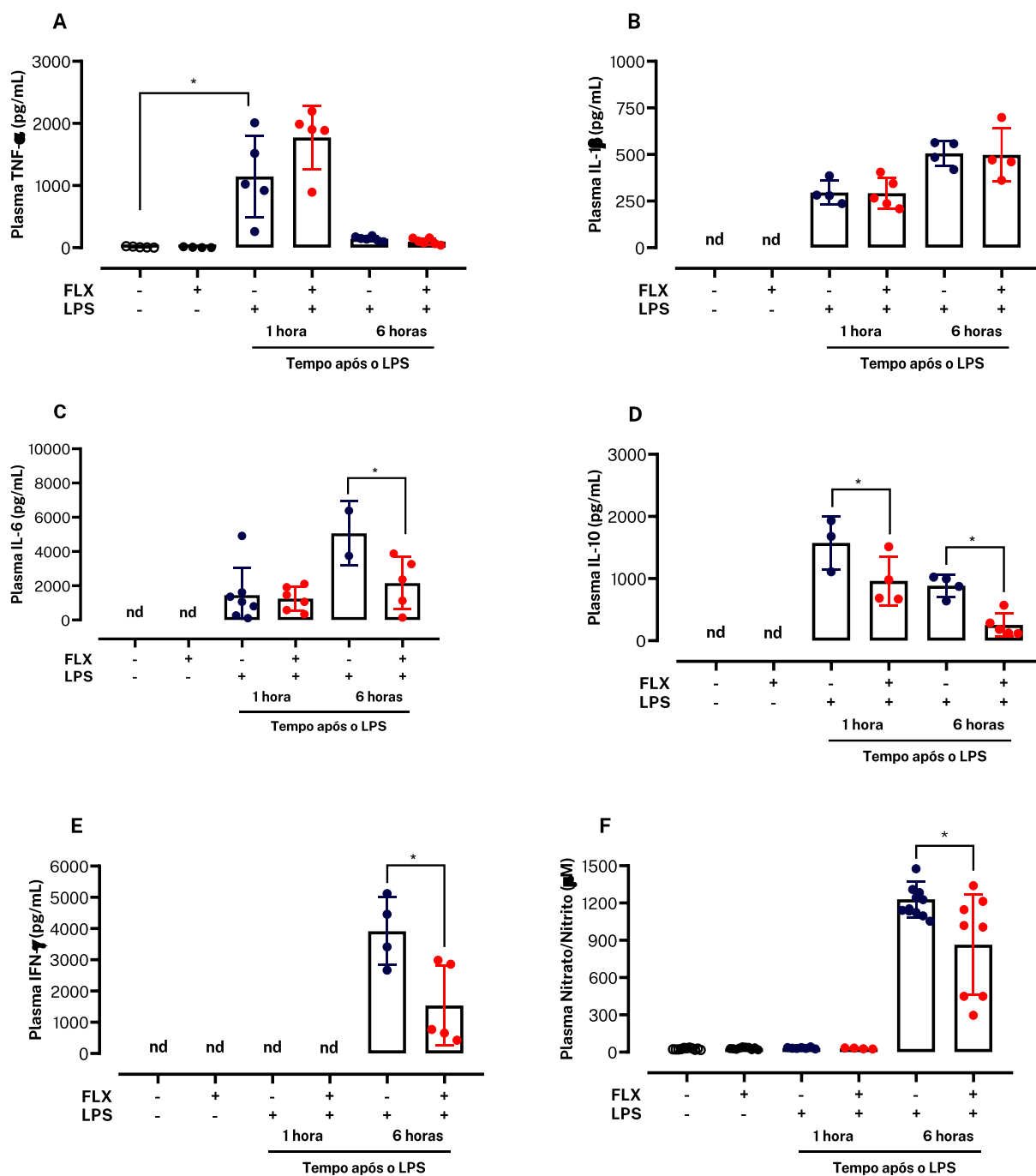




**Figura 4.** (A) Índice de perda de calor de ratos tratados com fluoxetina ou veículo ig e LPS ou veículo iv. Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA de duas vias e pós-teste de Tukey. Índice de perda de calor 30 minutos (B) e 300 minutos (D) após a administração de LPS ou veículo. Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey ou o teste de Kruskal-Wallis. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão (DP). \* $p < 0,05$ . 4-6 animais por grupo. Imagens termográficas representativas dos grupos que receberam FLX ou SAL e LPS ou SAL em 30 (C) e 60 minutos (E). As setas apontam para o ponto de aferição da Tsk.

### 4.3. A fluoxetina modulou as respostas imunes periféricas 6 horas após a administração de LPS.

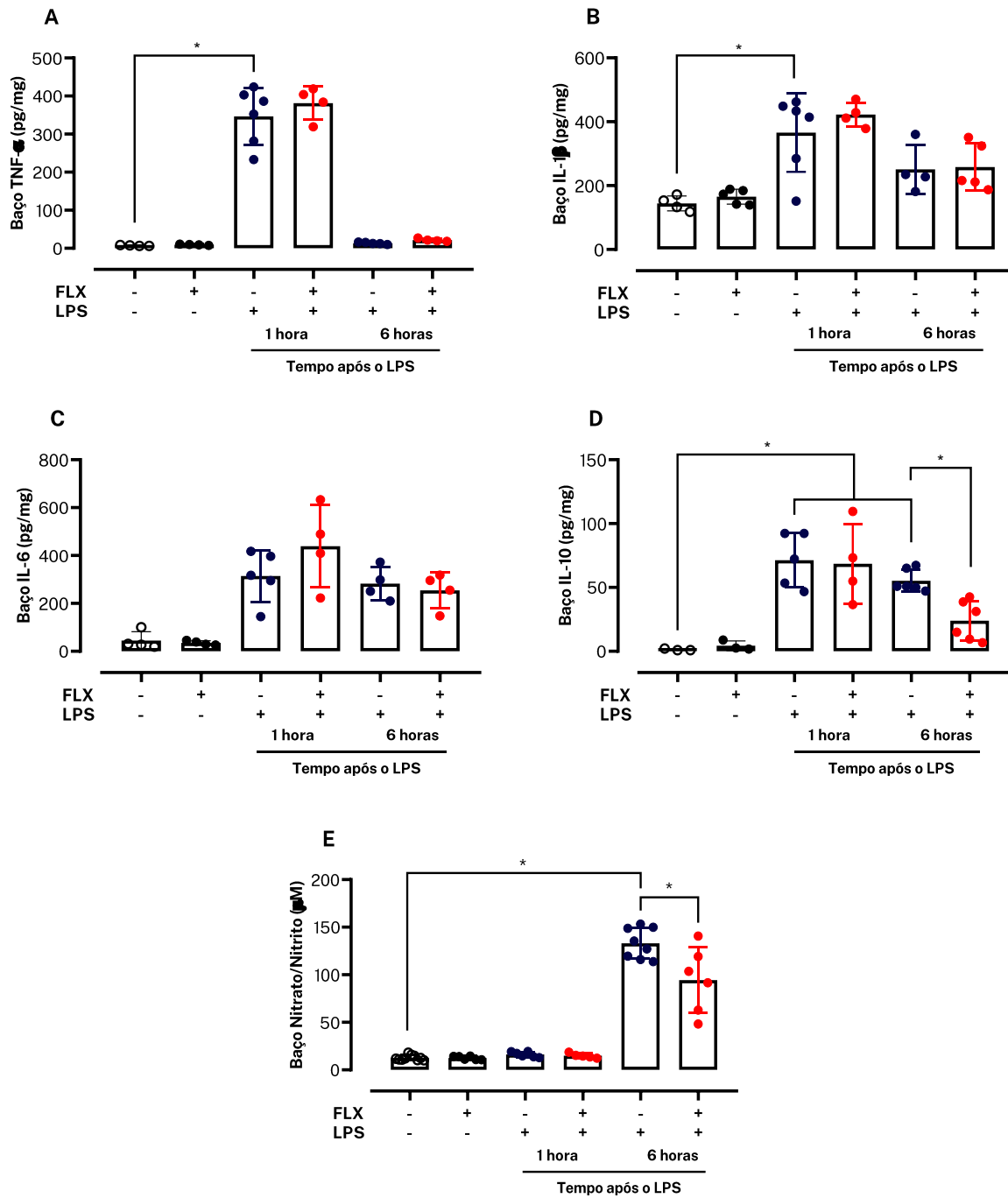
A concentração plasmática dos mediadores inflamatórios TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e NO (Figura 5) foram analisadas 1 e 6 horas após a administração de LPS para avaliação da ação inflamatória do LPS no modelo experimental e do potencial anti-inflamatório periférico da fluoxetina durante a inflamação sistêmica. Foi possível observar um aumento na concentração de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 em 1 hora e de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e NO em 6 horas nos animais submetidos à endotoxemia (SAL+LPS), quando comparados ao grupo controle (SAL+SAL) demonstrando o desenvolvimento adequado do modelo experimental. O pré-tratamento de 7 dias com fluoxetina reduziu as concentrações séricas de IL-10 1 hora após a administração de LPS e de IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e NO após 6 horas nos animais endotoxêmicos (FLX+LPS), quando comparados com os animais pré-tratados com o veículo (SAL+LPS), indicando uma ação anti-inflamatória distinta da droga no período de recuperação da eutermia ou elevação da temperatura corporal seguinte ao desenvolvimento de hipotermia. Não houve diferença entre os grupos na análise de IL-6 em 1 hora ou de IL-1 $\beta$  em 1 ou 6 horas.



**Figura 5.** Níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-6 (C), IL-10 (D), IFN- $\gamma$  (E) (pg/mL) e Nitrito/Nitrato (F) ( $\mu$ M) de ratos tratados com fluoxetina ou veículo ig e LPS ou veículo iv. Amostras dos grupos SAL+SAL e FLX+SAL foram obtidas 6 horas após administração do LPS. Para a análise estatística foi utilizado o teste o teste ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey ou o teste de Kruskal-Wallis. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão (DP). \* $p < 0,05$ . 4-12 animais por grupo. Nd: níveis não detectáveis.

Durante o desafio imune, o controle da inflamação pode ocorrer por meio de uma via neuroimune denominada reflexo anti-inflamatório, mecanismo relatado como importante resposta endógena moduladora frente à inflamação sistêmica (MARTELLI et al., 2014; TRACEY, 2009). Esta via representa o meio pelo qual a atividade neuronal é capaz de modular a resposta imune, atuando por meio de conexões eferentes do encéfalo às vísceras, especialmente ao baço, reduzindo desta forma a produção de citocinas inflamatórias. Além disso, Mota et al. (2019) demonstraram a capacidade da serotonina de ativar uma via simpática do reflexo inflamatório na inflamação periférica.

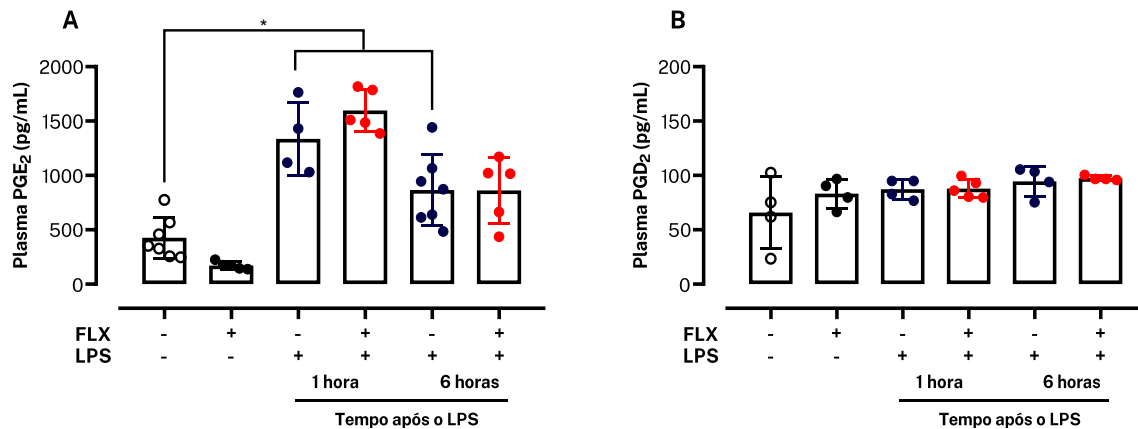
Com o objetivo de avaliar o papel deste órgão sobre a produção dos mediadores inflamatórios TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e NO (Figura 6), a concentração esplênica destas citocinas foram analisadas 1 e 6 horas após a administração de LPS. Houve um aumento na concentração de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 em 1 hora e de IL-10 e NO em 6 horas nos animais submetidos à endotoxemia (SAL+LPS), quando comparados ao grupo controle (SAL+SAL). Não foi observada diferença entre os grupos endotoxêmicos (SAL+LPS e FLX+LPS) em 1 hora, porém a concentração de IL-10 e NO foi reduzida no grupo endotoxêmico pré-tratado (FLX+LPS) em 6 horas, quando comparados ao controle (SAL+LPS).



**Figura 6.** Níveis esplênicos de TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-6 (C), IL-10 (D) (pg/mL) e Nitrato/Nitrito (E) ( $\mu$ M) de ratos tratados com fluoxetina ou veículo ig e LPS ou veículo iv. Amostras dos grupos SAL+SALe FLX+SAL foram obtidas 6 horas após administração do LPS. Para a análise estatística foi utilizado o teste o teste ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey ou o teste de Kruskal-Wallis. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão (DP). \*P < 0,05. 4-11 animais por grupo. Nd: níveis não detectáveis.

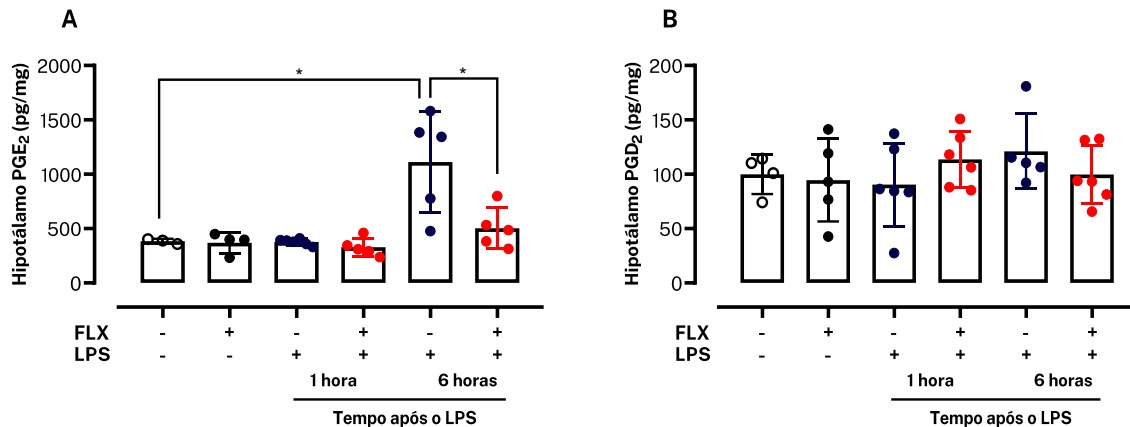
#### 4.4. O pré-tratamento com fluoxetina afetou a produção hipotalâmica de PGE<sub>2</sub>.

A PGE<sub>2</sub> plasmática aumentou nos grupos submetidos ao modelo de inflamação (SAL+LPS) quando comparados ao grupo controle (SAL+SAL) em ambos os períodos avaliados (Figura 7A), enquanto não houve diferença entre os grupos na avaliação da concentração de PGD<sub>2</sub> plasmática (Figura 7B), resultado também observado na PGD<sub>2</sub> hipotalâmica (Figura 8B).



**Figura 7.** Níveis plasmáticos de PGE<sub>2</sub> (pg/mL) (A) e PGD<sub>2</sub> (pg/mL) (B) de ratos tratados com fluoxetina ou veículo iv e LPS ou veículo iv. Amostras dos grupos SAL+SAL e FLX+SAL foram obtidas 6 horas após administração do LPS. Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão (DP). \*P < 0,05. 4-8 animais por grupo.

Já a concentração de PGE<sub>2</sub> foi acentuada no hipotálamo no grupo endotxêmico pré-tratado com veículo (SAL+LPS) em 6 horas, quando comparado com o grupo controle (SAL+SAL), resposta revertida pelo pré-tratamento com fluoxetina, como demonstrado pelo grupo FLX+LPS em 6 horas (Figura 8A).

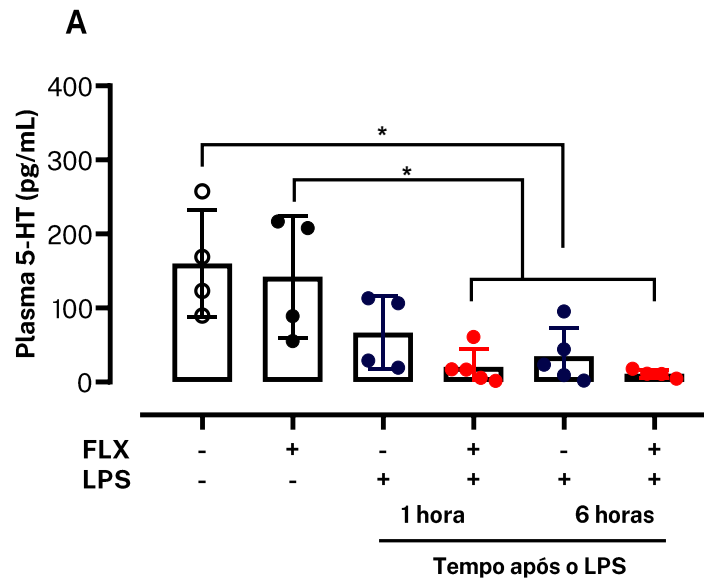


**Figura 8.** Níveis hipotalâmicos de PGE<sub>2</sub> (pg/mL) (A) e PGD<sub>2</sub> (pg/mL) (B) de ratos tratados com fluoxetina ou veículo ig e LPS ou veículo iv. Amostras dos grupos SAL+SAL e FLX+SAL foram obtidas 6 horas após administração do LPS. Para a análise estatística foi utilizado o teste o teste ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. As barras representam a média ± desvio padrão (DP). \*P < 0,05. 4-8 animais por grupo.

#### 4.5. A concentração de serotonina plasmática foi reduzida nos animais pré-tratados com fluoxetina e submetidos à endotoxemia.

A serotonina (5-HT) é um neurotransmissor produzido majoritariamente por células enterocromafins, neurônios serotoninérgicos intestinais e células imune a partir do aminoácido triptofano, sendo apenas cerca de 5% produzida por neurônios do sistema nervoso central, especialmente nos núcleos da rafe (MOTA et al., 2020). Para investigar se a ação da fluoxetina sobre os mecanismos termorregulatórios e inflamatórios está relacionada às concentrações de 5-HT, esse parâmetro foi dosado no plasma (Figura 9).





**Figura 9.** Níveis plasmáticos de 5-HT (pg/ml) de ratos tratados com fluoxetina ou veículo ig e LPS ou veículo iv. Amostras dos grupos SAL+SAL e FLX+SAL foram obtidas 6 horas após administração do LPS. Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão (DP). \* $P < 0,05$ . 2-5 animais por grupo.

A concentração plasmática de 5-HT foi reduzida no grupo endotoxêmico pré-tratado com veículo (SAL+LPS) em 6 horas, quando comparado com o grupo controle (SAL+SAL) e no grupo pré-tratado com fluoxetina (FLX+LPS) em 1 e 6 horas, quando comparado com o seu controle (FLX+SAL).

## 5. DISCUSSÃO

Este estudo é o primeiro a demonstrar que a fluoxetina administrada por gavagem é capaz de reduzir a intensidade da inflamação sistêmica induzida por LPS, por meio da atenuação da produção de citocinas inflamatórias (Figura 1), resultando em redução da hipotermia. Além disso, a FLX associada à endotoxemia elevou a Tb a valores superiores ao estado de eutermia e foi capaz de modular a liberação de mediadores pró-inflamatórios periféricos. Possivelmente, estas alterações se deram pela ativação de uma resposta anti-inflamatória endógena como, por exemplo, o reflexo inflamatório (TRACEY, 2009), uma vez que observamos uma redução de mediadores inflamatórios no baço de animais administrados com FLX durante a endotoxemia (Figura 6). O ISRS isolado não teve efeito sobre os mediadores inflamatórios ou à Tb, quando comparado ao grupo tratado com veículo, demonstrando uma ação específica da droga diante da endotoxemia e não durante a manutenção da eutermia.

O reflexo inflamatório tem sido caracterizado como um importante mecanismo de regulação da resposta imune, consolidando a hipótese de que o SNC modula o sistema imune por meio de aferências neurais para as vísceras, principalmente o baço, reduzindo assim a produção de citocinas inflamatórias (MARTELLI et al., 2014; TRACEY, 2009). A via aferente do reflexo inflamatório consiste em terminais viscerais vagais que são sensibilizados por citocinas circulantes (KOMEAGAE et al., 2018) que se projetam principalmente para o núcleo do trato solitário (NTS) (BERTHOUD; NEUHUBER, 2000), seguindo para outras regiões do tronco cerebral e do prosencéfalo (CHAVAN; TRACEY, 2017) e ativando uma resposta simpática geral (TKACS; STRACK, 1995), incluindo uma liberação aumentada de noradrenalina na região anteroventral da área pré-óptica do hipotálamo (AVPO) durante a hipotensão induzida por LPS (VILLANUEVA et al., 2009). Estudos anteriores documentaram que as projeções noradrenérgicas do NTS para a AVPO estão relacionadas à febre (FELEDER; PERLIK; BLATTEIS, 2007) e à hipotensão precoce (YILMAZ et al., 2008) observada na inflamação sistêmica. O aumento da resposta simpática também aumenta a atividade dos nervos esplênicos (MACNEIL et al., 1997) que inervam o baço que participa do reflexo inflamatório. Hoover et al. (2017) demonstraram que, em pacientes que morreram de sepse, há uma perda de nervos noradrenérgicos no baço, eventualmente sugerindo que essa perda nervosa prejudica a neuroimunomodulação.

Os dados apresentados podem indicar a modulação do reflexo anti-inflamatório esplênico pela FLX, uma vez que sua administração reduziu a produção de citocinas plasmáticas e a

produção de IL-10 e NO no baço. Foi observada uma especificidade intrigante deste ISRS em reduzir os níveis de IL-10 no baço, mas não de IL-1 $\beta$  e IL-6. É provável que esta resposta específica seja finamente regulada, recrutando vias de sinalização esplênicas específicas que não incluem IL-1 $\beta$  e IL-6. Além disso, foi demonstrada uma redução nos níveis plasmáticos de 5-HT durante a inflamação sistêmica, indo ao encontro de achados anteriores deste grupo de pesquisa que mostraram a redução nos níveis de 5-HT em modelo de inflamação de baixo grau (MOTA et al., 2020). Curiosamente, foi demonstrado que a inflamação no encéfalo ou na periferia altera a disponibilidade de triptofano para a síntese de 5-HT (CAPURON et al., 2002), que é a fonte para a produção endógena de 5-HT (RICHARD et al., 2009). Contudo, não nos surpreende que o uso da FLX não tenha restaurado os níveis plasmáticos de 5-HT, pois acredita-se que os ISRS afetem a disponibilidade de 5-HT majoritariamente na fenda sináptica.

Outra possibilidade é que a FLX interfira diretamente nas ações de células imune, uma vez que a maioria possui receptores 5-HT ou o transportador de 5-HT SERT, como macrófagos e monócitos (HERR; BODE; DUERSCHMIED, 2017). A FLX também pode inibir diretamente a síntese de TNF- $\alpha$  por monócitos (ROUMESTAN et al., 2007), além de diminuir a capacidade dos macrófagos de produzir IL-6 e IL-1 $\beta$  e de induzir a produção de IL-17 e IFN- $\gamma$  por células T CD4+ (MELNIKOV et al., 2023; TAKENAKA et al., 2022). O tratamento com FLX também demonstrou diminuir os níveis de TLR4 na microglia de roedores (MOJIRI-FORUSHANI et al., 2023; YAO et al., 2023) atenuando assim a ativação da via NF- $\kappa$ B e, conseqüentemente, o aumento na produção de citocinas inflamatórias, inclusive por células imunes inatas (TROJAN et al., 2019; ZHANG et al., 2020). Em modelos de depressão causada por neuroinflamação em roedores, a FLX foi capaz de suprimir marcadores de ativação da microglia em várias regiões do cérebro (GHOSH et al., 2020; LIU et al., 2017a). Por esse motivo, é provável que o efeito anti-inflamatório da FLX seja multifacetado, afetando mais de uma via de sinalização e resultando na diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias.

Uma vez que a produção de NO é modulada por citocinas, especulamos que a diminuição da produção de NO observada quando o ISRS foi administrado resultou da diminuição das citocinas plasmáticas nesses animais. Além disso, essas citocinas são conhecidas por estimular a produção de PGE na AVPO (SAPER; ROMANOVSKY; SCAMMELL, 2012). Milton e Wendlandt (1971) foram os primeiros a relatar que a administração central de PGE<sub>2</sub> provoca uma resposta febril rápida. Até o momento, a PGE<sub>2</sub> é reconhecida como um modulador chave envolvido

nas respostas fisiopatológicas mediadas pelo cérebro durante SI (SAPER; ROMANOVSKY; SCAMMELL, 2012). Conciliando os dados disponíveis com os presentes resultados (Figuras 6, 7 e 8), supomos que a produção reduzida de NO causada pelo ISRS relaciona-se a uma inibição da hipotensão e supostamente a um mecanismo relacionado à redução do calor dissipado, que também pode ter apresentado efeitos para aumentar a Tb.

Em modelo animal de inflamação sistêmica induzida por LPS, sabe-se que as respostas termorregulatórias dependem da temperatura ambiente ( $T_a$ ) e da dose de LPS. Em  $T_a$  subneutra, o LPS intravenoso provoca hipotermia profunda quando administrado em doses altas (RUDAYA et al., 2005), recrutando efetores autonômicos e comportamentais controlados por uma combinação de sinais periféricos e centrais (ROMANOVSKY; SZÉKELY, 1998). Para estudar as respostas termoeletoras autonômicas que determinam o desenvolvimento da hipotermia, foram avaliadas as concentrações de  $VO_2$  e expressão de UCP-1 no TAM, juntamente com medidas indiretas de termogênese sem tremor, e o tônus vasomotor cutâneo, medido indiretamente pelo Índice de Perda de Calor (HLI).

A princípio, a redução da resposta hipotérmica ao LPS no grupo pré-tratado pode ser atribuída à inibição da sinalização inflamatória criogênica, que pode envolver a  $PGD_2$  e uma maior responsividade hipotalâmica (KLUGER, 1991). No entanto, observamos que os níveis de  $PGD_2$  neste tecido não foram afetados pela 5-HT central. Mais estudos são necessários para investigar um possível aumento da responsividade hipotalâmica ao  $PGD_2$ , além da análise desse mediador em diferentes períodos após a administração de LPS. Não obstante, os dados apresentados indicam um potencial efeito benéfico da fluoxetina sobre o desenvolvimento da hipotermia em casos graves de inflamação sistêmica aguda (Figura 1).

Embora a hipotermia em casos graves de inflamação sistêmica seja há muito considerada uma falha imunológica prejudicial, devido a sua associação com o aumento da mortalidade (CLEMMER et al., 1992; Kushimoto et al., 2013), diferentes modelos de inflamação demonstraram que a hipotermia pode resultar na redução de danos aos órgãos e menores taxas de mortalidade, às vezes independentemente da capacidade do hospedeiro de combater ou tolerar a infecção (LI et al., 2015; LIU et al., 2012; ROMANOVSKY; SZÉKELY, 1998). Dessa forma, a hipótese de que o desenvolvimento de hipotermia, na realidade, representa uma estratégia adaptativa para combater infecções tem sido repetidamente validada.

O HLI resultante da termografia da cauda,  $T_b$  e  $T_a$  (Figura 1E) revelou intensa atividade vasomotora cutânea, indicando um desenvolvimento controlado de temperaturas hipotérmicas durante a endotoxemia, resposta autonômica que a FLX foi capaz de atenuar. No entanto, a influência da FLX no desenvolvimento da hipotermia poderia ser potencialmente benéfica, uma vez que a FLX não recuperou imediatamente a eutermia e não há dados sobre a magnitude da hipotermia capaz de reduzir as taxas de mortalidade.

De fato, o pré-tratamento com a fluoxetina fez a  $T_b$  dos animais pré-tratados com a droga e submetidos à endotoxemia evoluir para temperaturas corporais que caracterizam um estado febril. Esta observação não é corroborada pelos picos de citocinas plasmáticas induzidas por LPS (Figuras 2 e 3) ou pelos níveis de  $PGE_2$  no hipotálamo em 6 horas (Figuras 7 e 8). Este resultado difere de estudos que mostram que a 5-HT reduz a febre induzida por LPS (MOTA et al., 2017). Atribuímos essa diferença às diferentes doses de LPS utilizadas nos estudos, que produzem diferentes respostas termorregulatórias (RUDAYA et al., 2005) e pelo perfil de  $T_b$  desenvolvida no período experimental, uma vez que a hipotermia observada em cerca de 1 hora após a administração do LPS pode apresentar consequências na produção de mediadores inflamatórios não apenas no momento, mas também nas horas seguintes, durante as quais o organismo tenta recuperar a eutermia. Além disso, existem mediadores independentes de  $PGE_2$  que podem estar envolvidos nos efeitos observados na  $T_b$ , como a endotelina-1 e o quimioatraente de neutrófilos induzido por citocinas (CINC)-1, que estão envolvidos na resposta de febre não mediada por citocinas, e a própria IL-1 $\beta$  (MOTA; MADDEN, 2022). Estes podem estar envolvidos no aumento da febre observado em ratos tratados com 5-HT durante a inflamação.

A FLX, assim como outros ISRS, são comumente empregados para o tratamento de distúrbios como depressão e ansiedade. Embora o seu principal modo de ação seja no sistema nervoso central, existem algumas evidências que sugerem que a FLX pode ter efeitos imunomoduladores, agindo diretamente nas células imunes (ÖNAL; YETKIN; AYAZ, 2023). Portanto, está claro que a comunicação entre os ISRS e o sistema imunológico é complexa e não totalmente compreendida. Os pacientes que utilizam FLX podem responder de forma diferente à inflamação sistêmica, uma vez que estudos sugerem que a FLX e outros ISRS podem ter propriedades anti-inflamatórias (COSTA; SANTOS; BRANCO, 2020). No entanto, os mecanismos exatos envolvidos não estão bem estabelecidos. Este conhecimento é vital para a sua utilização eficaz e segura.

## **6. CONCLUSÃO**

Estudos anteriores (MOTA et al., 2017, 2019) forneceram evidências de que a produção endógena de 5-HT diminui no curso da inflamação sistêmica e esta diminuição da produção de 5-HT potencializa a inflamação sistêmica e a hipotermia. Somamos agora a esse cenário, trazendo evidências que indicam que o uso da FLX é capaz de atenuar a hipotermia e potencializar a febre induzida pelo LPS, além de modular os parâmetros pró-inflamatórios sistêmicos. Portanto, este ISRS parece ser capaz de reduzir a inflamação sistêmica, possivelmente recrutando a via anti-inflamatória esplênica e agindo sobre diferentes células do sistema imunológico, resultando em hipotermia atenuadas durante a infamação.

## 7. REFERÊNCIAS

- ARONS, M. M. et al. Effects of ibuprofen on the physiology and survival of hypothermic sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 27, n. 4, p. 699–707, abr. 1999.
- BERTHOUD, H.-R.; NEUHUBER, W. L. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. **Autonomic Neuroscience**, v. 85, n. 1–3, p. 1–17, dez. 2000.
- BHAT, R. et al. Amelioration of ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis with fluoxetine. **Journal of Neuroimmunology**, v. 313, p. 77–81, dez. 2017.
- BLATTEIS, C. M. The onset of fever: new insights into its mechanism. In: [s.l: s.n.]. p. 3–14.
- BLESSING, W. . 5-hydroxytryptamine 1a receptor activation reduces cutaneous vasoconstriction and fever associated with the acute inflammatory response in rabbits. **Neuroscience**, v. 123, n. 1, p. 1–4, jan. 2004.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais**. Brasília: [s.n.].
- BROWN, J. W. et al. Activation of 5-HT 1A receptors in medullary raphé disrupts sleep and decreases shivering during cooling in the conscious piglet. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 3, p. R884–R894, mar. 2008.
- BYMASTER, F. P. et al. Fluoxetine, but not other selective serotonin uptake inhibitors, increases norepinephrine and dopamine extracellular levels in prefrontal cortex. **Psychopharmacology**, v. 160, n. 4, p. 353–361, 29 abr. 2002.
- CAKIR, A. et al. Examination of antimicrobial effect of fluoxetine in experimental sepsis model: An in vivo study. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 37, n. 1, 10 jan. 2023.
- CAPURON, L. et al. Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. **Molecular Psychiatry**, v. 7, n. 5, p. 468–473, 1 jun. 2002.
- CHAVAN, S. S.; TRACEY, K. J. Essential Neuroscience in Immunology. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 9, p. 3389–3397, 1 maio 2017.
- CLEMMER, T. P. et al. Hypothermia in the sepsis syndrome and clinical outcome. **Critical Care Medicine**, v. 20, n. 10, p. 1395–1401, out. 1992.
- CORRIGAN, J. J. et al. Hypometabolism and hypothermia in the rat model of endotoxic shock: independence of circulatory hypoxia. **The Journal of Physiology**, v. 592, n. 17, p. 3901–3916, set. 2014.
- COSTA, L. H. A.; SANTOS, B. M.; BRANCO, L. G. S. Can selective serotonin reuptake inhibitors have a neuroprotective effect during COVID-19? **European Journal of Pharmacology**, v. 889, p. 173629, dez. 2020.
- CREEDEN, J. F. et al. Fluoxetine as an anti-inflammatory therapy in SARS-CoV-2 infection. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 138, p. 111437, jun. 2021.

DREWRY, A. M. et al. **The Presence of Hypothermia Within 24 Hours of Sepsis Diagnosis Predicts Persistent Lymphopenia** *Critical Care Medicine*, 2015.

DUERSCHMIED, D. et al. Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood*, v. 121, n. 6, p. 1008–1015, 7 fev. 2013.

EVANS, S. S.; REPASKY, E. A.; FISHER, D. T. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nature Reviews Immunology*, v. 15, n. 6, p. 335–349, jun. 2015.

FARAJ, S. S.; JALAL, P. J. IL1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  cytokines cooperate to modulate a complicated medical condition among COVID-19 patients: case-control study. *Annals of Medicine & Surgery*, v. 85, n. 6, p. 2291–2297, jun. 2023.

FELEDER, C.; PERLIK, V.; BLATTEIS, C. M. Preoptic norepinephrine mediates the febrile response of guinea pigs to lipopolysaccharide. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 293, n. 3, p. R1135–R1143, set. 2007.

FONSECA, M. T. et al. Spontaneous hypothermia in human sepsis is a transient, self-limiting, and nonterminal response. *Journal of Applied Physiology*, v. 120, n. 12, p. 1394–1401, 2016.

FORSTERMANN, U.; HELDT, R.; HERTTING, G. Effects of intracerebroventricular administration of prostaglandin D2 on behaviour, blood pressure and body temperature as compared to prostaglandins E2 and F2? *Psychopharmacology*, v. 80, n. 4, p. 365–370, jul. 1983.

FURMAN, D. et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature Medicine*, v. 25, n. 12, p. 1822–1832, 5 dez. 2019.

GANESHAN, K. et al. **Energetic Trade-Offs and Hypometabolic States Promote Disease Tolerance** *Cell*, 2019.

GARAMI, A.; STEINER, A. A.; ROMANOVSKY, A. A. **Fever and hypothermia in systemic inflammation** *Handbook of Clinical Neurology*, 2018.

GARGAGLIONI, L. H.; STEINER, A. A.; BRANCO, L. G. S. Involvement of serotonergic receptors in the anteroventral preoptic region on hypoxia-induced hypothermia. *Brain Research*, v. 1044, n. 1, p. 16–24, maio 2005.

GHOSH, S. et al. Inflammation-induced behavioral changes is driven by alterations in Nrf2-dependent apoptosis and autophagy in mouse hippocampus: Role of fluoxetine. *Cellular Signalling*, v. 68, p. 109521, abr. 2020.

GIUSTI-PAIVA, A. et al. Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced release of vasopressin in rats. *Neuroscience Letters*, v. 346, n. 1–2, p. 21–24, jul. 2003.

HERR, N. et al. Acute Fluoxetine Treatment Induces Slow Rolling of Leukocytes on Endothelium in Mice. *PLoS ONE*, v. 9, n. 2, p. e88316, 10 fev. 2014.

HERR, N.; BODE, C.; DUERSCHMIED, D. The Effects of Serotonin in Immune Cells. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, v. 4, 20 jul. 2017.

HOOVER, D. B. et al. Loss of Sympathetic Nerves in Spleens from Patients with End Stage



Sepsis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 6 dez. 2017.

HRDINA, P. D.; VU, T. B. Chronic fluoxetine treatment upregulates 5-HT uptake sites and 5-HT<sub>2</sub> receptors in rat brain: An autoradiographic study. **Synapse**, v. 14, n. 4, p. 324–331, ago. 1993.

HYTTEL, J. Pharmacological characterization of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). **International Clinical Psychopharmacology**, v. 9, p. 19–26, mar. 1994.

INUI, A. Cytokines and sickness behavior: implications from knockout animal models. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 9, p. 469–473, set. 2001.

IVANOV, A. I.; ROMANOVSKY, A. A. Prostaglandin E<sub>2</sub> as a mediator of fever: synthesis and catabolism. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 9, p. 1977–93, maio 2004.

JIANG, Q. et al. **Febrile core temperature is essential for optimal host defense in bacterial peritonitis**. **Infection and Immunity**, 2000.

KAKIZAKI, Y. et al. Temporal Profiles of Interleukin-1.BETA., Interleukin-6, and Tumor Necrosis Factor-.ALPHA. in the Plasma and Hypothalamic Paraventricular Nucleus after Intravenous or Intraperitoneal Administration of Lipopolysaccharide in the Rat. Estimation by Push-Pull. **Endocrine Journal**, v. 46, n. 4, p. 487–496, 1999.

KLUGER, M. J. Fever: Role of Pyrogens and Cryogens. **Physiological Reviews**, v. 71, n. 1, p. 93–127, 1 jan. 1991.

KLUGER, M. J. et al. Role of Fever in Disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 856, n. 1 MOLECULAR MEC, p. 224–233, set. 1998.

KOMEGAE, E. N. et al. Vagal afferent activation suppresses systemic inflammation via the splanchnic anti-inflammatory pathway. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 73, p. 441–449, out. 2018.

KRALL, C. M. et al. Food deprivation alters thermoregulatory responses to lipopolysaccharide by enhancing cryogenic inflammatory signaling via prostaglandin D<sub>2</sub>. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 298, n. 6, p. R1512–R1521, abr. 2010.

KUSHIMOTO, S. et al. The impact of body temperature abnormalities on the disease severity and outcome in patients with severe sepsis: an analysis from a multicenter, prospective survey of severe sepsis. **Critical Care**, v. 17, n. 6, p. R271, 2013.

LE POUL, E. et al. Differential adaptation of brain 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors and 5-HT transporter in rats treated chronically with fluoxetine. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 1, p. 110–122, jan. 2000.

LEE, D.-H. et al. Pharmacological Treatment for Neuroinflammation in Stress-Related Disorder. **Biomedicines**, v. 10, n. 10, p. 2518, 9 out. 2022.

LEON, LISA, R. Hypothermia in systemic inflammation: role of cytokines. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, n. 1–3, p. 1877, 2004.

LI, X. et al. Accompanying mild hypothermia significantly improved the prognosis of septic

- mice than artificial mild hypothermia. **The American Journal of Emergency Medicine**, v. 33, n. 11, p. 1651–1658, nov. 2015.
- LIU, E. et al. **Naturally occurring hypothermia is more advantageous than fever in severe forms of lipopolysaccharide- and Escherichia coli-induced systemic inflammation** **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, 2012.
- LIU, T. et al. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, n. 1, p. 17023, 14 jul. 2017a.
- LIU, Y.-M. et al. Ferulic acid inhibits neuro-inflammation in mice exposed to chronic unpredictable mild stress. **International Immunopharmacology**, v. 45, p. 128–134, abr. 2017b.
- MACNEIL, B. J. et al. Peripheral endotoxin increases splenic sympathetic nerve activity via central prostaglandin synthesis. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 273, n. 2, p. R609–R614, 1 ago. 1997.
- MARTELLI, D. et al. Reflex control of inflammation by sympathetic nerves, not the vagus. **The Journal of Physiology**, v. 592, n. 7, p. 1677–1686, 1 abr. 2014.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 24 jul. 2008.
- MEDZHITOV, R. The spectrum of inflammatory responses. **Science**, v. 374, n. 6571, p. 1070–1075, 26 nov. 2021.
- MEDZHITOV, R.; SCHNEIDER, D. S.; SOARES, M. P. Disease Tolerance as a Defense Strategy. **Science**, v. 335, n. 6071, p. 936–941, fev. 2012.
- MELNIKOV, M. V. et al. The influence of fluoxetine on neuroimmune interaction in multiple sclerosis. **Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova**, v. 123, n. 7, p. 65, 2023.
- MILTON, A. S.; WENDLANDT, S. Effects on body temperature of prostaglandins of the A, E and F series on injection into the third ventricle of unanaesthetized cats and rabbits. **The Journal of Physiology**, v. 218, n. 2, p. 325–336, 1 out. 1971.
- MOJIRI-FORUSHANI, H. et al. Inhibitory effects of fluoxetine on the secretion of inflammatory mediators and JAK/STAT3 and JNK/TLR4 gene expression. **Molecular Biology Reports**, v. 50, n. 3, p. 2231–2241, 26 mar. 2023.
- MOTA, C. M. D. et al. Central serotonin attenuates LPS-induced systemic inflammation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 66, p. 372–381, nov. 2017.
- MOTA, C. M. D. et al. Central serotonin prevents hypotension and hypothermia and reduces plasma and spleen cytokine levels during systemic inflammation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 80, p. 255–265, ago. 2019.
- MOTA, C. M. D. et al. Systemic serotonin inhibits brown adipose tissue sympathetic nerve activity via a GABA input to the dorsomedial hypothalamus, not via 5HT 1A receptor activation in raphe pallidus. **Acta Physiologica**, v. 228, n. 3, mar. 2020.
- MOTA, C. M. D.; MADDEN, C. J. Neural circuits mediating circulating interleukin-1 $\beta$ -evoked fever in the absence of prostaglandin E2 production. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 103, p.

109–121, jul. 2022.

NAUMENKO, V. S.; KONDAUROVA, E. M.; POPOVA, N. K. On the role of brain 5-HT<sub>7</sub> receptor in the mechanism of hypothermia: Comparison with hypothermia mediated via 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptor. **Neuropharmacology**, v. 61, n. 8, p. 1360–1365, dez. 2011.

OBERHOLZER, A.; OBERHOLZER, C.; MOLDAWER, L. L. Interleukin-10: A complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. **Critical care medicine**, v. 30, n. 1 Supp, p. S58–S63, jan. 2002.

ÖNAL, H. T.; YETKIN, D.; AYAZ, F. Immunostimulatory activity of fluoxetine in macrophages via regulation of the PI3K and P38 signaling pathways. **Immunologic Research**, v. 71, n. 3, p. 413–421, 13 jun. 2023.

PATEL, S. Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs): the Derivatives and Triggers of Inflammation. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 18, n. 11, p. 63, 28 nov. 2018.

PERES BOTA, D. et al. Body temperature alterations in the critically ill. **Intensive Care Medicine**, v. 30, n. 5, p. 811–816, 1 maio 2004.

PEREZ-CABALLERO, L. et al. Fluoxetine: A case history of its discovery and preclinical development. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 9, n. 5, p. 567–578, 2014.

RICHARD, D. M. et al. L -Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications. **International Journal of Tryptophan Research**, v. 2, p. IJTR.S2129, 23 jan. 2009.

ROMANOVSKY, A. A.; IVANOV, A. I.; SHIMANSKY, Y. P. Selected Contribution: Ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 6, p. 2667–2679, jun. 2002a.

ROMANOVSKY, A. A.; IVANOV, A. I.; SHIMANSKY, Y. P. Selected Contribution: Ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 6, p. 2667–2679, 1 jun. 2002b.

ROMANOVSKY, A. A.; SZÉKELY, M. Fever and hypothermia: two adaptive thermoregulatory responses to systemic inflammation. **Medical hypotheses**, v. 50, n. 3, p. 219–226, 1998.

ROUMESTAN, C. et al. Anti-inflammatory properties of desipramine and fluoxetine. **Respiratory Research**, v. 8, n. 1, p. 35, 3 dez. 2007.

RUDAYA, A. Y. et al. Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 289, n. 5, p. R1244–R1252, nov. 2005.

SAPER, C. B.; ROMANOVSKY, A. A.; SCAMMELL, T. E. Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 8, p. 1088–1095, 26 ago. 2012.

SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 801, 23 fev. 2016.

- SLAVICH, G. M. Understanding inflammation, its regulation, and relevance for health: A top scientific and public priority. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 45, p. 13–14, mar. 2015.
- STEINER, A. A. et al. Cyclooxygenase-1 or -2—which one mediates lipopolysaccharide-induced hypothermia? **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 297, n. 2, p. R485–R494, ago. 2009.
- STEINER, A. A.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; BRANCO, L. G. . Role of preoptic second messenger systems (cAMP and cGMP) in the febrile response. **Brain Research**, v. 944, n. 1–2, p. 135–145, jul. 2002.
- STEINER, A. A.; ROMANOVSKY, A. A. Energy Trade-offs in Host Defense: Immunology Meets Physiology. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 30, n. 12, p. 875–878, dez. 2019.
- TAKENAKA, Y. et al. Profiling Differential Effects of 5 Selective Serotonin Reuptake Inhibitors on TLRs-Dependent and -Independent IL-6 Production in Immune Cells Identifies Fluoxetine as Preferred Anti-Inflammatory Drug Candidate. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 22 jun. 2022.
- TKACS, N. .; STRACK, A. . Systemic endotoxin induces Fos-like immunoreactivity in rat spinal sympathetic regions. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 51, n. 1, p. 1–7, jan. 1995.
- TRACEY, K. J. Reflex control of immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 6, p. 418–428, jun. 2009.
- TROJAN, E. et al. Role of Chronic Administration of Antidepressant Drugs in the Prenatal Stress-Evoked Inflammatory Response in the Brain of Adult Offspring Rats: Involvement of the NLRP3 Inflammasome-Related Pathway. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 8, p. 5365–5380, 4 ago. 2019.
- UENO, R. et al. Role of prostaglandin D2 in the hypothermia of rats caused by bacterial lipopolysaccharide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 19, p. 6093–7, out. 1982.
- VIDA, G. et al.  $\beta$ 2-Adrenoreceptors of regulatory lymphocytes are essential for vagal neuromodulation of the innate immune system. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 12, p. 4476–4485, 12 dez. 2011.
- VILLANUEVA, A. et al. CENTRAL CANNABINOID 1 RECEPTOR ANTAGONIST ADMINISTRATION PREVENTS ENDOTOXIC HYPOTENSION AFFECTING NOREPINEPHRINE RELEASE IN THE PREOPTIC ANTERIOR HYPOTHALAMIC AREA. **Shock**, v. 32, n. 6, p. 614–620, dez. 2009.
- WYNN, T. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **The Journal of Pathology**, v. 214, n. 2, p. 199–210, 27 jan. 2008.
- YAO, Y. et al. Fluoxetine alleviates postoperative cognitive dysfunction by attenuating TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway activation in aged mice. **Inflammation Research**, v. 72, n. 6, p. 1161–1173, 15 jun. 2023.

YILMAZ, M. S. et al. Lipopolysaccharide-induced hypotension is mediated by a neural pathway involving the vagus nerve, the nucleus tractus solitarius and alpha-adrenergic receptors in the preoptic anterior hypothalamic area. **Journal of Neuroimmunology**, v. 203, n. 1, p. 39–49, out. 2008.

YOSHIDA, N. et al. Interleukin-6, tumour necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  in patients with renal cell carcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 86, n. 9, p. 1396–1400, 7 maio 2002.

ZHANG, X. et al. Brain control of humoral immune responses amenable to behavioural modulation. **Nature**, v. 581, n. 7807, p. 204–208, 14 maio 2020.

ZHENG, Z.-H. et al. Neuroinflammation induces anxiety- and depressive-like behavior by modulating neuronal plasticity in the basolateral amygdala. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 91, p. 505–518, jan. 2021.