



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Caroline Motta Moreira

**ENVOLVIMENTO DA SEROTONINA NA HIPOTENSÃO DE RATOS  
ENDOTOXÊMICOS**

Florianópolis  
2019

Caroline Motta Moreira

**ENVOLVIMENTO DA SEROTONINA NA HIPOTENSÃO DE RATOS  
ENDOTOXÊMICOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

**Orientadora:** Profa. Dra. Áurea Elizabeth Linder

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Moreira, Caroline

Envolvimento da serotonina na hipotensão de ratos  
endotoxêmicos / Caroline Moreira ; orientadora, Áurea  
Elizabeth Linder, 2019.

86 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Serotonina. 3. Hipotensão. 4.  
Endotoxemia. 5. Fluoxetina. I. Linder, Áurea Elizabeth.  
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia. III. Título.

Caroline Motta Moreira

**Envolvimento da serotonina na hipotensão de ratos endotoxêmicos**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Áurea Elizabet Linder

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Renata Maria Lataro

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Jamil Assereuy Filho

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em farmacologia.

---

Prof. Dr. Rui Daniel Schroder Prediger

Coordenador do Programa

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Áurea Elizabeth Linder

Orientadora

Florianópolis, 2019.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Eduardo Moreira e Márcia R. B. Motta, por todo amor, incentivo e apoio que me deram durante todo esse percurso. Por toda a preocupação com a minha carreira, sempre dando forças para seguir adiante e não desistir.

Obrigada a toda minha família e amigos que também me apoiaram, por desejarem meu sucesso e pela compreensão nos momentos em que estive ausente.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia, por todos os ensinamentos que contribuíram para minha formação, em especial ao Prof. Dr. Jamil e ao Prof. Dr. José Eduardo por terem cedido materiais e equipamentos necessários para a realização deste trabalho, e também ao Prof. Dr. Daniel Fernandes pela ajuda com a parte estatística do estudo.

Um agradecimento especial à minha querida orientadora, Prof. Dra. Elizabeth Linder, que sempre me incentivou e confiou em mim. Obrigada pela oportunidade de realizar este trabalho, pela paciência, carinho, dedicação e por todo ensinamento passado.

A todos os colegas da pós-graduação que de alguma forma me ajudaram quando eu precisei, em especial aos vizinhos do LabCardio, Marcelo, Junior e Gustavo, sempre dispostos a ajudar.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e agências de fomento.

## RESUMO

Ainda é disputada a participação da serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) no controle da pressão arterial. A 5-HT, quando administrada cronicamente, reduz a pressão arterial de ratos. As plaquetas são o maior estoque periférico de 5-HT, que é liberada durante agregação plaquetária exacerbada, como ocorre, por exemplo, na sepse. A sepse é uma doença grave, sendo uma das principais causas de morte em Unidades de Tratamento Intensivo. Entre os sintomas observados em pacientes com choque séptico está a hipotensão, que geralmente é refratária à administração de agentes vasopressores. A fluoxetina é um antidepressivo vastamente utilizado que aumenta os níveis de 5-HT. Nesse estudo testamos a hipótese de que o tratamento com fluoxetina agrava, enquanto o tratamento com antagonista de receptores da 5-HT atenua a queda da pressão arterial na sepse. Ratos Wistar machos (Protocolo CEUA4181170516) foram tratados com fluoxetina ou veículo, administrados por via oral (creme de avelã) ou por via intraperitoneal (I.P.; tampão fosfato: PBS, do inglês *phosphate buffer solution.*), durante 14 dias antes de receberem lipopolissacarídeo (LPS) para indução da endotoxemia. Parte dos animais não recebeu LPS, mas sim seu veículo (PBS). Após 2h, alguns grupos receberam veículo (PBS; 1mL/Kg, I.P.), enquanto outros receberam ketanserina (5mg/kg, I.P.). Todos os animais foram submetidos a medidas de pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda em diferentes tempos. Alguns animais passaram pelo procedimento de coleta sanguínea por punção cardíaca para contagem celular e medidas bioquímicas. Todos os animais que receberam LPS apresentaram queda na PAS, sendo que aqueles que receberam tratamento prévio crônico com fluoxetina se mantiveram hipotensos por um período de tempo maior. A ketanserina, um antagonista de receptores 5-HT<sub>2A</sub>, atenuou a hipotensão dos ratos endotoxêmicos tratados com veículo, mas piorou a dos ratos tratados cronicamente com fluoxetina. Esses resultados sugerem a contribuição da 5-HT na hipotensão que é observada no choque séptico e expõe novos alvos farmacológicos a serem estudados para melhor elucidação dessa observação.

**Palavras-chave:** Serotonina. 5-HT. Sepse. Endotoxemia. Hipotensão. LPS. Antidepressivo. ISRS. Ketanserina. 5-HT<sub>2A</sub>.

## ABSTRACT

The role of serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) in controlling blood pressure is still disputed. 5-HT, when administered chronically, reduces blood pressure in rats. Platelets are the largest peripheral stock of 5-HT, which is released during exacerbated platelet aggregation, as occurs, for example, in sepsis. Sepsis is a serious disease, being one of the main causes of death in Intensive Care Units. Among the symptoms observed in patients with septic shock is hypotension, which is usually refractory to the administration of vasopressors. Fluoxetine is a widely used antidepressant that increases 5-HT levels. In this study we tested the hypothesis that treatment with fluoxetine aggravates, while treatment with a 5-HT receptor antagonist attenuates the drop in blood pressure in sepsis. Male Wistar rats (Protocol CEUA4181170516) were treated with fluoxetine or vehicle, administered orally (hazelnut cream) or intraperitoneally (I.P.; PBS: phosphate buffer saline) for 14 days before receiving lipopolysaccharide (LPS) for induction of endotoxemia. Part of the animals received no LPS, but their vehicle (PBS). After 2h, some groups received vehicle (PBS, 1mL/Kg, I.P.), while others received ketanserin (5mg / kg, I.P.). All animals were submitted to measurements of systolic blood pressure (SBP) by tail plethysmography at different times. Some animals underwent cardiac puncture collection for cell counting and biochemical measurements. All animals that received LPS presented a decrease in SBP, and those who received chronic pretreatment with fluoxetine remained hypotensive for a longer period of time. Ketanserin, a 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist, attenuated the hypotension of vehicle-treated endotoxemic rats, but worsened that of rats chronically treated with fluoxetine. These results suggest the contribution of 5-HT to the hypotension that is observed in septic shock and reveal new pharmacological targets to be studied to better elucidate this observation.

**Keywords:** Serotonin. 5-HT. Sepsis. Endotoxemia. Hypotension. LPS. Antidepressant. SSRI. Ketanserin. 5-HT<sub>2A</sub>.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura química da serotonina. ....	15
<b>Figura 2</b> - Estrutura química da ketanserina. ....	22
<b>Figura 3</b> - Estrutura química da fluoxetina. ....	23
<b>Figura 4</b> - Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via oral com veículo e que receberam por via IP veículo e veículo. ....	32
<b>Figura 5</b> - Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via oral com veículo e que receberam por via IP LPS e veículo. ....	33
<b>Figura 6</b> - Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via oral com fluoxetina e que receberam por via IP veículo e veículo. ....	34
<b>Figura 7</b> - Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via oral com fluoxetina e que receberam por via IP LPS e veículo. ....	35
<b>Figura 8</b> - Pressão arterial sistólica de ratos antes e depois do tratamento crônico por via oral com veículo (A) ou fluoxetina (B). ....	36
<b>Figura 9</b> - Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via IP com veículo e que receberam por via IP veículo e veículo. ....	37
<b>Figura 10</b> - Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via IP com veículo e que receberam por via IP LPS e veículo. ....	38
<b>Figura 11</b> - Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via IP com fluoxetina e que receberam por via IP veículo e veículo. ....	39
<b>Figura 12</b> - Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via IP com fluoxetina e que receberam por via IP LPS e veículo. ....	40
<b>Figura 13</b> - Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via IP com veículo e que receberam por via IP veículo e ketanserina. ....	41
<b>Figura 14</b> - Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via IP com veículo e que receberam por via IP LPS e ketanserina. ....	42
<b>Figura 15</b> - Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via IP com fluoxetina e que receberam por via IP veículo e ketanserina. ....	43
<b>Figura 16</b> - Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via IP com fluoxetina e que receberam por via IP LPS e ketanserina. ....	44
<b>Figura 17</b> - Pressão arterial sistólica de ratos antes e depois do tratamento crônico por via intraperitoneal com veículo (A) e fluoxetina (B). ....	45

<b>Figura 18</b> - Dosagens plasmáticas de glicose (A e B), lactato (C e D) e NOx (E e F) após 6 e 24 horas da administração de LPS ou PBS em animais tratados cronicamente com fluoxetina ou PBS. ....	47
<b>Figura 19</b> - Hemograma realizado após 6 e 24 horas da administração de LPS ou PBS em animais tratados cronicamente com fluoxetina ou PBS. ....	49
<b>Figura 20</b> - Pressão arterial sistólica de ratos tratados agudamente por via oral com veículo e que receberam por via IP veículo e veículo. ....	72
<b>Figura 21</b> - Pressão arterial sistólica de ratos tratados agudamente por via oral com veículo e que receberam por via IP LPS e veículo. ....	73
<b>Figura 22</b> - Pressão arterial sistólica de ratos tratados agudamente por via oral com fluoxetina e que receberam por via IP veículo e veículo. ....	74
<b>Figura 23</b> - Pressão arterial sistólica de ratos tratados agudamente por via oral com fluoxetina e que receberam por via IP LPS e veículo. ....	75
<b>Figura 24</b> - Pressão arterial sistólica de ratos tratados agudamente por via IP com veículo e que receberam por via IP veículo e veículo. ....	76
<b>Figura 25</b> - Pressão arterial sistólica de ratos tratados agudamente por via IP com veículo e que receberam por via IP LPS e veículo. ....	77
<b>Figura 26</b> - Pressão arterial sistólica de ratos tratados agudamente por via IP com fluoxetina e que receberam por via IP veículo e veículo. ....	78
<b>Figura 27</b> - Pressão arterial sistólica de ratos tratados agudamente por via IP com fluoxetina e que receberam por via IP LPS e veículo. ....	79
<b>Figura 28</b> - Pressão arterial sistólica de ratos submetidos ao LPS em uso. ....	80
<b>Figura 29</b> - Pressão arterial sistólica de ratos submetidos ao LPS novo. ....	81
<b>Figura 30</b> - Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via IP com veículo e que receberam por via IP veículo e fluoxetina. ....	82
<b>Figura 31</b> - Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via IP com veículo e que receberam por via IP LPS e fluoxetina. ....	83
<b>Figura 32</b> - Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via IP com fluoxetina e que receberam por via IP veículo e fluoxetina. ....	84
<b>Figura 33</b> - Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via IP com fluoxetina e que receberam por via IP LPS e fluoxetina. ....	85

## LISTA DE DIAGRAMAS

<b>Diagrama 1</b> - Linha do tempo para o protocolo experimental de tratamento crônico por via oral. ....	28
<b>Diagrama 2</b> - Linha do tempo para o protocolo experimental de tratamento crônico por via intraperitoneal. ....	29

## **LISTA DE ANEXOS**

<b>Anexo 1 - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais. ....</b>	<b>86</b>
---	-----------

## LISTA DE ABREVEATURAS

5-HIAA – Ácido 5-hidroxiindolacético

5-HT – 5-hidroxitriptamina

ANOVA – Análise de Variância

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CLP – Ligadura e Perfusão do Ceco

DMSO – Dimetil Sulfóxido

EPM – Erro Padrão da Média

EUA – Estados Unidos da América

FDA – do inglês: Food and Drug Administration

I.P. – Intraperitoneal

ISRS – Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina

LPS – Lipopolissacarídeo

MAO – Enzima Monoamina Oxidase

NF- $\kappa$ B – Fator Nuclear kappa beta (do inglês Nuclear Factor-kappa beta)

NO – Óxido Nítrico (do inglês nitric oxide)

NOS – Sintetase do Óxido Nítrico (do inglês nitric oxide synthase)

PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos (do inglês Pathogen-associated Molecular Patterns)

PAS – Pressão Arterial Sistólica

PBS – do inglês Phosphate Buffered Saline

PRRS – Receptores de Reconhecimento Padrão (do inglês Pattern Recognition Receptors)

qSOFA – Escore para acesso rápido de falência sequencial de órgãos (do inglês: quick Sequential Organ Failure Assessment Score)

SERT – Transportador de Serotonina (do inglês Serotonin Transporter)

SIRS – Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (do inglês Systemic Inflammatory Response Syndrome)

SOFA – Escore para acesso de falência sequencial de órgãos (do inglês: Sequential Organ Failure Assessment Score)

TLRs – Receptor do tipo Toll (do inglês Toll-like Receptor)

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês Tumor Necrosis Factor -  $\alpha$ )

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UTI – Unidade de Tratamento Intensivo

V.O. – Via Oral

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1. Serotonina .....	15
1.2. Sepsis .....	17
1.3. Modelos experimentais .....	21
1.4. Drogas que afetam a homeostase da serotonina .....	22
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>26</b>
2.1. Objetivos Específicos .....	26
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
3.1. Animais .....	27
3.2. Drogas e reagentes .....	27
3.3. Protocolos experimentais .....	27
3.3.1. Tratamento crônico por via oral (VO) .....	27
3.3.2. Tratamento crônico por via intraperitoneal .....	28
3.4. Medida de pressão arterial sistólica .....	29
3.5. Dosagens plasmáticas .....	30
3.5.1. Hemograma .....	30
3.5.2. Nitratos e nitritos .....	30
3.5.3. Lactato .....	31
3.5.4. Glicose .....	31
3.6. Análises estatísticas .....	31
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
4.1. Tratamento crônico por via oral (VO) .....	32
4.2. Tratamento crônico por via intraperitoneal (IP) .....	36
4.3. Dosagens plasmáticas .....	45
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>6. FALHAS E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>57</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>59</b>
<b>9. APÊNDICE .....</b>	<b>71</b>
a. Teste com solução de sacarose .....	71
b. Tratamento agudo por via oral (V.O.) .....	71
c. Tratamento agudo por via intraperitoneal (I.P.) .....	75

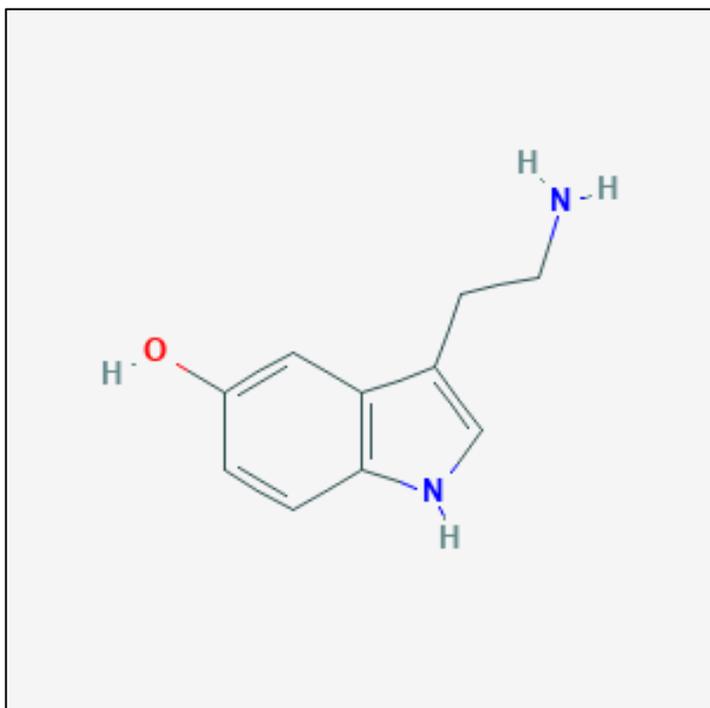
d. Teste do LPS .....	79
e. Tratamento com fluoxetina após LPS .....	81

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Serotonina

A serotonina (5 hidroxitriptamina; 5-HT) é uma monoamina, caracterizada há mais de 60 anos por dois diferentes grupos de pesquisadores, os quais demonstraram que a 5-HT promovia aumento do tônus do músculo liso, sendo descrita então como vasoconstritora (ERSPAMER e ASERO, 1952; RAPPORT, GREEN e PAGE, 1948). Ela é um neurotransmissor, capaz de estimular respostas finais em diversos sistemas do organismo, incluindo o nervoso central, gastrointestinal, respiratório, geniturinário e o sistema imune (RAPPORT, GREEN e PAGE, 1948; AZMITIA, 2001; NICHOLS; NICHOLS, 2008). Sua estrutura química está representada na figura 1, a seguir.

**Figura 1:** Estrutura química da serotonina.



Fonte: National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Serotonin, CID=5202, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5202> (accessed on May 23, 2019)

A síntese de 5-HT ocorre principalmente nas células enterocromafins do intestino através da hidroxilação e descarboxilação do aminoácido L-triptofano (JACOBS e AZMITIA, 1992; KUHN, 1999). A monoamina oxidase (MAO) é a enzima responsável pela degradação de 5-HT, resultando na formação do seu metabólito, o ácido 5- hidroxindolacético (5-HIAA). A MAO é uma enzima intracelular e se apresenta em duas formas: MAO-A e MAO-B, sendo a

5-HT preferencialmente degradada pela MAO-A (WALTHER *et al.*, 2003; NI e WATTS, 2006). Visto que a 5-HT é uma molécula protonada em pH fisiológico, ela não é capaz de atravessar membranas celulares e barreira hematoencefálica. Seu transporte acontece com o auxílio de um transportador, o SERT (do inglês *Serotonin Transporter*) (ERICKSON; EIDEN; HOFFMAN, 1992).

Os efeitos fisiológicos da 5-HT são mediados por sua interação com os receptores, que compreendem sete famílias (5-HT<sub>1</sub> – 5-HT<sub>7</sub>) e pelo menos quinze diferentes subtipos (HOYER *et al.*, 1994). Para o sistema cardiovascular, os receptores de maior interesse, que são responsáveis por modificar o tônus vascular são o 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>7</sub> (LINDER *et al.*, 2010). A maioria dos receptores de 5-HT são acoplados à proteína G, com exceção do 5-HT<sub>3</sub>, ligado a canal iônico (HOYER *et al.*, 1994; BARNES; SHARP, 1999).

Muito se estuda sobre o envolvimento da 5-HT no controle do tônus vascular e da pressão arterial, e algumas divergências são encontradas na literatura, onde alguns estudos relacionam a 5-HT com hipertensão, e outros com a diminuição da pressão arterial. Alguns estudos relatam redução da captação de 5-HT pelas plaquetas e consequente aumento das concentrações plasmáticas de 5-HT em pacientes hipertensos (FETKOVSKA *et al.*, 1990; BRENNER *et al.*, 2007); hiper-reatividade à 5-HT em modelo experimental de hipertensão (WATTS e FINK, 1999); aumento da pressão arterial causado por um aumento nos níveis de 5-HT decorrente da administração intracerebroventricular de um inibidor do SERT (LAZARTIGUES *et al.*, 2000) e alteração na concentração basal de 5-HT com comprometimento na função do SERT em modelos experimentais de hipertensão (NI; LOOKINGLAND; WATTS, 2006). Em contrapartida, Diaz e colaboradores (2008) observaram que a administração crônica de 5-HT foi capaz de reduzir a pressão arterial de ratos normotensos e hipertensos. Outro estudo do mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que a infusão crônica de 5-HT em ratos reduz a resistência vascular periférica total (DAVIS *et al.*, 2012). Então, apesar da 5-HT ter sido primeiramente conhecida como vasoconstritora *in vitro*, há estudos que mostram que sua administração crônica em ratos é capaz de diminuir a pressão arterial (DIAZ *et al.*, 2008; DAVIS *et al.*, 2013).

As plaquetas possuem um SERT de alta eficiência que lhes permite transportar e armazenar a 5-HT, que poderá também ser liberada posteriormente em diferentes situações, como em um evento trombótico (VANHOUTTE, 1991; WATTS *et al.*, 2012). Dessa forma, o sistema circulatório pode ser exposto à 5-HT através da sua liberação a partir de neurônios serotoninérgicos, por exposição direta à 5-HT livre no sangue, ou ainda através da agregação plaquetária, visto que as plaquetas são responsáveis pelo maior estoque periférico de 5-HT

(SNEDDON, 1969; DIAZ *et al.*, 2008). As plaquetas são consideradas componentes essenciais para a hemostasia primária e estão envolvidas na inflamação, infecção, na resposta do hospedeiro e também no câncer (SONMEZ; SONMEZ, 2017). Elas se aderem e agregam-se em locais onde há lesão vascular, de forma a proteger a integridade do vaso e prevenir hemorragias (BOECHAT *et al.*, 2012; STOPPELAAR; VEER; POLL, 2014). Devido a isso, em casos de infecções, como por exemplo na sepse, uma infecção sistêmica bastante grave, observa-se uma contagem plaquetária inferior ao valor de referência (plaquetopenia), que pode ser devido a hemorragias ou coagulação intravascular disseminada, o que indica uma ativação plaquetária exacerbada, com consequente liberação de mediadores inflamatórios (COKER *et al.*, 1983; YAGUCHI *et al.*, 2004; LEVI, 2008; BOECHAT *et al.*, 2012).

## 1.2. Sepses

A sepse é uma síndrome heterogênea que é causada por uma resposta exacerbada e desequilibrada do hospedeiro na tentativa de combater o agente causador da infecção, levando a uma inflamação sistêmica com complicações na sua progressão (VINCENT e ABRAHAM, 2006; POLL *et al.*, 2017).

As primeiras descrições de sepse são encontradas em papiros egípcios de 1600 a.C., antes mesmo da descoberta dos microrganismos e respostas imunológicas (VERDONK; BLET; MEBAZAA, 2017). Porém o termo “sepse” só teve sua definição no início dos anos 1990. Foi diferenciada em diferentes estágios de gravidade, iniciando então como uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS), seguindo para sepse, sepse grave e choque séptico (VINCENT e ABRAHAM, 2006; POLL *et al.*, 2017). Uma segunda conferência de consenso foi realizada em 2001, validando a maioria dos conceitos anteriores. Na terceira conferência de consenso, em 2016, as definições de sepse e choque séptico foram atualizadas, tendo como objetivo auxiliar a distinção entre aqueles pacientes sépticos e aqueles com infecção não complicada (VERDONK; BLET; MEBAZAA, 2017).

Dessa forma, a sepse atualmente é definida como uma disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta imune desregulada a uma infecção, enquanto que choque séptico trata-se da sepse acompanhada por profundas anormalidades circulatórias e celulares/metabólicas capazes de aumentar substancialmente a mortalidade (VERDONK; BLET; MEBAZAA, 2017).

Além dessas definições, alguns critérios de avaliação também foram elaborados:

- O SOFA (do inglês: “Sequential Organ Failure Assessment Score”; Escore para acesso de falência sequencial de órgãos) é um conjunto de critérios para graduar anormalidades

em diferentes sistemas do organismo, avaliando a probabilidade de mortalidade. Alguns dos critérios levados em consideração são, por exemplo, PaCO<sub>2</sub>, plaquetas, bilirrubina, pressão arterial, creatinina. Cada critério apresenta uma escala de pontuação que vai de 0 a 4. Por exemplo, uma contagem de plaquetas menor que  $20 \times 10^3/\mu\text{L}$  receberia 4 pontos (SINGER *et al.*, 2016; SEYMOUR *et al.*, 2016);

- Já o qSOFA (do inglês: “quick Sequential Organ Failure Assessment Score”; Escore para acesso rápido de falência sequencial de órgãos) é utilizado para identificar pacientes com suspeita de infecção e que apresentem um maior risco de desfechos adversos. Dessa forma são levados em consideração três critérios:

- Pressão arterial sistólica menor que 100 mmHg;
- Frequência respiratória maior que 22/min;
- Alterações do estado mental menor que 15 na escala de coma de Glasgow.

Cada um destes critérios também equivale a um ponto, portanto a escala vai de 0 a 3. Uma pontuação igual ou maior que 2 indica maior risco de mortalidade ou permanência prolongada em Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) (SINGER *et al.*, 2016; SEYMOUR *et al.*, 2016; VERDONK; BLET; MEBAZAA, 2017).

Com base nestes critérios clínicos, é considerada sepse quando há suspeita, ou certeza, de uma infecção e um aumento de 2 ou mais pontos no SOFA em resposta a essa infecção. O choque séptico ocorre quando, além da sepse, o paciente apresenta lactato maior que 2 mmol/L (hiperlactatemia) após reanimação volêmica e hipotensão severa, havendo necessidade da administração de vasopressores para elevar a pressão arterial média acima de 65 mmHg (SINGER *et al.*, 2016; SEYMOUR *et al.*, 2016). A hiperlactatemia é um importante indicativo de hipóxia tecidual (LEVY, 2006).

A sepse é uma das principais causas de morte nas UTIs, requerendo um grande volume de cuidados de saúde e encargos econômicos em todo o mundo (TANIGUCHI *et al.*, 2014). Dados epidemiológicos relatam que no período entre 1975 e 2015, a incidência global foi estimada em 288 casos de sepse por 100.000 pessoas/ano, sendo que nos últimos 10 anos (2005–2015), essa estimativa aumentou para 437 casos de sepse por 100.000 pessoas/ano. Os dados equivalem a uma estimativa de 31,5 milhões de casos de sepse em hospitais em todo o mundo a cada ano (FLEISCHMANN *et al.*, 2016; TILLMANN; WUNSCH, 2018). Em um estudo brasileiro que avaliou um período de um ano, 46,9% de todos os pacientes admitidos em uma UTI por mais de 24 h foram definidos sépticos (SILVA *et al.*, 2004), além disso, 12,9% dos óbitos foram relacionados à sepse, num estudo entre 2002 e 2010, e as taxas de mortalidade estão aumentando (TANIGUCHI *et al.*, 2014).

A sepse representa um custo significativo para os sistemas de saúde de todo o mundo e para o indivíduo afetado. Estima-se que na Alemanha, por exemplo, o gasto médio por caso de sepse seja de €27.468. Em Taiwan, o encargo hospitalar médio aumentou de US\$ 1.718 em 1997 para US\$ 2.911 em 2006, e na China, o custo total médio do tratamento da sepse por paciente é relatado em US\$ 11.390. No Brasil, o custo médio de cuidados por paciente com sepse é US\$ 9.632 (TILLMANN; WUNSCH, 2018).

Crianças e idosos são as populações com maior número de mortes relacionadas à sepse. Os homens apresentam taxas mais altas de morte do que as mulheres (TANIGUCHI *et al.*, 2014). Quando estudada a etiologia da infecção, foram encontradas como causas mais comuns: bactérias gram-negativas e gram-positivas. Dentre os organismos gram-negativos, *Escherichia coli* e *Pseudomonas* foram os mais frequentemente relatados em vários países. O *Staphylococcus aureus* foi o organismo gram-positivo mais comumente cultivado. Pulmões e abdômen são os dois locais mais comuns acometidos pela infecção inicial. Infecções pulmonares foram relatadas em 28% a 53% dos casos, e infecções intra-abdominais em 19% a 49% dos casos (TILLMANN; WUNSCH, 2018).

A resposta imune inata é responsável pelo início da resposta do hospedeiro ao processo inflamatório na sepse. Ela ocorre através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*), presentes na parede celular das células do sistema imune. Os receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês *toll-like receptors*), são exemplos de PRRs, sendo então capazes de reconhecer os patógenos ou seus produtos, identificados como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*). Os TLR-2 reconhecem os peptídeos das bactérias gram-positivas, e os TLR-4 reconhecem os lipopolissacarídeos (LPS) das gram-negativas. Uma vez ativados, os TLRs desencadeiam uma cascata de transdução de sinal intracelular, culminando na ativação do fator nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B, do inglês *nuclear factor-kappa beta*), que promove a expressão gênica de moléculas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ). A ativação dessas citocinas pró-inflamatórias leva a um aumento na expressão de moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais. Estas quando ativadas, vão liberar óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*), que tem papel importante na patogênese do choque séptico, sendo um potente vasodilatador (RUSSELL, 2006; CINEL; OPAL, 2009; GOTTS; A MATTHAY, 2016; POLL *et al.*, 2017; RELLO *et al.*, 2017).

O óxido nítrico é produzido a partir da L-arginina pela ação da enzima sintase do óxido nítrico (NOS). Essa enzima está presente em três isoformas: NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) e NOS induzida (iNOS). Grandes quantidades de NO são produzidas pela

iNOS em resposta a uma lesão no endotélio vascular, miocárdio e músculo liso vascular. A produção de NO está exacerbada na sepse e, embora seja benéfico na defesa do hospedeiro, acaba provocando algumas reações prejudiciais. Esse aumento na produção de NO contribui para algumas das principais características do choque séptico, como uma hipotensão severa, hiporreatividade vascular a vasoconstritores e disfunção miocárdica. (SCHAEFFER *et al.*, 1990; ALDERTON, COOPER e KNOWLES, 2001; ASSREUY, 2006; FERNANDES *et al.*, 2008). Diversos autores, em estudos experimentais, sugerem que, no choque séptico, a reatividade reduzida aos vasoconstritores endógenos é, pelo menos em parte, uma causa para a hipotensão. Estas alterações nas respostas vasculares podem reduzir a eficácia do fármaco vasoativo em pacientes sépticos, dificultando a sua recuperação (DA SILVA-SANTOS *et al.*, 2009). Dessa forma, apesar das inovações terapêuticas, o tratamento para a sepse ainda é um desafio, e a taxa de mortalidade no choque séptico ainda continua alta. O início precoce do tratamento é crucial para um bom prognóstico (GOTTS; A MATTHAY, 2016; RELLO *et al.*, 2017).

Como já exposto, por se tratar de uma infecção, as células do sistema imune são recrutadas para combater o agente infeccioso, e assim também são as plaquetas, com o intuito de auxiliarem na manutenção da hemostasia desse organismo (STOPPELAAR; VEER; POLL, 2014). As plaquetas são ativadas durante a sepse, liberando diversos mediadores que afetam a coagulação e a função endotelial, tendo elas então, papel importante na resposta inflamatória, na homeostasia e também na permeabilidade microvascular. Um desses mediadores é a 5-HT, que, como mencionado anteriormente, é armazenada nas plaquetas e liberada no plasma durante a ativação plaquetária. O SERT é expresso na superfície da célula plaquetária e endotelial e trabalha removendo a 5-HT do sangue, e conseqüentemente aumentando seus níveis intracelulares. A 5-HT é uma molécula sinalizadora que pode mediar várias funções celulares, apresentando também função pró-inflamatória, regulando a liberação de mediadores e recrutando células inflamatórias (MAJNO, 1961; STOPPELAAR; VEER; POLL, 2014; LI *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2017).

Uma das características da sepse é a hiperpermeabilidade da barreira endotelial, com conseqüente vazamento microvascular. Os níveis plasmáticos de 5-HT estão elevados durante a sepse e isso desencadeia um aumento na sua captação pelo SERT endotelial. Esse aumento da captação de 5-HT pelo endotélio inicia uma via de sinalização, através da ativação da quinase ativadora da p21 (PAK1) e subsequente fosforilação da vimentina e sua associação aumentada com a ve-caderina, levando a um enfraquecimento da barreira de permeabilidade das células endoteliais (LI *et al.*, 2016).

Foi demonstrado por Zhang *et al.* (2017) que, em camundongos sépticos, a 5-HT causou mortalidade e disfunção orgânica exacerbadas através da promoção de citocinas séricas e cargas bacterianas e facilitando o estresse oxidativo.

Esses dados da literatura mostram que a 5-HT parece contribuir para a progressão da sepse, e tendo em vista que pacientes sépticos ainda apresentam elevada morbidade e mortalidade, as vias de sinalização SERT e 5-HT podem ser consideradas novos alvos terapêuticos para o tratamento da sepse (LI *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2017).

### 1.3. Modelos experimentais

Diversos modelos animais podem ser usados para estudar a patologia da sepse, e/ou alguns de seus sintomas, e podem ser divididos em três categorias: administração exógena de toxina, administração exógena de um patógeno viável e alteração da barreira de proteção endógena do animal (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005).

A ligadura e perfusão do ceco (CLP) é um exemplo de modelo de sepse, o qual produz uma infecção polibacteriana em um foco localizado, assemelhando-se à progressão da sepse em humanos. Este modelo é utilizado principalmente em ratos e sua técnica envolve a laparotomia na linha média, com a exposição do ceco, a realização de uma ligadura do ceco à válvula ileocecal e, posteriormente, a punção do ceco. Este processo cria uma perfuração intestinal com vazamento de conteúdo fecal para o peritônio, estabelecendo uma infecção com microbiota mista (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005; POLI-DE-FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Outro exemplo é o modelo de infecção bacteriana, comumente utilizado para se estudar o mecanismo da sepse, pois com ele pode-se observar a resposta do hospedeiro ao patógeno. Neste modelo, uma ou mais bactérias são inoculadas no animal. Podem ser utilizadas várias vias de inoculação como a via intraperitoneal, intravenosa ou ainda a via pulmonar (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005).

O modelo de endotoxemia é amplamente utilizado por ser prático e de fácil reprodutibilidade em diferentes espécies animais (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005). Essa técnica envolve a administração de lipopolissacarídeo (LPS), um componente da parede celular de bactérias gram-negativas. Quando administrado a um animal, o LPS promove a liberação de mediadores inflamatórios de vários tipos de células, responsáveis pelo início do processo de sepse (POLI-DE-FIGUEIREDO *et al.*, 2008). A injeção de doses baixas de LPS pode induzir alterações fisiopatológicas semelhantes às relatadas em pacientes com sepse (BIANCA *et al.*, 2003; BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005). Além dos sintomas inflamatórios, a injeção de LPS causa hipotensão e hiporreatividade vascular (BIANCA *et al.*,

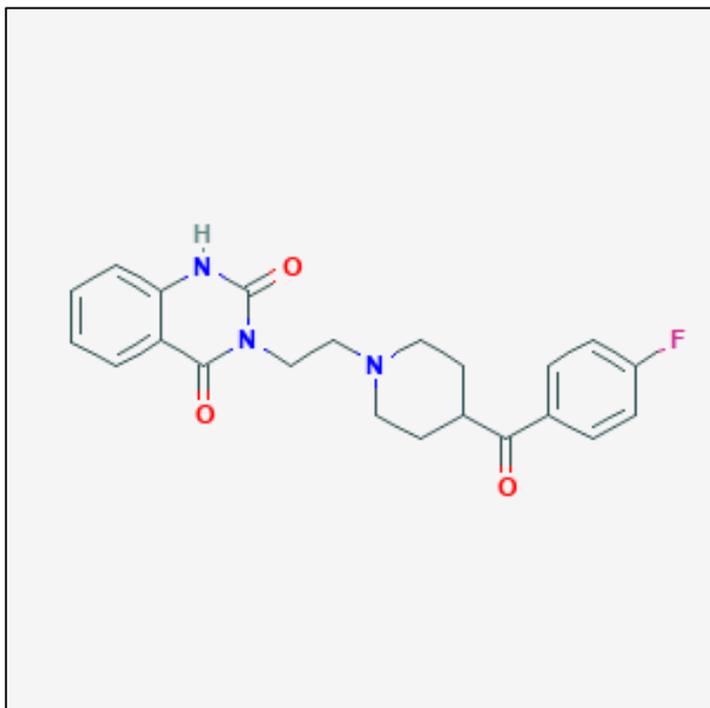
2003). Como o foco deste estudo está no sistema cardiovascular, mais precisamente na queda da pressão arterial, decidimos utilizar este modelo experimental, o de endotoxemia.

#### 1.4. Drogas que afetam a homeostase da serotonina

Muitas drogas que têm como alvo o sistema serotoninérgico, são amplamente utilizadas na população geral, sejam elas para controle do apetite, transtornos de humor, sono, enxaquecas, entre outros (AYME-DIETRICH *et al.*, 2017).

A ketanserina é um antagonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>2A</sub>, que inicialmente apresentou efeito anti-hipertensivo (WENTING *et al.*, 1982; HEDNER; PERSSON; BERGLUND, 1983; DONNELLY *et al.*, 1987). A figura 2 apresenta sua estrutura química.

**Figura 2:** Estrutura química da ketanserina.



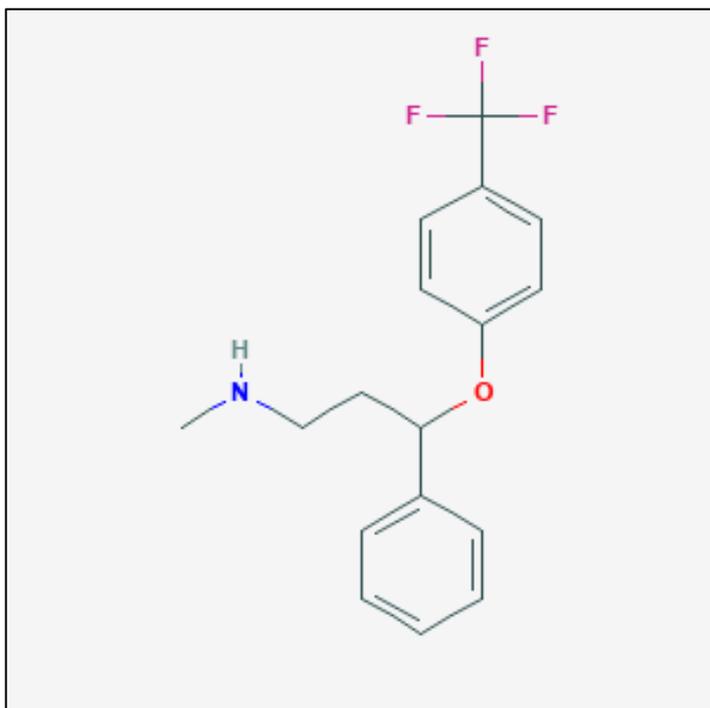
Fonte: National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Ketanserin, CID=3822, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3822> (accessed on May 23, 2019)

Estudos do nosso laboratório mostraram que a administração prévia de ketanserina foi capaz de atenuar o efeito hipotensor induzido por LPS em ratos (METZKER, 2015). Dados da literatura mostram que o sarpogrelato, também um antagonista de receptores 5-HT<sub>2A</sub>, assim como a ketanserina, foi eficaz em diminuir a produção de citocinas e a mortalidade na sepse (NISHIYAMA, 2009). A ketanserina também tem sido utilizada em alguns estudos com ratos e camundongos, para restaurar a função do barorreflexo na pressão arterial durante o choque

endotoxêmico (LIU *et al.*, 2011), e o tratamento com ketanserina no choque endotoxêmico diminui a permeabilidade vascular a leucócitos (WALTHER *et al.*, 2002; WALTHER *et al.*, 2007).

A fluoxetina, um medicamento antidepressivo, pertencente ao grupo dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs), foi aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) em 1987 (FULLER, 1992; FULLER, 1994; PEREIRA *et al.*, 2015; SIMPLICIO *et al.*, 2015). Os fármacos dessa classe inibem de forma potente e seletiva a recaptação da 5-HT na fenda sináptica, aumentando sua disponibilidade e promovendo uma potencialização da neurotransmissão serotoninérgica (FULLER, 1992; FULLER, 1994; MORENO; MORENO; SOARES, 1999). A figura 3, a seguir, representa a estrutura química da fluoxetina.

**Figura 3:** Estrutura química da fluoxetina.



Fonte: National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Fluoxetine, CID=3386, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3386> (accessed on May 23, 2019)

Seu metabolismo ocorre majoritariamente no fígado, tendo como principal metabólito a norfluoxetina, formada a partir da N-desmetilação da fluoxetina (FULLER, 1992; CACCIA *et al.*, 1990). O tempo de meia vida da fluoxetina quando administrada de forma aguda é de 1 a 3 dias, e cronicamente é de 4 a 6 dias. Já a norfluoxetina apresenta tempo de meia vida superior, de 4 a 16 dias (CACCIA *et al.*, 1990; MANDRIOLI; FORTI; RAGGI, 2006). Foi observado

que em administração aguda por via subcutânea em ratos, a fluoxetina (10 mg/Kg) é rapidamente eliminada, no tempo máximo de 24 h, enquanto que a concentração de norfluoxetina aumenta lentamente pela N-desmetilação da fluoxetina e mantém um perfil estável de concentração plasmática máxima entre 6 h a 24 h (QU *et al.*, 2009).

Na clínica a fluoxetina é utilizada principalmente no tratamento de transtornos depressivos, mas pode também ser indicada para tratamento de bulimia, transtorno de ansiedade, transtorno do pânico, ejaculação precoce, entre outros (WOOD; GRAM, 1994; BARAKAT; HAMDY; ELBADR, 2018). Foi o medicamento mais vendido nos EUA em 1996 e responsável por 6 milhões de prescrições no Reino Unido em 2011. De acordo com o National System of Management of Controlled Products, 3,5 toneladas de fluoxetina foram usadas no Brasil em 2006, não só para tratar a depressão, mas também como reguladora do apetite (PEREIRA *et al.*, 2015).

A fluoxetina e outros ISRS ganharam força e popularidade, alcançando esse nível elevado de utilização, devido ao seu suposto perfil de segurança e tolerabilidade favorável em relação aos antidepressivos tricíclicos (WOOD; GRAM, 1994). Porém, algumas evidências sugerem efeitos colaterais cardiovasculares associados ao uso da fluoxetina, como por exemplo: hipotensão ortostática, arritmia, hipertensão gestacional, pré-eclâmpsia e disfunção sexual (PACHER *et al.*, 2001; TOH *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2010; CRESTANI *et al.*, 2011).

A fluoxetina tem se mostrado como inibidora de vários receptores e canais iônicos que têm participação direta na regulação do tônus vasomotor. Esses achados mostram que além dos efeitos antidepressivos, ela pode ser capaz de alterar os mecanismos envolvidos na pressão arterial e controle do tônus vasomotor (PEREIRA *et al.*, 2015). Os achados de Simplicio *et al.* (2015) mostraram que o tratamento crônico com fluoxetina (10 mg/kg/dia durante 21 dias) foi capaz de induzir disfunção endotelial, alterando a responsividade vascular, através de um aumento do estresse oxidativo e geração de um prostanóide vasoconstritor derivado da COX (PGF2 $\alpha$ ). No estudo de Crestani *et al.* (2011), observou-se que ratos tratados cronicamente com fluoxetina (10 mg/kg/dia durante 21 dias) desenvolveram hipertensão leve. Este efeito foi seguido por alterações no controle barorreflexo da frequência cardíaca e resposta vascular alterada aos agentes vasoativos.

Sabendo que o choque séptico está associado à hipotensão; que durante a sepse a agregação plaquetária está exacerbada; que as plaquetas são o maior estoque periférico de 5-HT; e que quando administrada cronicamente em ratos a 5-HT induz uma diminuição nos níveis pressóricos desses animais, testamos em nosso laboratório a hipótese inicial de que a 5-HT participa pelo menos parcialmente na hipotensão observada na sepse.

Nesses estudos preliminares, observamos que a administração prévia de 5-HT dificultou o reestabelecimento da pressão arterial em ratos endotoxêmicos e que a administração prévia de um antagonista do receptor de 5-HT, a ketanserina, foi capaz de atenuar o quadro de hipotensão desses animais (CARIOLETTI, 2015; METZKER, 2015).

A partir desses dados, surgiu uma nova pergunta: se um antagonista do receptor de 5-HT foi capaz de atenuar o quadro de hipotensão na endotoxemia, será que um fármaco que aumente os níveis de 5-HT apresentaria um efeito contrário, causando uma maior queda na pressão arterial?

Desta forma, hipotetizamos que drogas que aumentam os níveis de 5-HT, como os ISRS, podem agravar o quadro hipotensivo observado na sepse e que o uso de um antagonista de receptor da 5-HT é capaz de atenuá-lo.

## **2. OBJETIVO**

Avaliar o efeito da fluoxetina e da ketanserina na pressão arterial de ratos endotoxêmicos.

### **2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o efeito do tratamento crônico com fluoxetina por via oral na PAS de ratos endotoxêmicos;
- Avaliar o efeito do tratamento crônico com fluoxetina por via intraperitoneal na PAS de ratos endotoxêmicos;
- Comparar os resultados entre as vias de administração;
- Avaliar o efeito do antagonista de receptores da 5-HT, a ketanserina, nos valores pressóricos observados em ratos endotoxêmicos tratados cronicamente com fluoxetina por via intraperitoneal.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Para a realização deste estudo, foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Todos os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, dentro de gaiolas com serragem e livre acesso à água e comida durante todo o período de realização dos experimentos. O ambiente apresenta luminosidade e temperatura controladas (ciclo 12 horas claro/escuro;  $22 \pm 2^\circ \text{C}$ , respectivamente). Os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC - protocolo nº 4181170516.

#### **3.2. Drogas e reagentes**

As drogas e os reagentes utilizados neste estudo estão descritos a seguir: fluoxetina (Vita Essência, Florianópolis, SC, Brasil), ketanserina, lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* sorotipo tipo 1 O111:B4 (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA), heparina, fluoreto, cloridrato de ketamina e cloridrato de xilazina (Syntec, São Paulo, SP, Brasil), dimetil sulfóxido (DMSO) e PBS (do inglês Phosphate Buffered Saline).

O LPS foi dissolvido em PBS. A ketanserina e a fluoxetina (quando administrada por via intraperitoneal) foram diluídas em DMSO e depois em PBS (solução final 10%). A fluoxetina, quando administrada por via oral, foi misturada diretamente ao creme de avelã.

#### **3.3. Protocolos experimentais**

##### **3.3.1. Tratamento crônico por via oral (V.O.)**

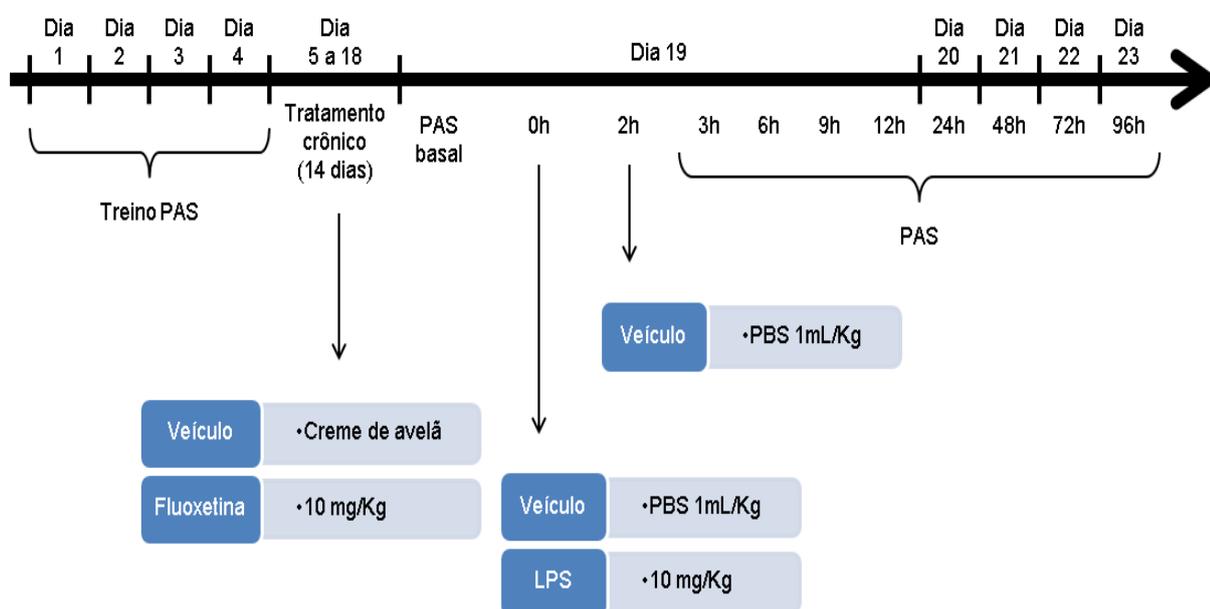
Os animais foram divididos de forma aleatória em 4 diferentes grupos: veículo + veículo + veículo; veículo + LPS + veículo; fluoxetina + veículo + veículo; fluoxetina + LPS + veículo. Durante os primeiros 4 dias, animais de todos os grupos foram submetidos a medidas de pressão arterial, para que os mesmos se acostumassem com o procedimento. Nesse período de treino de medidas de pressão arterial, também lhes foi apresentado o creme de avelã, que foi usado como veículo para a administração de fluoxetina<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> O creme de avelã foi escolhido como alternativa palatável para a administração de fluoxetina, visto que experimentos prévios usando diluição na água com açúcar não obtiveram sucesso (os animais não beberam a água contendo fluoxetina e açúcar). Para ciência dos procedimentos testados, estes se encontram no apêndice.

No quinto dia, iniciou-se o tratamento crônico onde metade dos animais recebeu apenas o creme de avelã, V.O. (veículo) e a outra metade recebeu fluoxetina (10 mg/kg, V.O.) no creme de avelã. Após as duas semanas de tratamento, foi realizada a medida de pressão arterial basal e logo em seguida foi administrado por via intraperitoneal o LPS (10 mg/Kg) para indução da endotoxemia ou o veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) para controle. Após 2 h, todos os grupos receberam veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.)<sup>2</sup>. A pressão arterial sistólica (PAS) de todos os grupos foi medida em diferentes tempos conforme o **DIAGRAMA 1**.

**Diagrama 1:** Linha do tempo para o protocolo experimental de tratamento crônico por via oral.



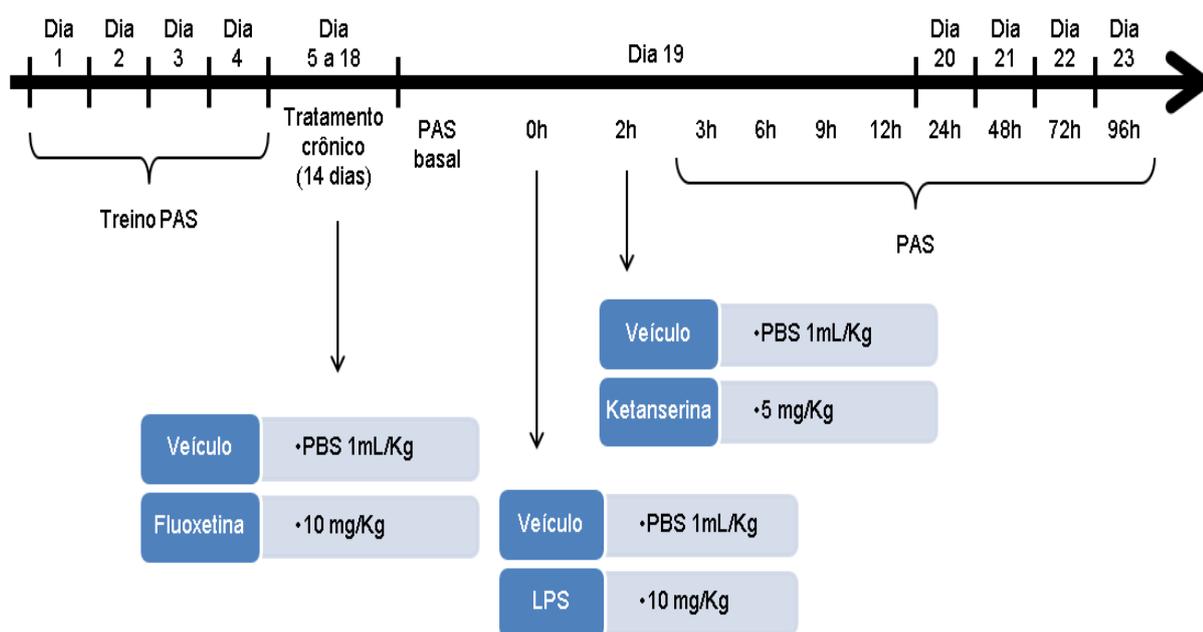
### 3.3.2. Tratamento crônico por via intraperitoneal (I.P.)

Este protocolo se assemelha ao anterior, entretanto, na tentativa de contornar alguns vieses observados, como por exemplo o fato de alguns animais não terem consumido o creme de avelã com ou sem fluoxetina por um ou mais dias de tratamento, optamos por utilizar outra via de administração: a via intraperitoneal.

<sup>2</sup> Esse procedimento foi realizado para o caso de experimentos futuros utilizando diferentes possíveis tratamentos após a indução da endotoxemia viessem a ser realizados.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 8 diferentes grupos: veículo + veículo + veículo; veículo + LPS + veículo; fluoxetina + veículo + veículo; fluoxetina + LPS + veículo; veículo + veículo + ketanserina; veículo + LPS + ketanserina; fluoxetina + veículo + ketanserina; fluoxetina + LPS + ketanserina. Assim como no protocolo anterior, os 4 primeiros dias consistiram em um treinamento para as medidas de pressão arterial, de forma a ambientar os animais ao procedimento. No quinto dia foi iniciado o tratamento crônico, sendo que metade dos grupos recebeu veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) e a outra metade fluoxetina (10 mg/Kg/dia, I.P.). Após duas semanas, no 19º dia, foi realizada administração de LPS (10 mg/Kg, I.P.) para indução da endotoxemia ou de veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) para controle. Após 2 h, veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) ou ketanserina (5 mg/Kg, I.P.) foram administrados. Medidas de PAS foram realizadas nesses animais conforme representado a seguir no **DIAGRAMA 2**.

**Diagrama 2:** Linha do tempo para o protocolo experimental de tratamento crônico por via intraperitoneal.



### 3.4. Medida de pressão arterial sistólica

As medidas de PAS foram realizadas por pletismografia de cauda. Durante todo esse procedimento, a sala foi mantida a uma temperatura de 30°C e nela os animais permaneceram ambientando por meia hora antes de cada medida. Além disso, uma manta térmica também foi utilizada para aquecer os animais e assim facilitar a dilatação da artéria caudal possibilitando a detecção do pulso arterial. Os animais foram acondicionados individualmente em um contensor

de acrílico para limitar seus movimentos durante as medidas. Um manguito (tail-cuff) foi colocado na cauda do animal e o mesmo encontra-se acoplado a uma bomba insufladora de ar (Eletro-Esfigmomanômetro, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). Quando essa bomba é acionada o manguito infla e ocorre a oclusão do fluxo sanguíneo. Com o esvaziamento do manguito o fluxo sanguíneo retorna gerando o primeiro sinal de pulso. Próximo ao manguito encontra-se acoplado também um transdutor de pulso (sensor) que detecta esse sinal de pulso da artéria caudal e envia ao computador. Este primeiro sinal registrado representa a PAS.

Os dados correspondentes ao fluxo sanguíneo, assim como a pressão necessária para oclusão da artéria caudal (em mmHg) e a frequência cardíaca em batimentos por minuto (BPM) foram adquiridos e registrados pelo sistema (Programa LabChart, versão 7.0, Bella Vista, Austrália) acoplado ao manguito e ao sensor.

Todos os animais do presente estudo foram submetidos a medidas de PAS em diferentes momentos, conforme apresentado anteriormente. O valor de PAS foi obtido através da média aritmética de três medidas em cada tempo.

### **3.5. Dosagens plasmáticas**

Para este protocolo experimental os animais foram divididos em 8 diferentes grupos de forma aleatória: veículo + veículo + veículo; veículo + LPS + veículo; fluoxetina + veículo + veículo; fluoxetina + LPS + veículo. Assim como os demais experimentos, passaram por um período de teste, no qual foram obtidas medidas de PAS durante 4 dias. Durante 14 dias os animais receberam tratamento com veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) ou fluoxetina (10 mg/Kg/dia, I.P.). Ao fim do tratamento, no 19º dia, foi administrado LPS (10 mg/Kg, I.P.) para indução da endotoxemia ou veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) para controle. Após 2 h, foi administrado veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) para todos os animais. Foi realizada a coleta de material sanguíneo por punção cardíaca, sendo que metade dos animais de cada um dos grupos teve seu sangue coletado no tempo 6 h, e a outra metade dos animais no tempo 24 após administração de LPS/PBS.

#### **3.5.1. Hemograma**

Para realizar a contagem hematológica, 1 mL do sangue coletado foi despejado em eppendorf contendo 1 µL de heparina e em seguida, homogeneizado. O tubo com a amostra foi inserido no contador hematológico Horiba Abx Micros 60, Shandong, China.

#### **3.5.2. Nitrato e nitrito**

Após realizada a contagem hematológica, os tubos com o restante das amostras foram centrifugados a 2.000 rpm por 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf destinado à dosagem plasmática de nitrato e nitrito (NOx). Inicialmente foi realizada

a desproteção das amostras, adicionando aos eppendorfs o mesmo volume de água e sulfato de zinco 20% (1:10 do volume da amostra diluída). Foram então mantidas em banho de gelo por 1 h e após isso as amostras foram centrifugadas por 15 min a 10.000 rpm a 4°C. Uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi retirada e adicionados 20 µl de fosfato de sódio, 20 µl de formato de amônio e 10 µl da bactéria. Em paralelo a isso, as curvas padrão também foram preparadas (0; 2.5; 5; 10; 25; 50; 100 e 150 µM). Amostras e curvas foram incubadas a 37°C por 3 h, depois foram centrifugadas por 15 min a 3.700 rpm. Em uma placa de 96 poços, 100 µl do sobrenadante foram adicionados juntamente com 100 µl do reagente de Griess. Após 10 min foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm (SORDI et al., 2013).

### **3.5.3. Lactato**

Para a dosagem plasmática de lactato, 0,5 mL do sangue coletado foi despejado em eppendorf contendo fluoreto, foi então homogeneizado e mantido em gelo até ser colocado na centrífuga. As amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf. A partir disso foram retirados 5 µL das amostras, adicionados 500 µL do reagente de trabalho fornecido pelo kit Labtest® e incubados a 37°C por 5 min. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 200 µL das amostras e foi determinada a absorbância em 550 nm.

### **3.5.4. Glicose**

Para este teste, foi utilizada uma gota da amostra sanguínea, que foi pingada sobre uma fita de medição acoplada ao aparelho monitor de glicose Bioland® modelo G-500 (GONÇALVES *et al.*, 2014).

## **3.6. Análises estatísticas**

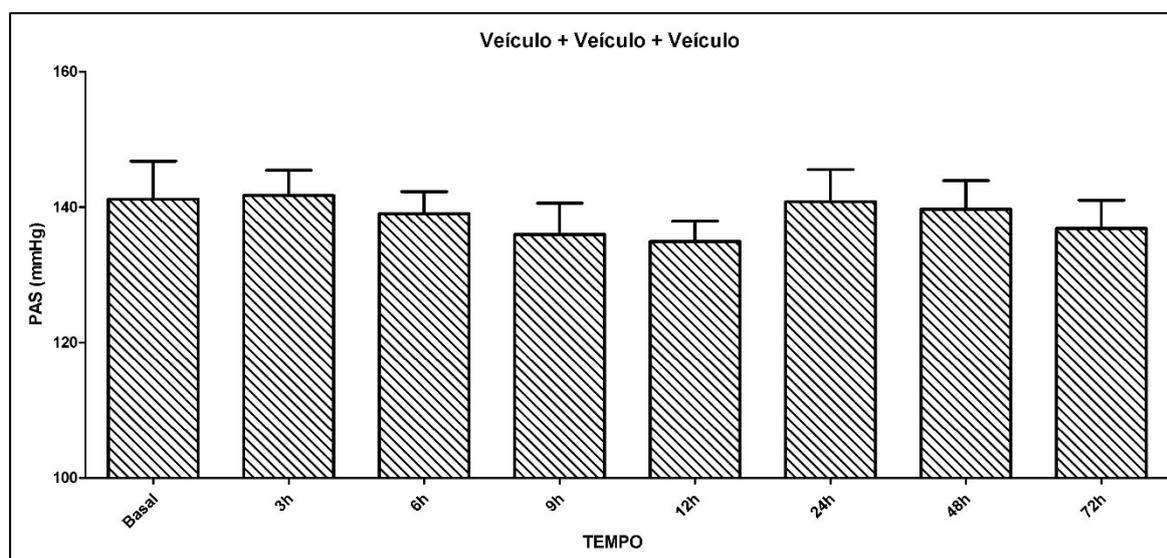
Os valores da PAS e das dosagens plasmáticas foram expressos através da média  $\pm$  o erro padrão da média. Os gráficos e análises estatísticas foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). A estatística foi realizada por teste t de Student ou por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguido de pós teste de Bonferroni, sendo consideradas diferenças significantes quando  $P < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Tratamento crônico por via oral (V.O.)

A FIGURA 4 apresenta a média dos valores de PAS em mmHg obtidos de 8 animais do grupo veículo + veículo + veículo. Esses animais receberam o creme de avelã (veículo; V.O.) durante 14 dias e, ao final desse tratamento, a PAS basal foi medida imediatamente antes de uma injeção I.P. de veículo (PBS; 1 mL/Kg), seguida de outra injeção de veículo (PBS; 1 mL/Kg; I.P.) após 2 h. Como podemos observar na FIGURA 4, a PAS dos animais do grupo se manteve semelhante ao longo dos tempos ( $P > 0,05$ ).

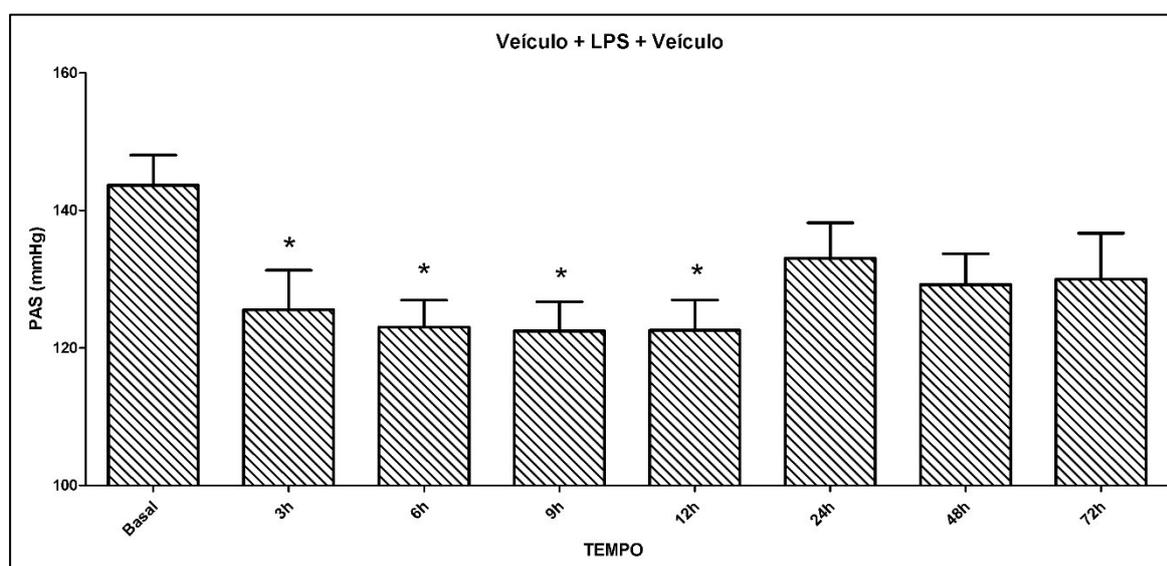
**Figura 4: Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via oral com veículo e que receberam por via IP veículo e veículo.** Após tratamento com veículo (Creme de avelã) por 14 dias, os animais receberam veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) e novamente veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) após 2 h. Em seguida, foram submetidos a medidas de pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda em diferentes tempos. Os animais tiveram as medidas de PAS basal imediatamente antes da administração de PBS. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 8 animais em todos os tempos. ( $P > 0,05$ ; ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



As médias dos valores de PAS em mmHg obtidos de 8 animais do grupo veículo + LPS + veículo estão representadas no gráfico da FIGURA 5. Os animais deste grupo também receberam o creme de avelã (veículo; V.O.) como tratamento por 14 dias, sendo que a PAS basal foi medida antes dos animais receberem LPS (10 mg/Kg, I.P.) seguido de veículo (PBS; 1 mL/Kg) após 2 h. É possível notar que o LPS induziu uma queda significativa nos valores de

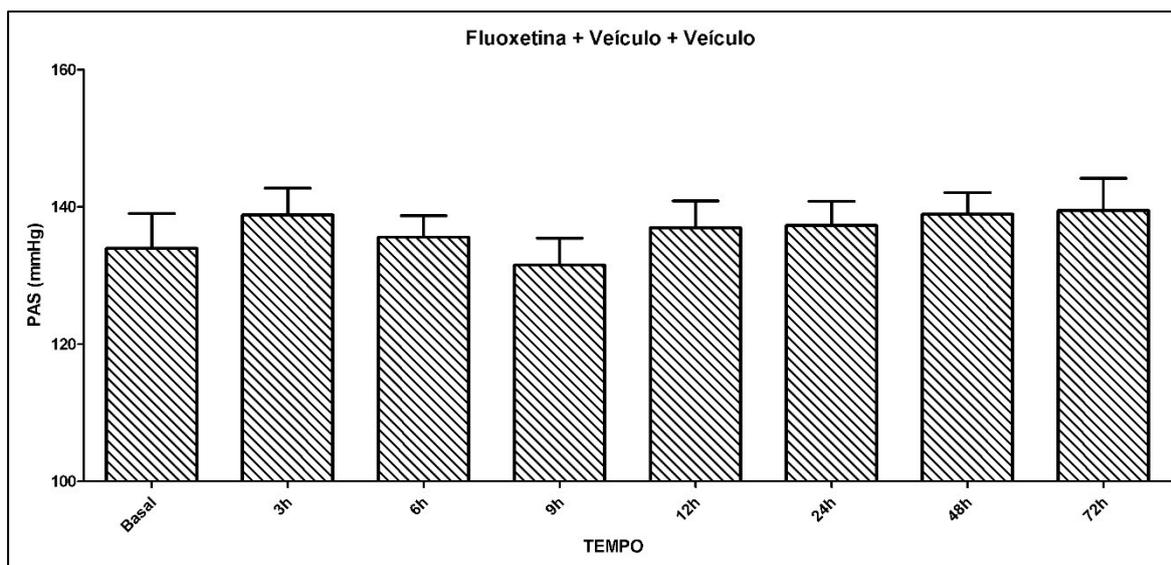
PAS obtidos após 3, 6, 9 e 12 h da sua administração. Após 24 h da administração de LPS, a PAS foi reestabelecida, o que perdurou até 72 h.

**Figura 5: Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via oral com veículo e que receberam por via IP LPS e veículo.** Os animais receberam tratamento com veículo (Creme de avelã) por 14 dias, e após, foram submetidos à administração de LPS (10 mg/Kg, I.P.) e de veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) depois de 2 h. Foram obtidas medidas de pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda em diferentes tempos. Antes da administração de LPS, foram obtidas as medidas de PAS basal. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 8 animais em todos os tempos. \*  $P < 0,05$  vs. PAS basal (ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



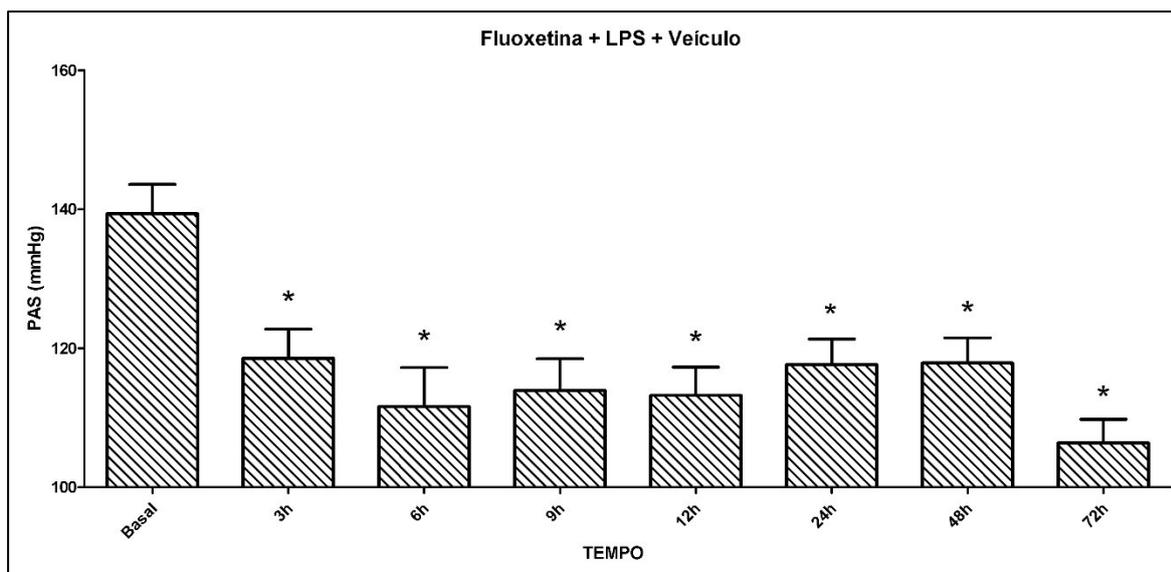
A FIGURA 6 representa o gráfico obtido a partir das médias dos valores de PAS em mmHg de 8 animais do grupo fluoxetina + veículo + veículo. Para os animais deste grupo, o tratamento oferecido durante 14 dias por V.O. foi a fluoxetina (10 mg/Kg) misturada em creme de avelã. No 19º dia a PAS basal foi medida e posteriormente foi administrado veículo (PBS; 1 mL/Kg) seguido de outra dose de veículo (PBS; 1 mL/Kg) após 2 h. Podemos notar que a pressão arterial dos ratos deste grupo não apresentou diferença significativa entre todos os tempos avaliados ( $P > 0,05$ ).

**Figura 6: Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via oral com fluoxetina e que receberam por via IP veículo e veículo.** Os animais foram tratados com fluoxetina (10 mg/Kg) por 14 dias e receberam veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) após esse tratamento, seguida de nova administração de veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) após 2 h. Medidas de pressão arterial sistólica (PAS) foram obtidas por pletismografia de cauda em diferentes tempos. As medidas de PAS basal foram obtidas antes da primeira administração de PBS. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 8 animais em todos os tempos. ( $P > 0,05$ ; ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



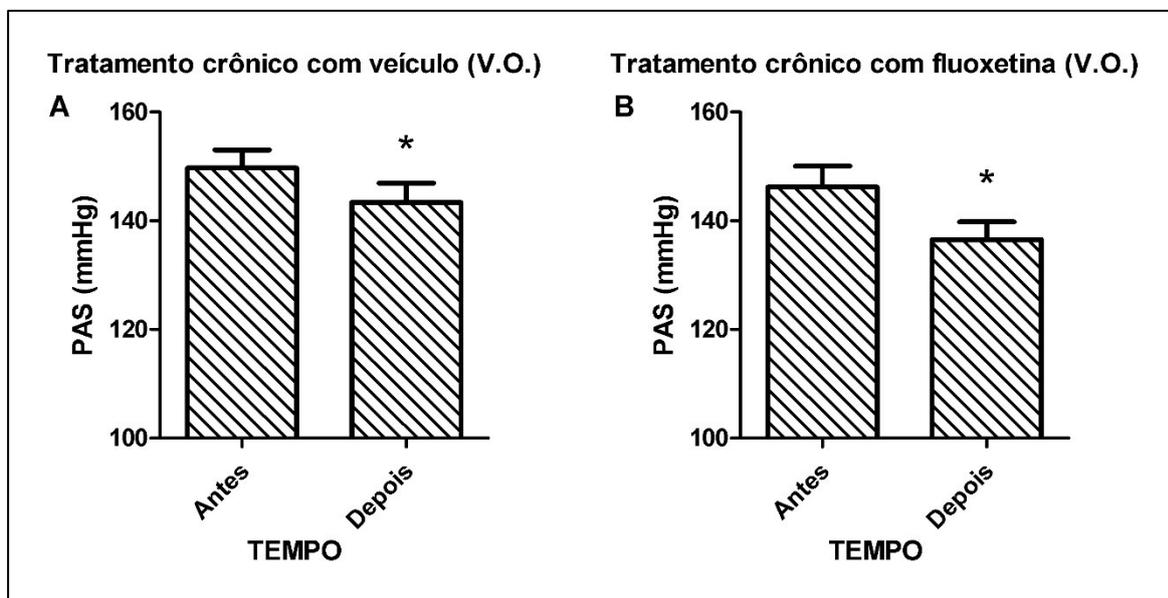
O gráfico mostrado na **FIGURA 7** representa os valores de PAS em mmHg obtidos de 7 animais do grupo fluoxetina + LPS + veículo. Esses animais foram tratados cronicamente por 14 dias por V.O. com fluoxetina (10 mg/Kg) misturada no creme de avelã. A PAS basal foi medida no 19º dia e, logo em seguida, foi realizada a indução da endotoxemia com LPS (10 mg/Kg, I.P.) seguida da administração de veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) após 2 h. A queda na PAS foi observada até 72 h após tratamento com LPS nos ratos que foram submetidos ao tratamento crônico com fluoxetina por 14 dias por V.O.

**Figura 7: Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via oral com fluoxetina e que receberam por via IP LPS e veículo.** Após o tratamento com fluoxetina (10 mg/Kg) durante 14 dias, os animais foram submetidos à administração de LPS (10 mg/Kg, I.P.) e em seguida, 2 h depois, veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.). Foram obtidas medidas de pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda em diferentes tempos. Imediatamente antes da administração de LPS foram obtidas as medidas de PAS basal. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 7 animais em todos os tempos. \*  $P < 0,05$  vs. PAS basal (ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



A **FIGURA 8** apresenta os gráficos das medidas de PAS obtidas antes e após o tratamento crônico com veículo (A) e fluoxetina (B) por via oral. A PAS foi medida no 4º e 19º dias do protocolo experimental, ou seja, um dia antes e um dia depois do tratamento com fluoxetina (10 mg/Kg) ou veículo (creme de avelã) por via oral durante 14 dias. Podemos observar que ambos os tratamentos por via oral durante 14 dias diminuíram a PAS dos animais.

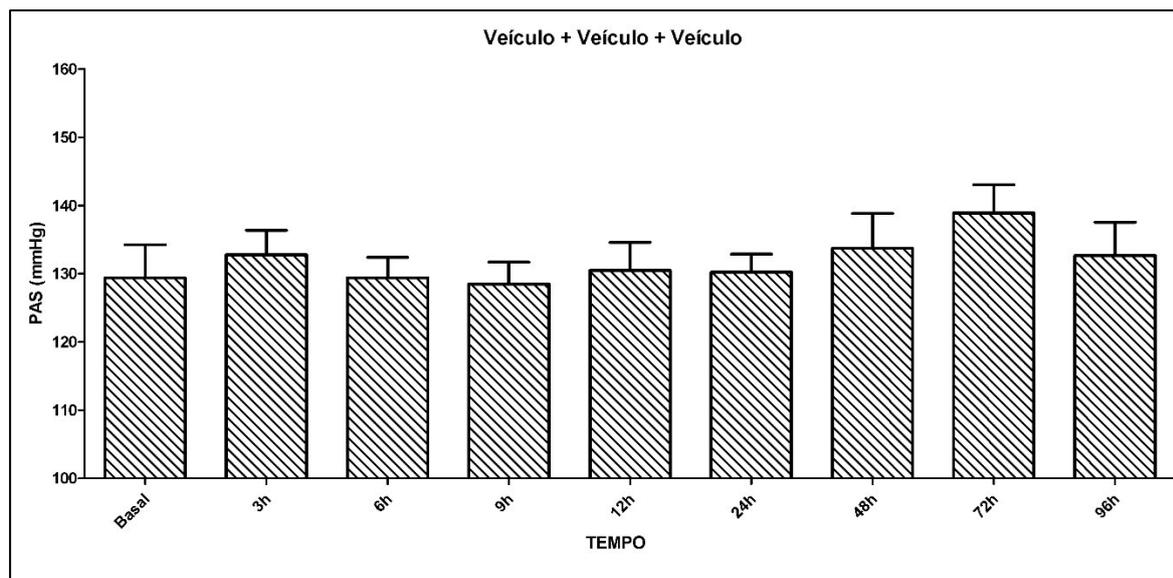
**Figura 8: Pressão arterial sistólica de ratos antes e depois do tratamento crônico por via oral com veículo (A) ou fluoxetina (B).** Foram obtidas medidas de pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda um dia antes e um dia após o tratamento com fluoxetina (10 mg/Kg) ou veículo (creme de avelã) por via oral durante 14 dias. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 15 animais em ambos os tempos. \*  $P < 0,05$  vs. PAS antes (teste t de Student).



#### 4.2. Tratamento crônico por via intraperitoneal (I.P.)

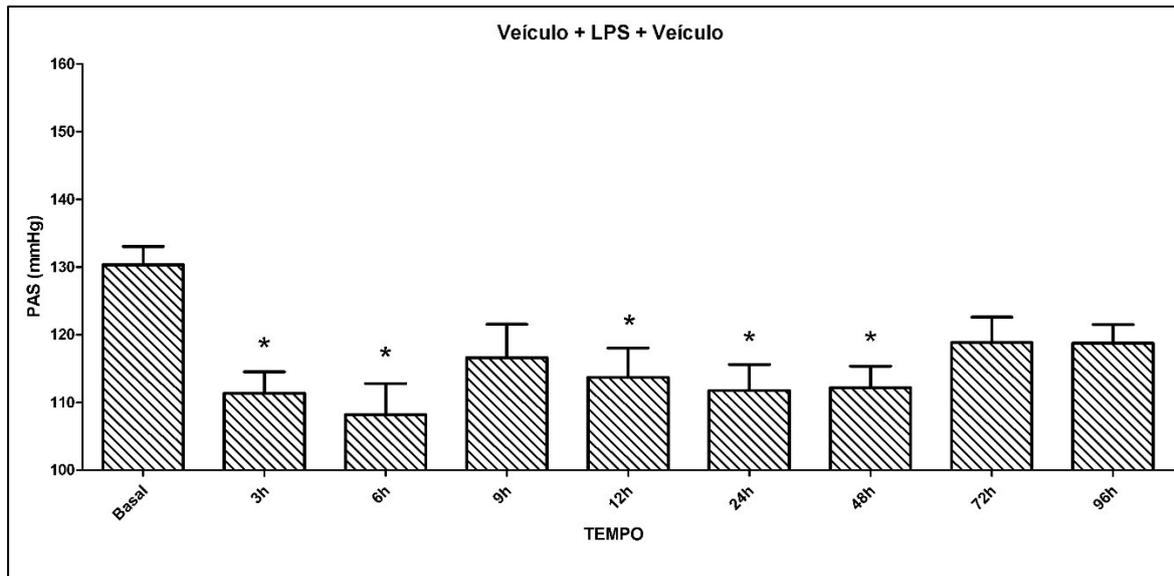
As médias dos valores de PAS em mmHg obtidos de 8 animais do grupo veículo + veículo + veículo estão representadas no gráfico da **FIGURA 9**. Os animais deste grupo receberam tratamento crônico com veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) durante 14 dias. Ao final desse tratamento, tiveram a PAS basal medida imediatamente antes de receberem uma injeção I.P. de veículo (PBS; 1 mL/Kg) e outra injeção de veículo (PBS; 1 mL/Kg; I.P.) após 2 h. É possível observar que a PAS desses animais se manteve semelhante ao longo dos tempos ( $P > 0,05$ ).

**Figura 9: Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via IP com veículo e que receberam por via IP veículo e veículo.** Os animais foram tratados com veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) por 14 dias, e após, foi administrado veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) e novamente veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) ao tempo de 2 h. Em seguida, foram submetidos a medidas de pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda em diferentes tempos. Os animais tiveram as medidas de PAS basal imediatamente antes da primeira administração de PBS após o fim do tratamento. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 8 animais em todos os tempos. ( $P > 0,05$ ; ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



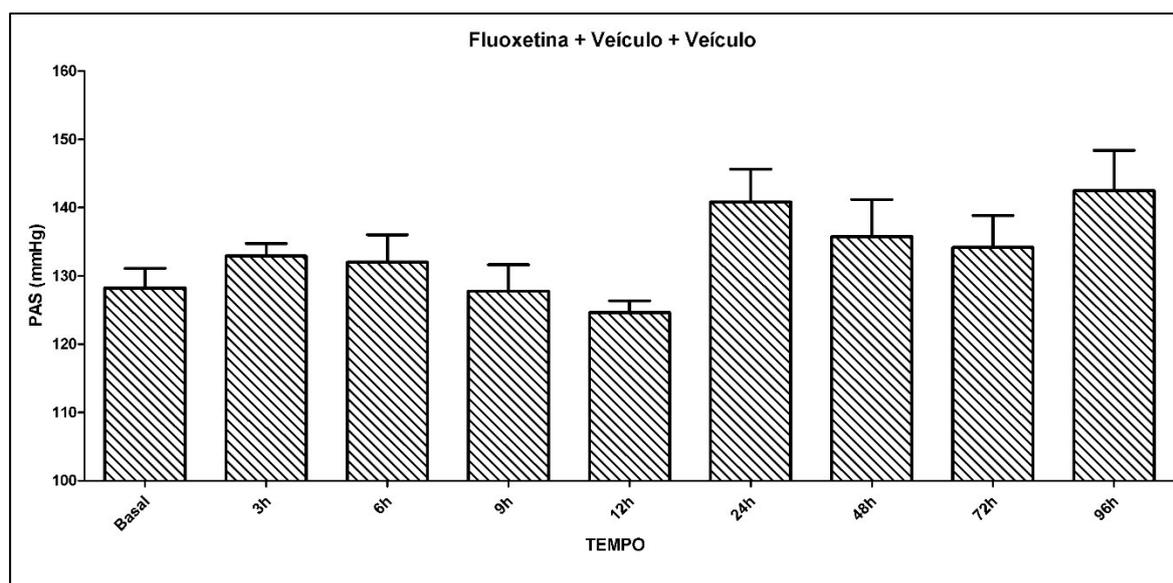
A **FIGURA 10** mostra o gráfico obtido com as médias dos valores de PAS em mmHg obtidos de 8 animais do grupo veículo + LPS + veículo. Esses animais foram tratados durante 14 dias com veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.). No 19º dia tiveram a PAS basal medida e foram submetidos ao LPS (10 mg/Kg, I.P.) para indução da endotoxemia, e em seguida, após 2 h, receberam veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.). Podemos notar que o LPS diminuiu a PAS desses animais significativamente após 3, 6, 12, 24 e 48 h da sua administração. Nos demais tempos, não foram observadas diferenças significativas em relação ao basal.

**Figura 10: Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via IP com veículo e que receberam por via IP LPS e veículo.** Os animais receberam tratamento com veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) por 14 dias, e após isto, foram submetidos à administração de LPS (10 mg/Kg, I.P.) e de veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) depois de 2 h. Foram obtidas medidas de pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda em diferentes tempos. Antes da administração de LPS, foram obtidas as medidas de PAS basal. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 8 animais em todos os tempos. \*  $P < 0,05$  vs. PAS basal (ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



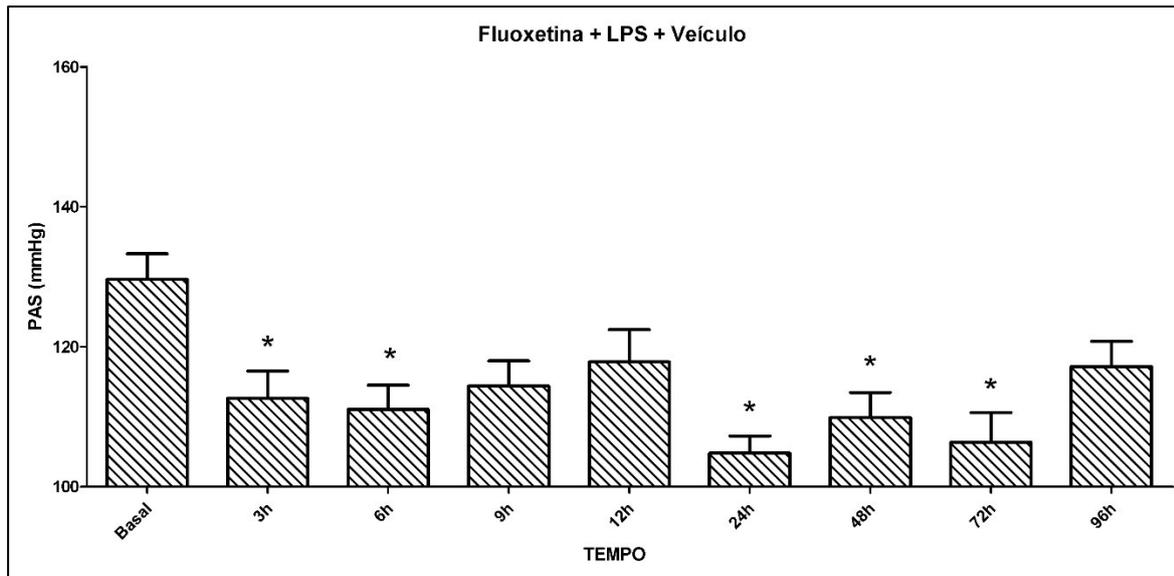
O gráfico representado na **FIGURA 11** foi obtido a partir das médias dos valores de PAS em mmHg de 8 animais do grupo fluoxetina + veículo + veículo. Esses animais passaram pelo tratamento crônico de 14 dias com fluoxetina (10 mg/Kg, I.P.). Ao final do tratamento, a PAS basal foi medida e em seguida, foi administrado veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) e novamente veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) após 2 h. As medidas de PAS dos animais nos diferentes tempos não foram significativamente diferentes entre si ( $P > 0,05$ ).

**Figura 11: Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via IP com fluoxetina e que receberam por via IP veículo e veículo.** Após tratamento por 14 dias com fluoxetina (10 mg/Kg), os animais receberam veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) e depois de 2 h nova administração de veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.). Medidas de pressão arterial sistólica (PAS) foram obtidas por pletismografia de cauda em diferentes tempos. As medidas de PAS basal foram obtidas antes da primeira administração de PBS. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 8 animais em todos os tempos. ( $P > 0,05$ ; ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



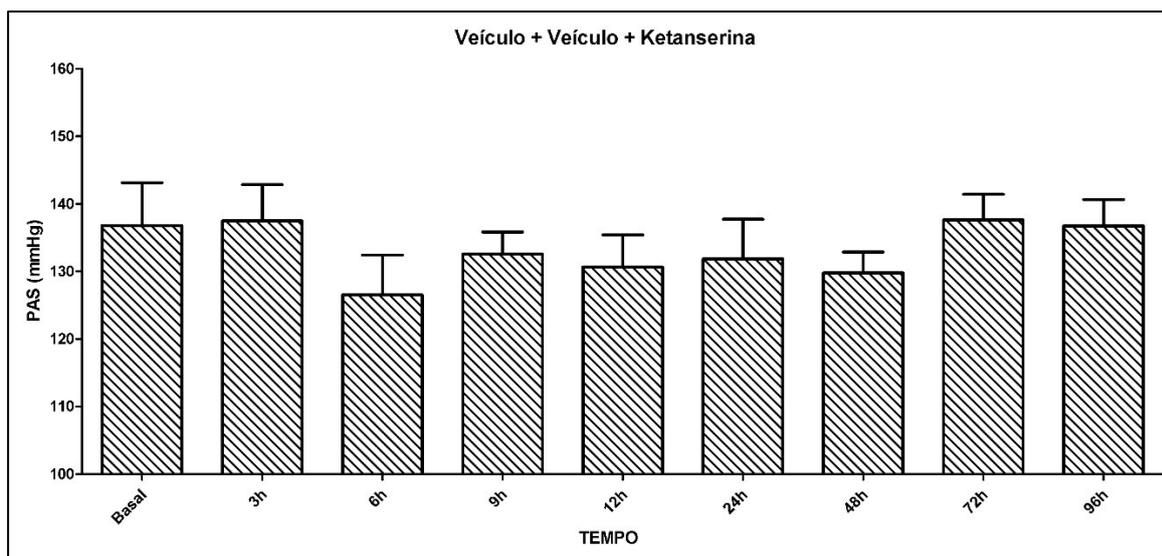
A FIGURA 12 apresenta as médias dos valores de PAS em mmHg obtidas de 8 animais pertencentes ao grupo fluoxetina + LPS + veículo. Esses animais receberam fluoxetina (10 mg/Kg, I.P.) durante 14 dias. No 19º dia a PAS basal foi medida, em seguida os animais foram submetidos ao LPS (10 mg/Kg, I.P.) e após 2 h foi administrado veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.). Podemos observar que o LPS foi capaz de promover uma queda na pressão arterial e que esta foi significativamente diferente da PAS basal nos tempos de 3, 6, 24, 48 e 72 h. É notável que nos demais tempos a pressão arterial ainda está baixa, porém não houve diferença significativa quando comparada com a PAS basal.

**Figura 12: Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via IP com fluoxetina e que receberam por via IP LPS e veículo.** Após receberem tratamento com fluoxetina (10 mg/Kg) durante 14 dias, os animais foram submetidos à administração de LPS (10 mg/Kg, I.P.) seguido de veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) após 2h. Foram obtidas medidas de pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda em diferentes tempos. Imediatamente antes da administração de LPS foram obtidas as medidas de PAS basal. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 8 animais em todos os tempos. \*  $P < 0,05$  vs. PAS basal (ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



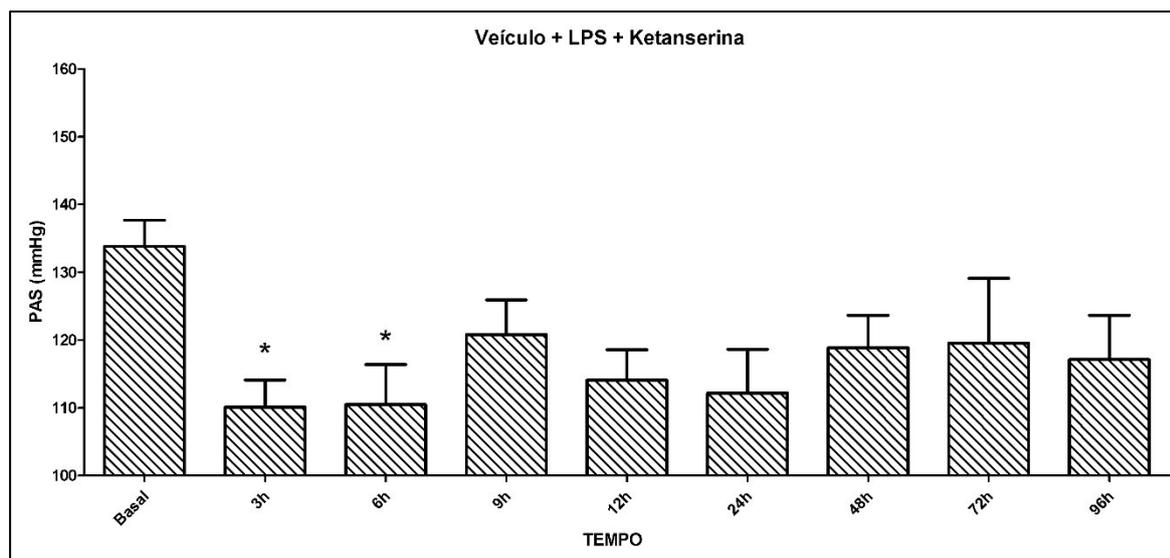
No gráfico representado na **FIGURA 13** encontram-se as médias dos valores de PAS em mmHg obtidas de 8 animais do grupo veículo + veículo + ketanserina. Para o tratamento crônico desses animais foi administrado veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) durante 14 dias. No 19º dia a PAS basal foi medida, seguindo com uma administração de veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) e, após 2 h, ketanserina (5 mg/Kg, I.P.). Podemos notar que a PAS não foi significativamente diferente entre os diferentes tempos ( $P > 0,05$ ).

**Figura 13: Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via IP com veículo e que receberam por via IP veículo e ketanserina.** Os animais receberam veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) como tratamento durante 14 dias, em seguida, foi administrado veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) e após 2 h ketanserina (5 mg/Kg, I.P.). Os animais foram submetidos a medidas de pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda em diferentes tempos, e tiveram as medidas de PAS basal imediatamente antes da administração de PBS. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 8 animais em todos os tempos. ( $P > 0,05$ ; ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



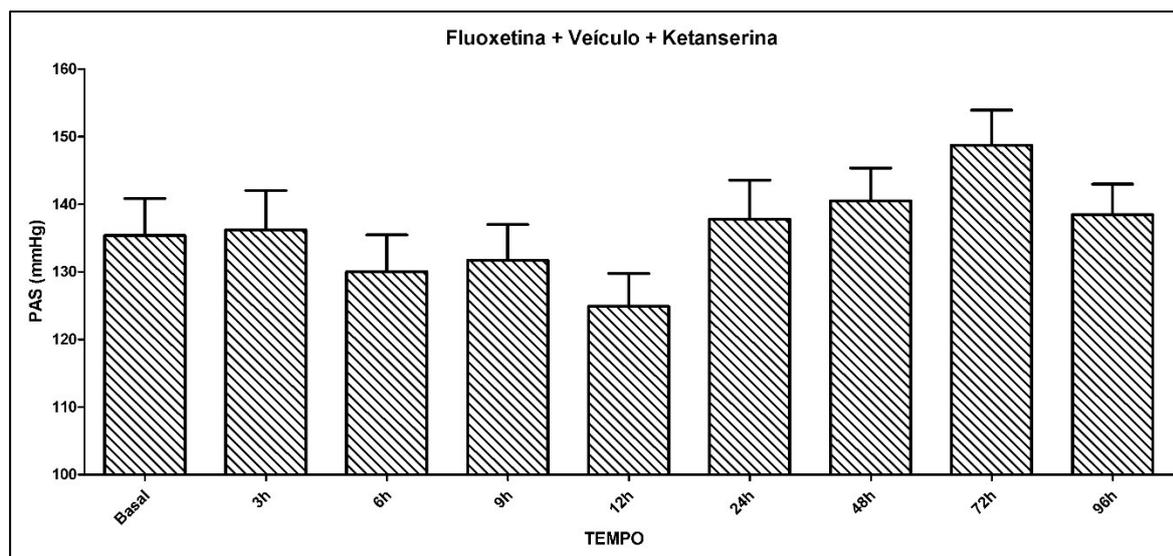
As médias dos valores de PAS em mmHg obtidas de 6 animais do grupo veículo + LPS + ketanserina estão representadas no gráfico da **FIGURA 14**. Esses animais foram tratados cronicamente por 14 dias com veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.), posteriormente a isso, a PAS basal foi medida e logo em seguida, foi realizada indução da endotoxemia com o LPS (10 mg/Kg, I.P.). Após 2 h os animais desse grupo receberam ketanserina (5 mg/Kg, I.P.). Em presença de ketanserina, podemos observar que a queda na PAS induzida por LPS foi observada apenas nos tempos de 3 e 6 h. A partir do tempo de 9 h após LPS, a pressão arterial dos animais não foi significativamente diferente da pressão arterial basal.

**Figura 14: Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via IP com veículo e que receberam por via IP LPS e ketanserina.** Após receberem tratamento com veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) por 14 dias, os animais foram submetidos à administração de LPS (10 mg/Kg, I.P.) e depois de 2 h ketanserina (5 mg/Kg, I.P.). Foram obtidas medidas de pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda em diferentes tempos. Imediatamente antes da administração de LPS foram obtidas as medidas de PAS basal. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 6 animais em todos os tempos. \*  $P < 0,05$  vs. PAS basal (ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



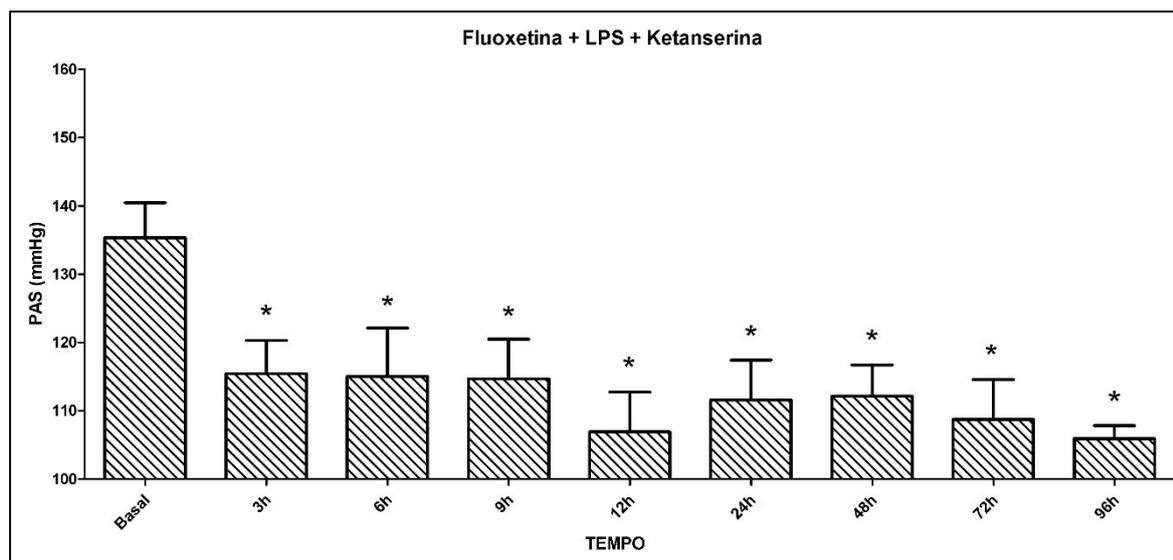
A **FIGURA 15** apresenta as médias dos valores de PAS em mmHg de 8 animais do grupo fluoxetina + veículo + ketanserina. O tratamento crônico para este grupo foi com fluoxetina (10 mg/Kg, I.P.). Após os 14 dias, a PAS basal foi medida e em seguida, foi administrado veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.). Ketanserina (5 mg/Kg, I.P.) foi administrada após 2 h do veículo. Apesar das variações nos níveis de PAS ao longo do tempo, não observamos diferenças significativas entre elas ( $P > 0,05$ ).

**Figura 15: Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via IP com fluoxetina e que receberam por via IP veículo e ketanserina.** Após tratamento por 14 dias com fluoxetina (10 mg/Kg), os animais receberam veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) e em seguida, ketanserina (5 mg/Kg, I.P.) após 2 h. Medidas de pressão arterial sistólica (PAS) foram obtidas por pletismografia de cauda em diferentes tempos. As medidas de PAS basal foram obtidas antes da administração de PBS. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 8 animais em todos os tempos. ( $P > 0,05$ ; ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



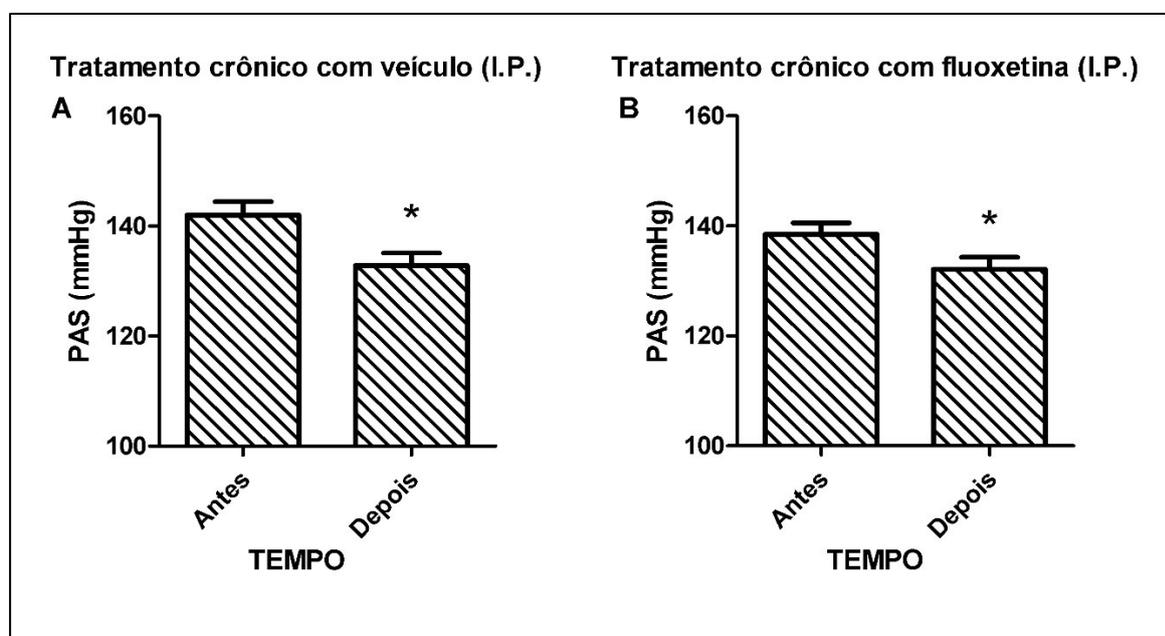
O gráfico mostrado na **FIGURA 16** representa as médias dos valores de PAS em mmHg obtidas de 8 animais pertencentes ao grupo fluoxetina + LPS + ketanserina. Fluoxetina (10 mg/Kg, I.P.) foi administrada para esses animais durante 14 dias. No 19º dia a PAS basal foi medida, e imediatamente após, os animais foram submetidos ao LPS (10 mg/Kg, I.P.). Foi administrada ketanserina (5 mg/Kg, I.P.) depois de 2 h. É possível perceber que, sob essas condições experimentais, o LPS induziu uma queda acentuada na pressão arterial e que se manteve significativamente reduzida em relação à pressão arterial basal em todos os tempos observados.

**Figura 16: Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via IP com fluoxetina e que receberam por via IP LPS e ketanserina.** Os animais foram tratados com fluoxetina (10 mg/Kg) durante 14 dias, após isto, foram submetidos à administração de LPS (10 mg/Kg, I.P.) e de ketanserina (5 mg/Kg, I.P.) 2 h depois. Foram obtidas medidas de pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda em diferentes tempos. Antes da administração de LPS, foram obtidas as medidas de PAS basal. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 8 animais em todos os tempos. \*  $P < 0,05$  vs. PAS basal (ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



A **FIGURA 17** apresenta os gráficos das medidas de PAS obtidas antes e após o tratamento crônico com veículo (A) e fluoxetina (B) por via intraperitoneal. A PAS foi medida no 4º e 19º dias do protocolo experimental, ou seja, um dia antes e um dia depois do tratamento com fluoxetina (10 mg/Kg) ou veículo (PBS; 1 mL/Kg) por via intraperitoneal durante 14 dias. Podemos observar que ambos os tratamentos por via intraperitoneal durante 14 dias diminuíram a PAS dos animais.

**Figura 17: Pressão arterial sistólica de ratos antes e depois do tratamento crônico por via intraperitoneal com veículo (A) e fluoxetina (B).** Foram obtidas medidas de pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda um dia antes e um dia após o tratamento com fluoxetina (10 mg/Kg) ou veículo (PBS; 1 mL/Kg) por via intraperitoneal durante 14 dias. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 32 animais em ambos os tempos. \*  $P < 0,05$  vs. PAS antes (teste t de Student)



### 4.3. Dosagens plasmáticas

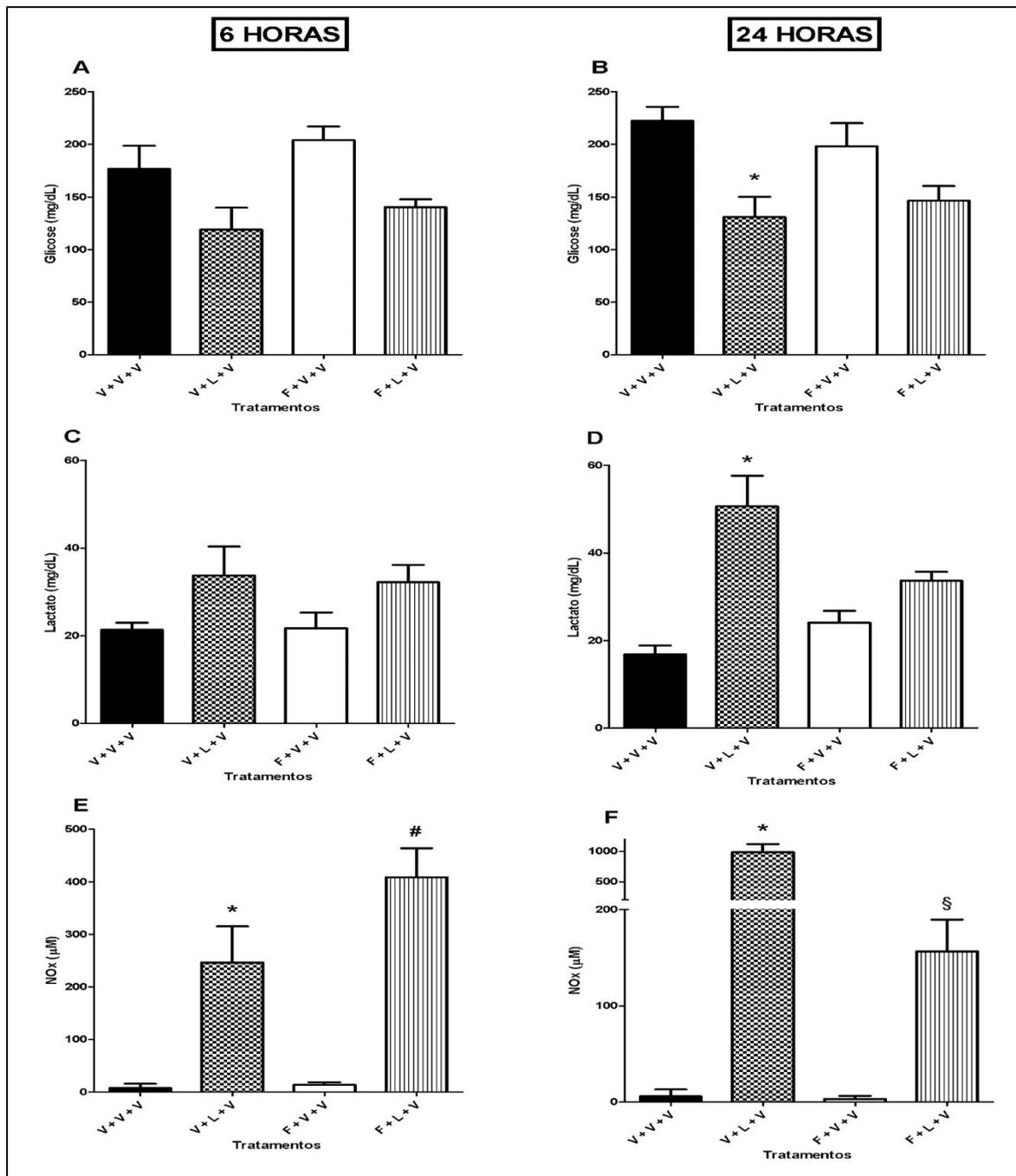
Os animais destinados ao protocolo experimental das dosagens plasmáticas, foram tratados durante 14 dias com veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) ou com fluoxetina (10 mg/Kg, I.P.) e no 15º dia foram submetidos ao LPS (10 mg/Kg, I.P.) para indução da endotoxemia, ou ao veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) como controle. Após 6 ou 24 h foi então realizada a coleta das amostras sanguíneas.

Nas figuras 18A e 18B estão expressos os valores de glicose obtidos das amostras sanguíneas dos animais nos tempos de 6 e 24 h, respectivamente. Podemos observar que o LPS causou uma diminuição significativa nos níveis glicêmicos apenas no tempo de 24 h para aqueles animais tratados cronicamente com veículo. Os níveis de glicose não foram alterados pelo tratamento com a fluoxetina.

Nas figuras 18C e 18D estão expressos os valores de lactato obtidos das amostras sanguíneas dos animais nos tempos de 6 e 24 h, respectivamente. É possível observar que a administração de LPS promoveu um aumento significativo nos valores de lactato apenas no tempo de 24 h para os animais que receberam tratamento com veículo, mas não para os animais que receberam tratamento com fluoxetina.

Nas figuras 18E e 18F estão expressos os valores de NOx obtidos das amostras sanguíneas dos animais nos tempos de 6 e 24 h, respectivamente. Podemos perceber que os animais submetidos ao LPS apresentaram um aumento significativo nos valores de NOx em ambos os tempos. O tratamento com a fluoxetina foi capaz de evitar esse aumento do NOx no tempo de 24 h após o LPS, porém não em 6 h.

**Figura 18: Dosagens plasmáticas de glicose (A e B), lactato (C e D) e NOx (E e F) após 6 e 24 horas da administração de LPS ou PBS em animais tratados cronicamente com fluoxetina ou PBS.** Os animais foram tratados com veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) ou fluoxetina (10 mg/Kg) durante 14 dias, após isto, foram submetidos à administração de veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) ou LPS (10 mg/Kg, I.P.) e depois de 2 h todos receberam veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.). As amostras sanguíneas foram coletadas 6 h (A, C e E) ou 24 h (B, D e F) após LPS ou PBS. As barras representam a média  $\pm$  EPM de amostras de diferentes animais. \*  $P < 0,05$  vs. grupo tratado com veículo e que recebeu veículo e veículo (ANOVA de duas vias, seguido de pós-teste de Bonferroni). #  $P < 0,05$  vs. grupo tratado com fluoxetina e que recebeu veículo e veículo (ANOVA de duas vias, seguido de pós-teste de Bonferroni). §  $P < 0,05$  vs. grupo tratado com veículo e que recebeu LPS e veículo (ANOVA de duas vias, seguido de pós-teste de Bonferroni).

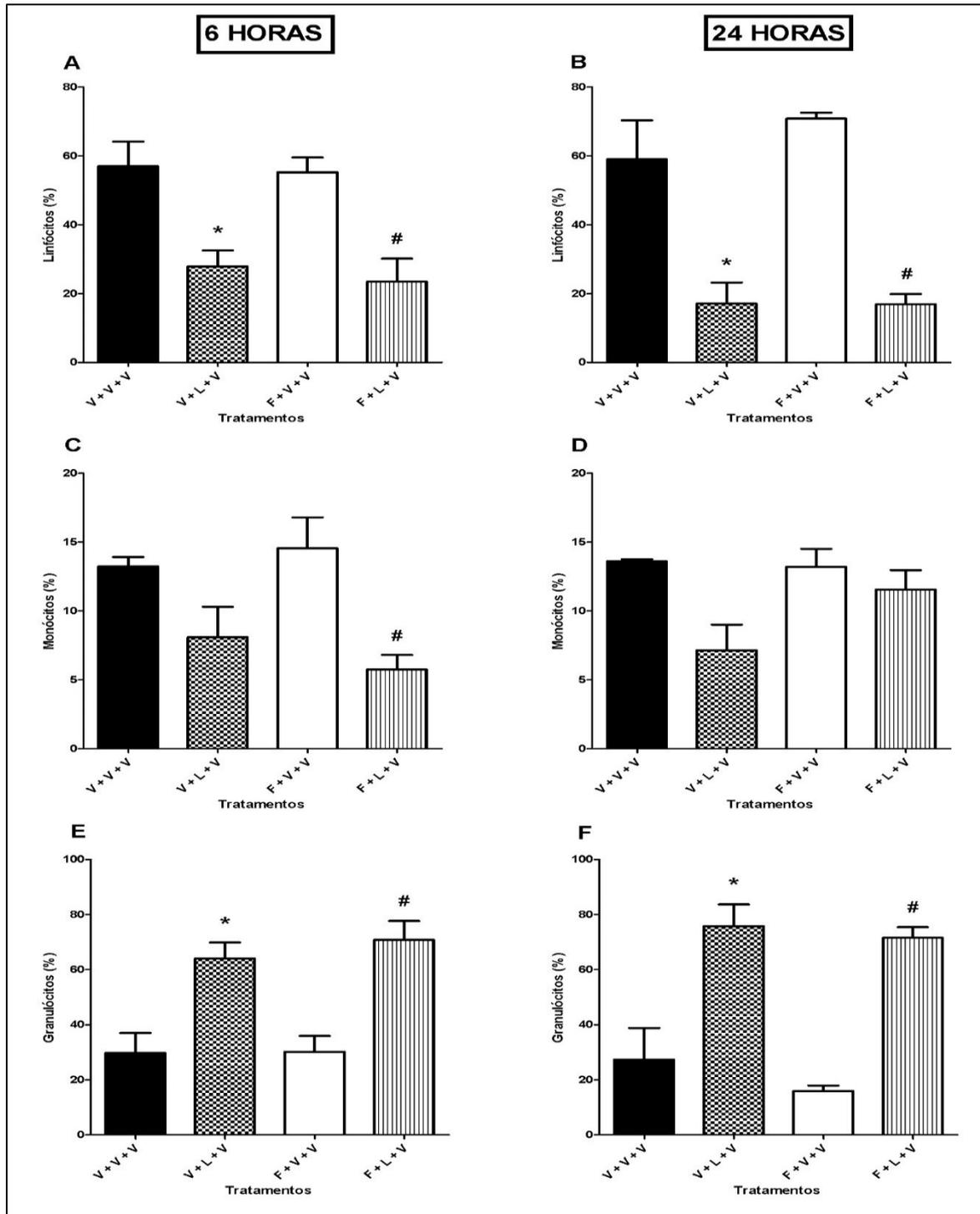


Nas figuras 19A e 19B estão expressos os valores de linfócitos, obtidos das amostras sanguíneas dos animais nos tempos de 6 e 24 h, respectivamente. Podemos observar que os animais endotoxêmicos tratados com veículo ou com fluoxetina, apresentaram uma queda significativa na contagem de linfócitos tanto após 6 h como após 24 h da administração do LPS. Além disso, podemos também observar que o tratamento com fluoxetina não alterou esses resultados.

Nas figuras 19C e 19D estão expressos os valores de monócitos obtidos das amostras sanguíneas dos animais nos tempos de 6 e 24 h, respectivamente. Podemos observar que a fluoxetina foi capaz de induzir uma diminuição significativa na contagem de monócitos nas amostras coletadas 6 h após a indução da endotoxemia.

Nas figuras 19E e 19F estão expressos os valores de obtidos das amostras sanguíneas dos animais nos tempos de 6 e 24 h, respectivamente. Os dados mostram que o LPS foi capaz de provocar um aumento significante na contagem de granulócitos, tanto na coleta de 6 h quanto na coleta de 24 h, porém os tratamentos com veículo e fluoxetina não apresentaram diferenças entre si, ou seja, o tratamento crônico com fluoxetina não causou uma diferença significante.

**Figura 19: Hemograma realizado após 6 e 24 horas da administração de LPS ou PBS em animais tratados cronicamente com fluoxetina ou PBS.** Durante 14 dias os animais foram tratados com veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) ou fluoxetina (10 mg/Kg), em seguida foram submetidos à administração de veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) ou LPS (10 mg/Kg, I.P.), e após 2 h todos receberam veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.). As amostras sanguíneas foram coletadas 6 h (A, C e E) ou 24 h (B, D e F) após LPS ou PBS. As barras representam a média  $\pm$  EPM de amostras de diferentes animais. \*  $P < 0,05$  vs. grupo tratado com veículo e que recebeu veículo e veículo (ANOVA de duas vias, seguido de pós-teste de Bonferroni). #  $P < 0,05$  vs. grupo tratado com fluoxetina e que recebeu veículo e veículo (ANOVA de duas vias, seguido de pós-teste de Bonferroni).



## 5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos em nosso estudo corroboram a nossa hipótese de que a 5-HT está envolvida na hipotensão durante a sepse.

A 5-HT é uma monoamina descrita inicialmente como vasoconstritora (ERSPAMER e ASERO, 1952; RAPPORT, GREEN e PAGE, 1948). De fato, a 5-HT é capaz de contrair artérias e veias, sendo que o receptor 5-HT<sub>2A</sub> é o que parece mais estar envolvido para desencadear esses efeitos (para revisão: WATTS *et al.*, 2012). No entanto, com tantos subtipos de receptores, não é surpreendente que ela também seja capaz de induzir relaxamento em alguns leitos vasculares, como a veia cava de suínos (TREVETHICK; FENIUK; HUMPHREY, 1984). A 5-HT, quando administrada cronicamente em ratos, induz uma diminuição nos níveis pressóricos (DIAZ *et al.*, 2008; DAVIS *et al.*, 2013) sendo que esses efeitos são mediados por ativação dos receptores 5-HT<sub>7</sub> (SEITZ *et al.*, 2017; SEITZ *et al.*, 2019) e parecem ser mediados por óxido nítrico, visto que, quando administrado um inibidor da síntese de NO, não foi observada queda na pressão arterial dos ratos tratados com 5-HT (DIAZ *et al.*, 2008).

Da mesma maneira, poderíamos esperar que drogas que induzem um aumento nos níveis de 5-HT, como os antidepressivos ISRS, causassem uma queda na pressão arterial de ratos. No entanto, esse não foi o observado em nossos resultados, visto que uma queda similar na PAS de ratos foi observada após tratamento crônico por 14 dias com fluoxetina ou seu veículo quando administrados tanto por via oral (Figura 8) como por via intraperitoneal (Figura 17). Resultados semelhantes mostrando que a fluoxetina não altera a pressão arterial de ratos foram obtidos por Pereira *et al.* (2017). Por outro lado, existem estudos que demonstram que o tratamento com fluoxetina aumenta a pressão arterial média de ratos (CRESTANI *et al.*, 2011; SIMPLICIO *et al.*, 2015; HONG *et al.*, 2017), enquanto outros estudos demonstram que ela diminui a pressão arterial de ratos hipertensos (FULLER *et al.*, 1979).

O efeito controverso da fluoxetina na pressão arterial pode ser decorrente de diferenças metodológicas, relacionadas ao tempo de tratamento, à via de administração da fluoxetina ou quanto ao método de medida da pressão arterial. Enquanto nossos animais foram tratados por 14 dias com fluoxetina ou veículo, na literatura encontramos tratamentos de 21 dias (CRESTANI *et al.*, 2011; SIMPLICIO *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.* 2017) e de 14 semanas (HONG *et al.*, 2017). Em nosso trabalho, a administração por via oral da fluoxetina foi realizada com essa sendo misturada com creme de avelã enquanto em alguns trabalhos citados acima, a administração de fluoxetina foi feita por via oral na água de beber (PEREIRA *et al.* 2017) ou ainda de forma subcutânea (FULLER *et al.*, 1979). Alguns estudos além do nosso também

administraram fluoxetina por via intraperitoneal (FULLER *et al.*, 1979; CRESTANI *et al.*, 2011; SIMPLICIO *et al.*, 2015). Além do mais, as medidas de PAS do presente trabalho foram obtidas por pletismografia de cauda, ou seja, de forma indireta e não invasiva, assim como o estudo de Simplicio *et al.* (2015). Porém, alguns estudos realizaram as medidas de forma direta e invasiva, com interferência de anestésicos (CRESTANI *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.* 2017; HONG *et al.*, 2017). Apesar dessas diferenças descritas, devemos destacar uma semelhança: a dose de fluoxetina (10 mg/kg/dia) foi a mesma em todos os trabalhos citados. A dose utilizada foi determinada com base em estudos de tratamento crônico com fluoxetina encontrados na literatura (LINO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Se a contração vascular induzida por 5-HT é principalmente mediada por ativação de receptores 5-HT<sub>2A</sub> (para revisão: WATTS *et al.*, 2012), poderíamos esperar que a administração de um antagonista de receptores 5-HT<sub>2</sub> pudesse diminuir a pressão arterial de ratos. No entanto, observamos que a administração de ketanserina, um antagonista de receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub>, não causou efeito na pressão arterial de ratos (**FIGURA 13**). Apesar de alguns estudos mostrarem efeitos hipotensores pela ketanserina (HEDNER; PERSSON; BERGLUND, 1983; DONNELLY *et al.*, 1987), esses efeitos parecem estar associados ao bloqueio de receptores alfa-adrenérgicos e não ao bloqueio de receptores da 5-HT (COHEN; FULLER; KURZ, 1983; BOLT; SAXENA, 1985).

Os receptores 5-HT<sub>2A</sub> são encontrados também em plaquetas e regulam a agregação plaquetária (CERRITO *et al.*, 1993). O tratamento com antagonistas de receptores 5-HT<sub>2A</sub> diminui a agregação plaquetária em pacientes com derrame isquêmico (UCHIYAMA *et al.*, 2007) e em cachorros endotoxêmicos (MEULEMAN *et al.*, 1983). Alguns estudos associam o efeito hipotensor da ketanserina ao seu efeito anti-agregante plaquetário (EGAN *et al.*, 1988; AMSTEIN *et al.*, 1989). Tanto a agregação plaquetária quanto a hipotensão são fenômenos observados na sepse.

A sepse é uma disfunção orgânica decorrente de uma resposta imune exacerbada e desregulada a uma infecção, com graves complicações e de difícil tratamento, sendo uma das principais causas de morte nas UTIs, gerando custos altos para os sistemas de saúde em todo o mundo. (VINCENT e ABRAHAM, 2006; TANIGUCHI *et al.*, 2014; VERDONK; BLET; MEBAZAA, 2017; POLL *et al.*, 2017). De modo interessante, as plaquetas são o maior estoque periférico de 5-HT (SNEDDON, 1969; DIAZ *et al.*, 2008), e em situações como a sepse em que há aumento de agregação plaquetária (COKER *et al.*, 1983; YAGUCHI *et al.*, 2004; LEVI, 2008; BOECHAT *et al.*, 2012), há também um aumento dos níveis plasmáticos de 5-HT (LI *et al.*, 2016).

A endotoxemia induzida pela administração I.P. de lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS) está associada a uma hipotensão como aquela observada em modelos de sepse. De fato, o uso do LPS foi eficaz em causar hipotensão nos animais de nosso estudo (**FIGURAS 5 E 10**). Nota-se que a queda na PAS medida 3 h após o LPS nos animais que haviam sido tratados cronicamente com veículo (e não com fluoxetina) por V.O. ou por via I.P. foi de 18 mmHg e de 19 mmHg, respectivamente. Estes resultados são corroborados por estudos prévios de nosso laboratório, em que observamos uma queda da PAS de 16 mmHg após o LPS (CARIOLETTI, 2015). Dados semelhantes demonstrando hipotensão em ratos após administração de LPS podem ser encontrados também na literatura (LEE *et al.*, 2002; GONÇALVES *et al.*, 2014; GUARIDO *et al.*, 2014; ROUL *et al.*, 2015), validando este modelo experimental como sendo efetivo em produzir os sinais e sintomas de nosso interesse, sendo principalmente a diminuição da pressão arterial. Além disso, estes resultados também confirmam a reprodutibilidade do método escolhido, pois mesmo sendo realizados em momentos diferentes, e diferindo o manuseio prévio às medidas, a queda na PAS observada foi semelhante.

Além da pressão arterial sistólica, também avaliamos outros parâmetros, a partir da coleta de amostras sanguíneas, sendo eles: glicose, lactato, NOx e hemograma. Observamos que o LPS foi eficaz em causar hiperlactatemia 24 h após LPS (**FIGURA 18 C e D**). O lactato é um importante parâmetro que indica hipóxia tecidual e, quando aumentado, é um dos critérios utilizados para diagnóstico do choque séptico (LEVY, 2006; SINGER *et al.*, 2016; SEYMOUR *et al.*, 2016). Na literatura podemos encontrar dados que, como os nossos, mostram um aumento de lactato em ratos tratados com LPS (ROUL *et al.*, 2015).

Observamos também que os animais endotoxêmicos apresentaram hipoglicemia depois de 24 h da administração de LPS (**FIGURA 18 A e B**). Dados da literatura mostram hipoglicemia em ratos machos e fêmeas após 6 e 24 h da indução da endotoxemia com LPS (GONÇALVES *et al.*, 2014). Distúrbios no metabolismo da glicose são observados na sepse, associados à disfunção orgânica. Na fase inicial da doença, ou fase hiperdinâmica, observa-se uma hiperglicemia, porém, com sua progressão e agravamento, ocorre vasodilatação periférica e queda de pressão arterial, com conseqüente hipoperfusão tecidual e hipoglicemia, resultando na fase hipodinâmica do choque séptico (MILLER *et al.*, 1980; MAITRA; WOJNAR; LANG, 2000; BENEDET *et al.*, 2018).

A quantificação de NO plasmático é considerada também, assim como a PAS, uma medida para confirmação da efetividade do tratamento com LPS em induzir a endotoxemia. Observamos um aumento significativo na dosagem de NOx após 6 h, e um aumento ainda mais robusto após 24 h (**FIGURA 18 E e F**). Uma produção exacerbada de NO é observada na sepse,

mediada pela iNOS (isoforma induzível da óxido nítrico sintase), desempenhando papel destrutivo aos patógenos, mas também, causando vasodilatação excessiva e hiporreatividade vascular a vasoconstritores (KILBOURN *et al.*, 1990; SCHAEFFER *et al.*, 1990; KUHL; ROSEN, 1998; ALDERTON, COOPER e KNOWLES, 2001; ASSREUY, 2006; FERNANDES *et al.*, 2008). Dados da literatura demonstram que o LPS é capaz de induzir um aumento da produção de NO após 6 e 24 h da sua administração (GONÇALVES *et al.*, 2014; GUARIDO *et al.*, 2014).

Ao analisarmos as contagens celulares a partir do hemograma, podemos observar que o LPS provocou linfocitopenia e granulocitose nas coletas de 6 e 24 h (**FIGURA 19**). Na sepse é observada uma linfocitopenia, diminuição de linfócitos, a qual contribui para a imunossupressão. Também é observado um aumento na contagem de granulócitos na circulação sanguínea, visto que estes, em especial os neutrófilos, representam a primeira linha de defesa do organismo contra os patógenos (DUNN, 1987; DELANO *et al.*, 2011; PABLO *et al.*, 2014). Dados da literatura mostram que em ratos machos e fêmeas, há uma diminuição na contagem de linfócitos, aumento na contagem de granulócitos e diminuição na contagem de monócitos, em ambos os tempos de coleta, 6 e 24 h pós LPS (GONÇALVES *et al.*, 2014).

De modo geral, corroborando com dados da literatura conforme descrito acima, o modelo experimental empregado em nosso estudo apresentou aumento de NO, hiperlactatemia, hipoglicemia, linfocitopenia e granulocitose, mimetizando assim, o que é observado no choque séptico. Desta forma prosseguimos nosso estudo para testar nossa hipótese. A queda na PAS dos animais que receberam LPS foi mais pronunciada nos animais que receberam tratamento crônico com fluoxetina independentemente da via de administração (**FIGURAS 7 e 12**). O tratamento crônico com a fluoxetina prolongou a hipotensão, em relação aos animais tratados com veículo.

A fluoxetina inibe a recaptação de 5-HT e, com isso, tende a aumentar seus níveis. Além disso, como já mencionado anteriormente, quando administrada cronicamente em ratos, a 5-HT induz uma diminuição da pressão arterial (DIAZ *et al.*, 2008). Essa diminuição da PA causada pela 5-HT parece estar sendo mediada por receptores 5-HT<sub>7</sub>. A administração de um antagonista de receptores 5-HT<sub>7</sub> previne a diminuição da pressão arterial média de ratos e previne a venodilatação esplênica (SEITZ *et al.*, 2017). Outro estudo do mesmo grupo demonstrou que ratos knockout para receptor 5-HT<sub>7</sub> não apresentam hipotensão com a infusão crônica de 5-HT, confirmando também que essa venodilatação esplênica e queda da pressão arterial média observadas são dependentes da ativação do receptor 5-HT<sub>7</sub> (SEITZ *et al.*, 2019).

A ativação do receptor 5-HT<sub>7</sub> parece desempenhar outros papéis além de ser responsável pela queda na pressão arterial induzida por 5-HT. Dados da literatura demonstram que durante a endotoxemia há uma superexpressão de receptores 5-HT<sub>7</sub>, que previne o prejuízo causado pela resposta inflamatória (CADIRCI *et al.*, 2013; AYZ *et al.*, 2016). Portanto, a ativação desses receptores seria benéfica. Nós observamos uma piora na hipotensão dos ratos endotoxêmicos tratados com fluoxetina, e, a partir desses dados da literatura, poderíamos pensar que uma superexpressão dos receptores 5-HT<sub>7</sub> em conjunto com um aumento dos níveis de 5-HT, causado tanto pela inibição da recaptção de 5-HT, quanto pela exacerbada agregação plaquetária decorrente do processo inflamatório causado pelo LPS (liberando ainda mais 5-HT), resultaria em uma super-ativação desses receptores, contribuindo para o agravamento da hipotensão.

De forma geral, conseguimos reproduzir nossos resultados, utilizando dois métodos diferentes de administração de fluoxetina: oral e intraperitoneal. Em ambos, a fluoxetina prejudicou o reestabelecimento da PAS, prolongando a hipotensão dos ratos endotoxêmicos. Esses dados corroboram nossa hipótese sugerindo que a 5-HT, em elevadas concentrações pelo tratamento com a fluoxetina, estaria contribuindo de alguma forma para essa hipotensão mais prolongada. Entretanto, novos experimentos confirmatórios seriam necessários, principalmente a dosagem sérica dos níveis de 5-HT.

Esperávamos que os animais tratados por V.O. apresentassem piora na queda da PAS em relação aos tratados por via I.P. devido à farmacocinética da fluoxetina. Quando administrada por via oral, a fluoxetina é primeiramente absorvida pelo trato gastrointestinal, sendo metabolizada no fígado à norfluoxetina, um metabólito ativo, para então ocorrer a distribuição sistêmica. Porém, quando administrada por via intraperitoneal, a fluoxetina vai para circulação sistêmica mais rapidamente, sendo transformada em norfluoxetina numa proporção muito menor (FULLER, 1992; CACCIA *et al.*, 1990). O tempo de meia vida da norfluoxetina é superior ao da fluoxetina, 4-16 dias e 4-6 dias, respectivamente (CACCIA *et al.*, 1990; MANDRIOLI; FORTI; RAGGI, 2006). Como não observamos diferenças nos efeitos causados pela fluoxetina entre as vias de administração utilizadas podemos pensar que as concentrações de fluoxetina e de seu metabólito sejam suficientes para induzir os efeitos investigados (pressão arterial) de forma independente da via de administração. Estudos futuros mais aprofundados se fazem necessários para elucidarmos esses resultados, como por exemplo a dosagem de fluoxetina e de seu metabólito, além das dosagens de 5-HT, como já sugerido anteriormente.

O tratamento crônico com fluoxetina previamente ao LPS não mostrou resultados significativos e conclusivos sobre os valores de glicose e lactato, porém, podemos notar que a fluoxetina foi capaz de diminuir significativamente os níveis de NOx após 24 h da administração de LPS (**FIGURA 18**). A fluoxetina não interferiu nas contagens celulares de linfócitos e granulócitos, mas foi capaz de diminuir a quantidade de monócitos na coleta de 6 h (**FIGURA 19**). Alguns estudos avaliaram os efeitos da fluoxetina na resposta inflamatória causada pelo LPS. Foi observado por Liu *et al.* (2011) em experimentos *in vitro*, que a fluoxetina inibiu significativamente a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6) e óxido nítrico (NO). Corroborando com esses achados da literatura, nossos resultados mostram que a fluoxetina foi capaz de inibir a produção exacerbada de NO após 24 h da indução da endotoxemia. Esse dado reforça que outros fatores além do NO contribuem para a hipotensão na sepse, pois mesmo havendo uma diminuição de NO, a PAS ainda se manteve baixa e por um período prolongado. Podemos pensar que um desses fatores é a 5-HT.

Pensando que a fluoxetina aumenta níveis de 5-HT que contribuem para o agravamento dos sintomas cardiovasculares na endotoxemia, o que aconteceria se administrássemos um antagonista de receptores da 5-HT na resposta pressora de animais endotoxêmicos?

Para responder a esta pergunta utilizamos a ketanserina, um antagonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub>. No presente trabalho, a ketanserina foi capaz de abreviar o tempo de duração da hipotensão de animais endotoxêmicos (**FIGURA 14**), corroborando nossa hipótese de que parte da hipotensão na sepse é mediada por 5-HT. Esse antagonista foi utilizado no presente estudo com base em resultados preliminares do nosso laboratório em que observamos que a administração de ketanserina antes da administração de LPS foi capaz de atenuar o quadro de hipotensão desses animais (CARIOLETTI, 2015). Dados da literatura também demonstram que a queda na pressão sistólica de ratos endotoxêmicos tratados com um outro antagonista de receptores 5-HT<sub>2A</sub>, o sarpogrelato, foi menos acentuada do que daqueles ratos que não receberam sarpogrelato (NISHIYAMA, 2009). Esse autor também observou menor taxa de mortalidade em ratos que receberam o antagonista de receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub> antes da endotoxemia. E ainda, um estudo com ratos e camundongos, observou-se que a ketanserina, administrada após o LPS, foi capaz de melhorar o choque endotóxico, diminuindo a mortalidade (LIU *et al.*, 2011).

Como mencionado anteriormente, os efeitos anti-hipertensivos induzidos por ketanserina parecem estar relacionados ao antagonismo de receptores alfa-adrenérgicos e não de receptores para a 5-HT (COHEN; FULLER; KURZ, 1983; BOLT; SAXENA, 1985). No

entanto, a ativação dos receptores 5-HT<sub>2A</sub>, expressos nas plaquetas, é responsável pela agregação plaquetária (CERRITO *et al.*, 1993). Sendo assim, o antagonismo dos receptores 5-HT<sub>2A</sub>, pela ketanserina, poderia estar diminuindo a agregação plaquetária causada pelo LPS, conseqüentemente diminuindo a liberação de mais 5-HT, contribuindo então para o reestabelecimento da PAS. Dados da literatura mostram que o sarpogrelato, antagonista de receptores 5-HT<sub>2A</sub>, foi eficaz em inibir a agregação plaquetária (UCHIYAMA *et al.*, 2007)

Dessa forma, nossos resultados corroboram com dados prévios da literatura que demonstram que o antagonismo de receptores 5-HT<sub>2A</sub> está associado a um efeito cardiovascular benéfico em ratos endotoxêmicos. Esses efeitos benéficos podem colaborar para o reestabelecimento mais rápido da PAS dos ratos endotoxêmicos, sugerindo novamente, um possível envolvimento da 5-HT na hipotensão observada na sepse. Nesse sentido, era esperado que a ketanserina tivesse um efeito cardiovascular benéfico nos ratos endotoxêmicos tratados cronicamente com fluoxetina. Mas, para nossa surpresa, a ketanserina prolongou a hipotensão dos ratos endotoxêmicos tratados cronicamente com fluoxetina (**FIGURA 16**).

Especulamos que este resultado possa ser, novamente, devido a uma super-ativação de receptores 5-HT<sub>7</sub>, por conta de um aumento de 5-HT pela fluoxetina, e este efeito estaria superando o antagonismo de 5-HT<sub>2A</sub> pela ketanserina. Ou então, que a agregação plaquetária está tão exacerbada, também devido ao aumento de 5-HT, que a ketanserina não tenha mais como surtir efeito sobre esses receptores, passando então a interagir com receptores alfa-adrenérgicos, contribuindo para hipotensão.

Este trabalho apresenta resultados a respeito do efeito da fluoxetina sobre a pressão arterial de ratos que foram submetidos à endotoxemia, bem como o uso da ketanserina como forma de tratamento. Mesmo sabendo que se trata de um experimento de ciência básica, com amostragem relativamente pequena, é importante pensarmos no impacto que causaria quando extrapolado a humanos. Então, hipoteticamente, se um paciente que está em uso crônico de fluoxetina entrar em um quadro de sepse, ele poderá apresentar uma piora em seu estado e um prognóstico ruim. É importante ressaltar também que o uso de antidepressivos nos dias atuais é abundante e sua prescrição muitas vezes indiscriminada. Concomitantemente, a incidência de sepse também é crescente e a busca por tratamentos eficazes se faz necessária. Para compreender melhor o possível envolvimento da 5-HT na pressão arterial durante a sepse, outros alvos do sistema serotoninérgico como, por exemplo, outros receptores da 5-HT e suas vias de sinalização podem ser avaliados como novos alvos terapêuticos.

## 6. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

Utilizamos neste trabalho as drogas fluoxetina e ketanserina, ambas diluídas em DMSO (10%). Há algumas controvérsias a respeito da toxicidade do DMSO, mas experimentos prévios realizados em nosso laboratório, bem como outros experimentos encontrados na literatura, utilizaram a mesma concentração para diluição (METZKER, 2015; CARIOLETTI, 2015). Entretanto, um viés observado em nossos experimentos foi o fato de não utilizarmos PBS com DMSO (10%) como veículo nos animais controle. Portanto, futuros experimentos com essa correção seriam muito válidos.

Utilizamos em nosso estudo como tempo de tratamento crônico um período de 14 dias. De acordo com a literatura, a duração de um tratamento crônico é bastante variável (CRESTANI et al., 2011; SIMPLICIO et al., 2015; PEREIRA et al. 2017; HONG et al., 2017), o que pode dificultar a comparação dos resultados. Obtivemos resultados compatíveis com nossa hipótese utilizando essa metodologia de tratamento, mas fica como sugestão para um futuro estudo, o aumento no período de tratamento, e também a utilização de diferentes doses de fluoxetina, para observar se o efeito na queda na PAS seria diferente.

Apresentamos apenas os resultados do tratamento crônico com fluoxetina. Dados de tratamento agudo seriam bastante interessantes para efeitos comparativos de duração de tratamento. Testamos em nosso laboratório o tratamento agudo com fluoxetina, tanto por via oral como por via intraperitoneal. Tendo em vista alguns vieses nesses experimentos, os mesmos não foram conclusivos e se encontram na sessão 9 (apêndice) do presente trabalho. A realização de novos experimentos utilizando essa metodologia de tratamento fica como sugestão para futuros estudos.

Como já dito, utilizamos apenas a fluoxetina e a ketanserina como ISRS e antagonista de receptores da 5-HT, respectivamente. Seria pertinente o uso das mesmas drogas em outras doses e também o uso de outros ISRS e de outros antagonistas de receptores da 5-HT para testar nossa hipótese.

Em nosso estudo não fizemos medidas dos níveis plasmáticos de 5-HT e nem fizemos a contagem de plaquetas, informações que seriam muito úteis, mas que ficam para experimentos futuros.

## 7. CONCLUSÃO

No presente trabalho, observamos que o tratamento prévio de ratos com fluoxetina tanto por via oral, como por via intraperitoneal, prolongou o tempo de queda na pressão arterial sistólica de ratos endotoxêmicos, o que pode contribuir para o agravamento do choque séptico. Além disso, também observamos que a ketanserina administrada após a indução da endotoxemia, abreviou o tempo de hipotensão dos ratos endotoxêmicos

Desta forma, de acordo com nossa hipótese de que a 5-HT está envolvida na hipotensão observada na sepse, o uso crônico de drogas que aumentam os níveis de 5-HT como a fluoxetina, um ISRS, agrava a hipotensão de um sujeito que venha desenvolver um quadro de sepse. Por outro lado, o tratamento agudo com um antagonista de receptores da 5-HT, como a ketanserina, é capaz de atenuar a hipotensão de sujeitos com sepse, desde que estes não tenham feito uso prévio de um ISRS. Os mecanismos envolvidos nesses efeitos e interações merecem estudos mais aprofundados.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYAZ, Gulsen et al. Evaluation of 5-HT<sub>7</sub> Receptor Trafficking on In Vivo and In Vitro Model of Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammatory Cell Injury in Rats and LPS-Treated A549 Cells. **Biochemical Genetics**, [s.l.], v. 55, n. 1, p.34-47, 1 set. 2016. Springer Nature.

AYME-DIETRICH, Estelle et al. Cardiovascular remodeling and the peripheral serotonergic system. **Archives Of Cardiovascular Diseases**, [s.l.], v. 110, n. 1, p.51-59, jan. 2017. Elsevier BV.

AZMITIA, Efrain C. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. **Brain Research Bulletin**, v. 56, n. 5, p.413-424, nov. 2001.

BARAKAT, Ahmed; HAMDY, Mostafa M.; ELBADR, Mohamed M.. Uses of fluoxetine in nociceptive pain management: A literature overview. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 829, p.12-25, jun. 2018. Elsevier BV

BARNES, Nicholas M.; SHARP, Trevor. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, [s.l.], v. 38, n. 8, p.1083-1152, ago. 1999. Elsevier BV.

BENEDET, Patrícia O. et al. The therapeutic value of protein (de)nitrosylation in experimental septic shock. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Basis Of Disease**, [s.l.], v. 1864, n. 1, p.307-316, jan. 2018. Elsevier BV.

BIANCA, R D'emmanuele di Villa et al. Dexamethasone improves vascular hyporeactivity induced by LPS in vivo by modulating ATP-sensitive potassium channels activity. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 140, n. 1, p.91-96, set. 2003. Wiley.

BRENNER, B. et al. Plasma serotonin levels and the platelet serotonin transporter. **Journal of Neurochemistry**, v. 102, n. 1, p. 206–15, 2007.

BRYAN, N. S. e GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, n. 5, p. 645–57, 2007.

BOLT, G R; SAXENA, P R. Cardiovascular profile and hypotensive mechanism of ketanserin in the rabbit. **Hypertension**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.499-506, jul. 1985. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

BURAS, Jon A.; HOLZMANN, Bernhard; SITKOVSKY, Michail. Animal Models of sepsis: setting the stage. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 4, n. 10, p.854-865, out. 2005. Springer Nature.

CACCIA, S. et al. Influence of dose and route of administration on the kinetics of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in the rat. **Psychopharmacology**, [s.l.], v. 100, n. 4, p.509-514, abr. 1990. Springer Science and Business Media LLC.

CADIRCI, Elif et al. Peripheral 5-HT<sub>7</sub> receptors as a new target for prevention of lung injury and mortality in septic rats. **Immunobiology**, [s.l.], v. 218, n. 10, p.1271-1283, out. 2013. Elsevier BV.

CARIOLETTI, Giovana Hartmann. **A serotonina contribui para hipotensão e alterações da reatividade venosa no choque endotóxico**. 2015. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

CERRITO, E. et al. 5HT<sub>2</sub>-receptors and serotonin release: Their role in human platelet aggregation. **Life Sciences**, [s.l.], v. 53, n. 3, p.209-215, jan. 1993. Elsevier BV.

CINEL, Ismail; OPAL, Steven M. Molecular biology of inflammation and sepsis: A primer\*. **Critical Care Medicine**, [s.l.], v. 37, n. 1, p.291-304, jan. 2009. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

COKER, S. J. et al. The release of prostanoids during the acute pulmonary response to E. coli endotoxin in anaesthetized cats. **British Journal of Pharmacology**, v. 78, n. 3, p. 561–570, 1983.

CRESTANI, Carlos C. et al. Chronic fluoxetine treatment alters cardiovascular functions in unanesthetized rats. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 670, n. 2-3, p.527-533, nov. 2011. Elsevier BV.

DAVIS, R. P. et al. 5-hydroxytryptamine (5-HT) reduces total peripheral resistance during chronic infusion: direct arterial mesenteric relaxation is not involved. **BMC Pharmacology**, v. 12, n. 1, p. 4, 2012.

DAVIS, R. P. et al. One-month serotonin infusion results in a prolonged fall in blood pressure in the deoxycorticosterone acetate (DOCA) salt hypertensive rat. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 4, n. 1, p. 141–8, 2013.

DELANO. M. J., KELLY-SCUMPIA, K. M., THAYER, T. C, et al. Neutrophil mobilization from the bone marrow during polymicrobial sepsis is dependent on CXCL12 signaling. **J Immunol**, v. 187, n. 2, p. 911-8, Jul 2011.

DIAZ, J. et al. 5-Hydroxytryptamine Lowers Blood Pressure in Normotensive and Hypertensive Rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 325, n. 3, p. 1031–8, 2008.

DONNELLY, R et al. Acute and chronic ketanserin in essential hypertension: antihypertensive mechanisms and pharmacokinetics.. **British Journal Of Clinical Pharmacology**, [s.l.], v. 24, n. 5, p.599-606, nov. 1987.

DUNN, David L. Antibody Immunotherapy of Gram-negative Bacterial Sepsis. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.31-35, 4 mar. 1987.

EGAN, B. et al. Effects of Ketanserin on Blood Pressure and Platelet Aggregation in Elderly Men with Mild Hypertension. **American Journal Of Hypertension**, [s.l.], v. 1, n. 33, p.324-330, 1 jul. 1988. Oxford University Press (OUP).

ERICKSON, J. D.; EIDEN, L. E.; HOFFMAN, B. J.. Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 89, n. 22, p.10993-10997, 15 nov. 1992. Proceedings of the National Academy of Sciences.

ERSPAMER, V. e ASERO, B. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. **Nature**, v. 169, n. 4306, p. 800–1, 1952.

FETKOVSKA, N. et al. 5-Hydroxytryptamine kinetics and activation of blood platelets in patients with essential hypertension. **Hypertension**, v. 15, n. 3, p. 267–273, 1990.

FULLER, Ray W. et al. Antihypertensive effects of fluoxetine and L-5-hydroxytryptophan in rats. **Life Sciences**, [s.l.], v. 25, n. 14, p.1237-1242, out. 1979. Elsevier BV.

FULLER, R. Comparison of norfluoxetine enantiomers as serotonin uptake inhibitors in vivo. **Neuropharmacology**, [s.l.], v. 31, n. 10, p.997-1000, out. 1992. Elsevier BV.

FULLER, Ray W.. Uptake inhibitors increase extracellular serotonin concentration measured by brain microdialysis. **Life Sciences**, [s.l.], v. 55, n. 3, p.163-167, jan. 1994. Elsevier BV.

GONÇALVES, Ronald P.m. et al. Gender-Specific Differences in the In Situ Cardiac Function of Endotoxemic Rats Detected by Pressure-Volume Catheter. **Shock**, [s.l.], v. 42, n. 5, p.415-423, nov. 2014. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

GOTTS, Jeffrey e; A MATTHAY, Michael. Sepsis: pathophysiology and clinical management. **Bmj**, [s.l.], p.1-20, 23 maio 2016. BMJ.

GUARIDO, Karla L. et al. Increased Activation of the Rho-A/Rho-Kinase Pathway in the Renal Vascular System Is Responsible for the Enhanced Reactivity to Exogenous Vasopressin in Endotoxemic Rats\*. **Critical Care Medicine**, [s.l.], v. 42, n. 6, p.461-471, jun. 2014. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

GUYTON, A. C. Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. **Science**, v. 252, n. 5014, p. 1813–6, 1991.

HEDNER, T.; PERSSON, B.; BERGLUND, G.. Ketanserin, a novel 5-hydroxytryptamine antagonist: monotherapy in essential hypertension.. **British Journal Of Clinical Pharmacology**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.121-125, ago. 1983. Wiley.

HONG, Ling-zong et al. Chronic fluoxetine treatment enhances sympathetic activities associated with abnormality of baroreflex function in conscious normal rats. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 811, p.164-170, set. 2017. Elsevier BV.

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.

JACOBS, B. L. e AZMITIA, E. C. Structure and function of the brain serotonin system. **Physiological Reviews**, v. 72, n. 1, p. 165–229, 1992.

KUHN, Donald M.. Tryptophan Hydroxylase Regulation Drug-Induced Modifications that Alter Serotonin Neuronal Function. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, [s.l.], p.19-27, 1999.

KUHL SJ, ROSEN H. Nitric oxide and septic shock. From bench to bedside. **West J Med**. 1998;168(3):176–181.

LAGU, Tara et al. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. **Critical Care Medicine**, [s.l.], v. 40, n. 3, p.754-761, mar. 2012. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

LAZARTIGUES, E. et al. Fluoxetine-induced pressor response in freely moving rats: a role for vasopressin and sympathetic tone. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 14, n. 5, p. 443–51, 2000.

LEE, Ru Ping et al. Physiological and Chemical Indicators for Early and Late Stages of Sepsis in Conscious Rats. **Journal Of Biomedical Science**, [s.l.], v. 9, n. 6, p.613-621, 2002. Springer Nature.

LEE, Kyoung-uk et al. Antidepressant-Induced Sexual Dysfunction among Newer Antidepressants in a Naturalistic Setting. **Psychiatry Investigation**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.55-59, 2010. Korean Neuropsychiatric Association.

LEVI, M. The coagulant response in sepsis. **Clinics in chest medicine**, v. 29, n. 4, p. 627–42, 2008.

LEVY, Bruno. Lactate and shock state: the metabolic view. **Current Opinion In Critical Care**, [s.l.], v. 12, n. 4, p.315-321, ago. 2006. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health)

LI, Yicong et al. Sepsis-induced elevation in plasma serotonin facilitates endothelial hyperpermeability. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-13, 9 mar. 2016. Springer Science and Business Media LLC.

LINDER, A. E. et al. Serotonin receptors in rat jugular vein: presence and involvement in the contraction. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 334, n. 1, p. 116–23, 2010.

LINO-DE-OLIVEIRA, C., Sales, A.J., Del Bel, E.A., Silveira, M.C., Guimaraes, F.S., 2001. Effects of acute and chronic fluoxetine treatments on restraint stress-induced Fos expression. **Brain Res. Bull.** 55, 747–754.

LIU, Chong et al. Effects of Ketanserin on Endotoxic Shock and Baroreflex Function in Rodents. **The Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 204, n. 10, p.1605-1612, 14 set. 2011. Oxford University Press (OUP).

LIU, Dexiang et al. Anti-inflammatory effects of fluoxetine in lipopolysaccharide(LPS)-stimulated microglial cells. **Neuropharmacology**, [s.l.], v. 61, n. 4, p.592-599, set. 2011. Elsevier BV.

MAITRA, Subir R.; WOJNAR, Margaret M.; LANG, Charles H.. Alterations In Tissue Glucose Uptake During The Hyperglycemic And Hypoglycemic Phases Of Sepsis. **Shock**, [s.l.], v. 13, n. 5, p.379-385, maio 2000. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

MAJNO, G.. STUDIES ON INFLAMMATION: I. The Effect of Histamine and Serotonin on Vascular Permeability. **The Journal Of Cell Biology**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.571-605, 1 dez. 1961. Rockefeller University Press

MAJNO, G.. STUDIES ON INFLAMMATION: II. The Site of Action of Histamine and Serotonin along the Vascular Tree. **The Journal Of Cell Biology**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.607-626, 1 dez. 1961. Rockefeller University Press.

MANDRIOLI, R.; FORTI, G.; RAGGI, M.. Fluoxetine Metabolism and Pharmacological Interactions: The Role of Cytochrome P450. **Current Drug Metabolism**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.127-133, 1 fev. 2006. Bentham Science Publishers Ltd.

MARTIN, Greg S. et al. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 348, n. 16, p.1546-1554, 17 abr. 2003. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS).

METZKER, Kiuanne Lino Lobo. **Antagonista do receptor da serotonina reverte a hipotensão e a hiporeatividade vascular no choque endotoxêmico em ratos**. 2015. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

MEULEMAN, Thomas R. et al. Ketanserin prevents platelet aggregation and endotoxin-induced pulmonary vasoconstriction. **Critical Care Medicine**, [s.l.], v. 11, n. 8, p.606-611, ago. 1983. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

MILLER, Samuel I. et al. Hypoglycemia as a manifestation of sepsis. **The American Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 68, n. 5, p.649-654, maio 1980. Elsevier BV

MOEMEN, Mohamed Ezzat. Prognostic categorization of intensive care septic patients. **World Journal Of Critical Care Medicine**, [s.l.], v. 1, n. 3, p.67-79, 2012. Baishideng Publishing Group Inc.

MORENO, Ricardo Alberto; MORENO, Doris Hupfeld; SOARES, Márcia Britto de Macedo. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, [s.i.], v. 21, p.24-40, maio 1999.

NICHOLS, David E.; NICHOLS, Charles D.. Serotonin Receptors. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 108, n. 5, p.1614-1641, maio 2008. American Chemical Society (ACS).

NISHIYAMA, Tomoki. Acute effects of sarpogrelate, a 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist on cytokine production in endotoxin shock model of rats. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 614, n. 1-3, p.122-127, jul. 2009. Elsevier BV.

NI, W. e WATTS, S. W. 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 33, n. 7, p. 575–83, 2006.

NI, Wei; LOOKINGLAND, Keith; WATTS, Stephanie W.. Arterial 5-Hydroxytryptamine Transporter Function Is Impaired in Deoxycorticosterone Acetate and N $\omega$ -Nitro- l -Arginine But Not Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, [s.l.], v. 48, n. 1, p.134-140, jul. 2006. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

PABLO, Raul de et al. Role of Circulating Lymphocytes in Patients with Sepsis. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2014, p.1-11, 2014.

PACHER, Pal et al. Serotonin reuptake inhibitors fluoxetine and citalopram relax intestinal smooth muscle. **Canadian Journal Of Physiology And Pharmacology**, [s.l.], v. 79, n. 7, p.580-584, jul. 2001. Canadian Science Publishing.

PEREIRA, Camila A. et al. Chronic fluoxetine treatment increases NO bioavailability and calcium-sensitive potassium channels activation in rat mesenteric resistance arteries. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 765, p.375-383, out. 2015.

PEREIRA, Camila A. et al. Chronic treatment with fluoxetine modulates vascular adrenergic responses by inhibition of pre- and post-synaptic mechanisms. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 800, p.70-80, abr. 2017.

POLI-DE-FIGUEIREDO, Luiz F. et al. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. **Shock**, [s.l.], v. 30, n. 1, p.53-59, out. 2008.

POLL, Tom van Der et al. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 17, n. 7, p.407-420, 24 abr. 2017. Springer Science and Business Media LLC.

QU, Ying et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of norfluoxetine in rats: Increasing extracellular serotonin level in the frontal cortex. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, [s.l.], v. 92, n. 3, p.469-473, maio 2009. Elsevier BV.

RAPPORT, M. M.; GREEN, A. A. e PAGE, I. H. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 176, n. 3, p. 1243–51, 1948.

RELLO, Jordi et al. Sepsis: A Review of Advances in Management. **Advances In Therapy**, [s.l.], v. 34, n. 11, p.2393-2411, 11 out. 2017. Springer Nature.

ROUL, D. et al. Increased  $\beta$ 2-adrenergic vasorelaxation at the early phase of endotoxemic shock in rats. **Vascular Pharmacology**, [s.l.], v. 72, p.181-189, set. 2015. Elsevier BV.

ROUMESTAN, Caroline et al. Anti-inflammatory properties of desipramine and fluoxetine. **Respiratory Research**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-11, 3 maio 2007. Springer Nature.

RUSSELL, A. et al. 5-Hydroxytryptamine 2B receptor function is enhanced in the N  $\omega$ -nitro-L-arginine hypertensive rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, n. 1, p. 179-187, 2002.

RUSSELL, James A.. Management of Sepsis. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 355, n. 16, p.1699-1713, 19 out. 2006. Massachusetts Medical Society.

SEITZ, Bridget M. et al. 5-HT causes splanchnic venodilation. **American Journal Of Physiology-heart And Circulatory Physiology**, [s.l.], v. 313, n. 3, p.676-686, set. 2017. American Physiological Society.

SEITZ, Bridget M. et al. 5-HT does not lower blood pressure in the 5-HT7 knockout rat. **Physiological Genomics**, [s.l.], v. 51, n. 7, p.302-310, jul. 2019. American Physiological Society.

SEYMOUR, Christopher W. et al. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis. **Jama**, [s.l.], v. 315, n. 8, p.762-774, 23 fev. 2016.

SILVA, Eliézer et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.251-260, 2004. Springer Nature.

SIMPLICIO, Janaina A. et al. Contribution of oxidative stress and prostanoids in endothelial dysfunction induced by chronic fluoxetine treatment. **Vascular Pharmacology**, [s.l.], v. 73, p.124-137, out. 2015.

SINGER, Mervyn et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Jama**, [s.l.], v. 315, n. 8, p.801-810, 23 fev. 2016.

SNEDDON, J. M. Sodium-dependent accumulation of 5-hydroxytryptamine by rat blood platelets. **British Journal of Pharmacology**, v. 37, n. 3, p. 680–688, 1969.

SONMEZ, Ozge; SONMEZ, Mehmet. Role of platelets in immune system and inflammation. **Porto Biomedical Journal**, [s.l.], v. 2, n. 6, p.311-314, nov. 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

SORDI, Regina et al. Pneumonia-induced sepsis in mice: temporal study of inflammatory and cardiovascular parameters. **International Journal Of Experimental Pathology**, [s.l.], v. 94, n. 2, p.144-155, 27 fev. 2013.

STOPPELAAR, S. F. de; VEER, C. van 't; POLL, T. van Der. The role of platelets in sepsis. **Thrombosis And Haemostasis**, [s.l.], v. 112, n. 4, p.666-677, 26 jun. 2014

TANIGUCHI, Leandro U et al. Sepsis-related deaths in Brazil: an analysis of the national mortality registry from 2002 to 2010. **Critical Care**, [s.l.], v. 18, n. 6, 5 nov. 2014. Springer Nature.

TILLMANN, Bourke; WUNSCH, Hannah. Epidemiology and Outcomes. **Critical Care Clinics**, [s.l.], v. 34, n. 1, p.15-27, jan. 2018. Elsevier BV.

TOH, Sengwee et al. Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Use and Risk of Gestational Hypertension. **American Journal Of Psychiatry**, [s.l.], v. 166, n. 3, p.320-328, mar. 2009. American Psychiatric Association Publishing.

TREVETHICK, Michael A.; FENIUK, Wasyl; HUMPHREY, Patrick P.a.. 5-hydroxytryptamine-induced relaxation of neonatal porcine vena cava in vitro. **Life Sciences**, [s.l.], v. 35, n. 5, p.477-486, jul. 1984. Elsevier BV.

UCHIYAMA, Shinichiro et al. Effect of Sarpogrelate, a 5-HT<sub>2A</sub> Antagonist, on Platelet Aggregation in Patients with Ischemic Stroke: Clinical-Pharmacological Dose-Response Study. **Cerebrovascular Diseases**, [s.l.], v. 24, n. 2-3, p.264-270, 2007. S. Karger AG.

UNGVARI, Zoltan et al. Fluoxetine Dilates Isolated Small Cerebral Arteries of Rats and Attenuates Constrictions to Serotonin, Norepinephrine, and a Voltage-Dependent Ca<sup>2+</sup> Channel Opener. **Stroke**, [s.l.], v. 30, n. 9, p.1949-1954, set. 1999. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

VANHOUTTE, P. M. Platelet-derived serotonin, the endothelium, and cardiovascular disease. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 17 Suppl 5, p. S6–12, 1991.

VERDONK, Franck; BLET, Alice; MEBAZAA, Alexandre. The new sepsis definition. **Current Opinion In Anaesthesiology**, [s.l.], v. 30, n. 2, p.200-204, abr. 2017.

VINCENT, J.-L. e ABRAHAM, E. The last 100 years of sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 173, n. 3, p. 256–63, 2006.

VINCENT, J.-L.; YAGUSHI, A. e PRADIER, O. Platelet function in sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 5, p. S313–7, 2002.

WALTHER, Andreas et al. Selective Serotonin Receptor Antagonism and Leukocyte-Independent Plasma Extravasation during Endotoxemia. **Microvascular Research**, [s.l.], v. 63, n. 1, p.135-138, jan. 2002. Elsevier BV.

WALTHER, D. J., PETER, J. U., WINTER, S., HÖLTJE, M., PAULMANN, N., GROHMANN, M., VOWINCKEL, J., ALAMO-BETHENCOURT, V., WILHELM, C. S., AHNERT-HILGER, G., BADER, M. Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. **Cell**, v.115, n.7, p.851-62, Dec 2003.

WALTHER, Andreas et al. Selective Serotonin-Receptor Antagonism and Microcirculatory Alterations During Experimental Endotoxemia. **Journal Of Surgical Research**, [s.l.], v. 143, n. 2, p.216-223, dez. 2007. Elsevier BV.

WATTS, Stephanie w.. 5-HT in systemic hypertension: foe, friend or fantasy?. **Clinical Science**, [s.l.], v. 108, n. 5, p.399-412, 1 maio 2005. Portland Press Ltd.

WATTS, S. W. e FINK, G. D. 5-HT<sub>2B</sub>-receptor antagonist LY-272015 is antihypertensive in DOCA-salt-hypertensive rats. **The American Journal of Physiology**, v. 276, n. 3 Pt 2, p. 944–52, 1999.

WATTS, S. W. et al. Serotonin and blood pressure regulation. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 2, p. 359–88, 2012.

WENTING, G J et al. Treatment of hypertension with ketanserin, a new selective 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist. **Bmj**, [s.l.], v. 284, n. 6315, p.537-539, 20 fev. 1982. BMJ.

WOOD, Alastair J.j.; GRAM, Lars F.. Fluoxetine. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 331, n. 20, p.1354-1361, 17 nov. 1994. Massachusetts Medical Society.

YAGUCHI, A. et al. Platelet function in sepsis. **Journal Of Thrombosis And Haemostasis**, [s.l.], v. 2, n. 12, p.2096-2102, dez. 2004.

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

## 9. APÊNDICE

### a. Teste com solução de sacarose

O experimento foi realizado com fêmeas Wistar, as quais foram divididas em dois grupos: veículo e fluoxetina. Primeiramente todas as ratas de ambos os grupos passaram por um treinamento durante 4 dias para aprenderem a consumir a solução de sacarose 30%. Nesse período as ratas eram deixadas no laboratório por 5h sem água e sem comida. No momento de realizar a administração as ratas eram separadas, cada uma em uma caixa individual. A administração da solução era feita através de seringa sem agulha, conforme o animal fosse consumindo, o embolo era pressionado cuidadosamente, evitando perdas. Durante o treinamento, 1 mL da solução foi oferecido e efetivamente consumido por todos animais.

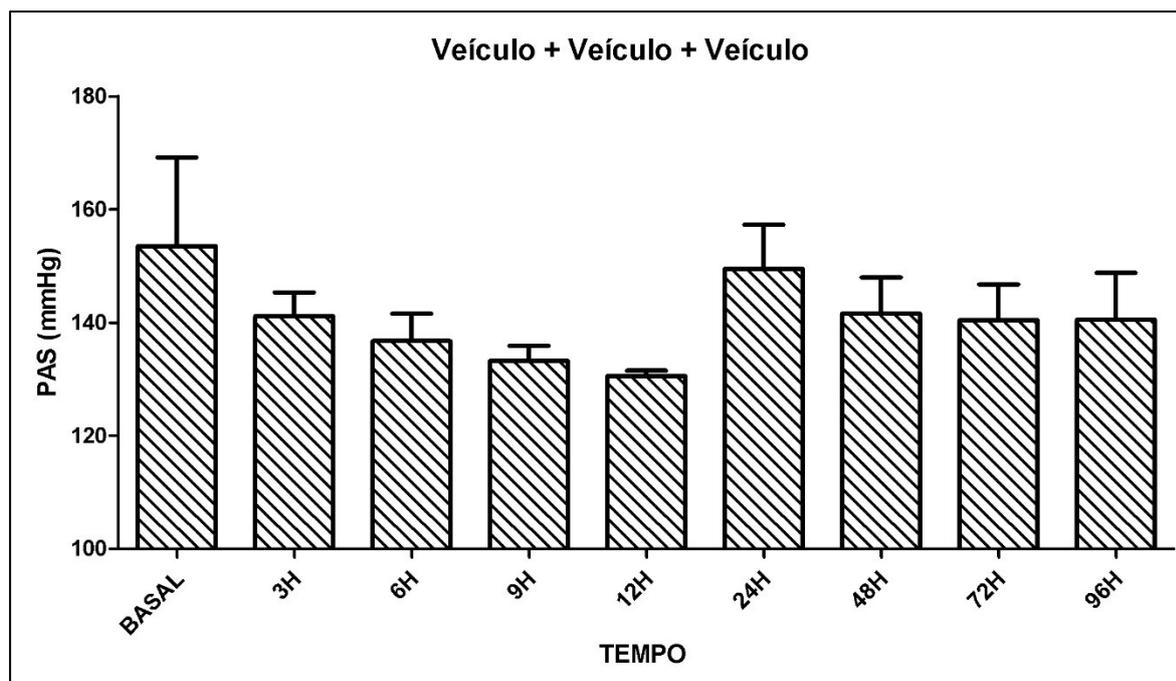
Na fase seguinte, o procedimento seguiu da mesma forma por mais 4 dias, porém para o segundo grupo, foi adicionado fluoxetina (10 mg/Kg) na solução de sacarose 30%. Todos os animais do grupo veículo consumiram a solução, entretanto as ratas que estavam recebendo a fluoxetina, ao notar o sabor e/ou odor da droga na primeira gota, paravam de consumir. Dessa forma o tratamento utilizando solução de sacarose por via oral não foi prosseguido.

### b. Tratamento agudo por via oral (V.O.)

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 diferentes grupos: veículo + veículo + veículo; veículo + LPS + veículo; fluoxetina + veículo + veículo; fluoxetina + LPS + veículo. Passaram, inicialmente, por um período de teste, no qual foi medida a PAS durante 4 dias consecutivos. Todos os animais foram treinados a comer o creme de avelã nesse mesmo período. No quinto dia, os ratos receberam o tratamento, sendo ele veículo (Creme de avelã, V.O.) ou fluoxetina (10 mg/kg, V.O.). Já no sexto dia, após medida de pressão arterial basal, foi realizada indução da endotoxemia com LPS (10 mg/Kg, I.P.) para metade dos animais, enquanto que os demais receberam veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.). Passadas 2 h todos os grupos receberam veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.). A pressão arterial foi medida nos mesmos tempos previamente estabelecidos e apresentados no **DIAGRAMA 1** (sessão 3.3.1 da metodologia).

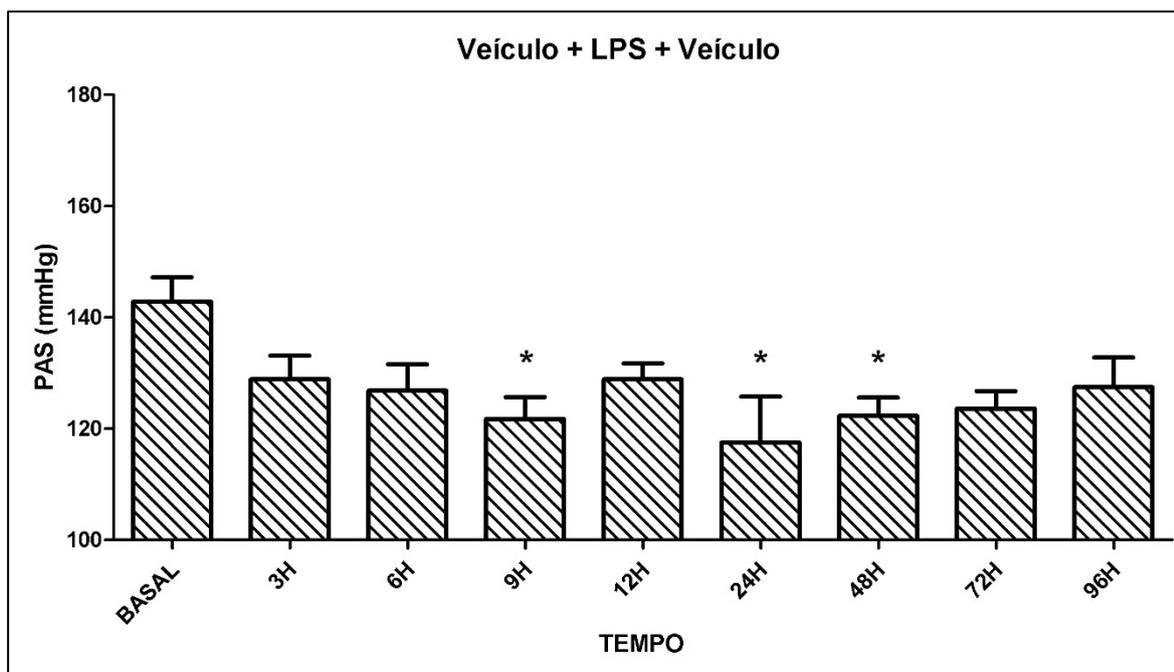
A **FIGURA 20** apresenta as médias dos valores de PAS em mmHg obtidos de 4 animais do grupo veículo + veículo + veículo. Podemos notar que a PAS desses animais apresentou algumas variações ao longo dos tempos, mas estas não foram significativamente diferentes.

**Figura 20: Pressão arterial sistólica de ratos tratados agudamente por via oral com veículo e que receberam por via IP veículo e veículo.** Após tratamento com veículo (Creme de avelã) por 1 dia, os animais receberam veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) e novamente veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) após 2 h. Em seguida, foram submetidos a medidas de pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda em diferentes tempos. A PAS basal foi medida imediatamente antes da administração de PBS. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 4 animais em todos os tempos. ( $P > 0,05$ ; ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



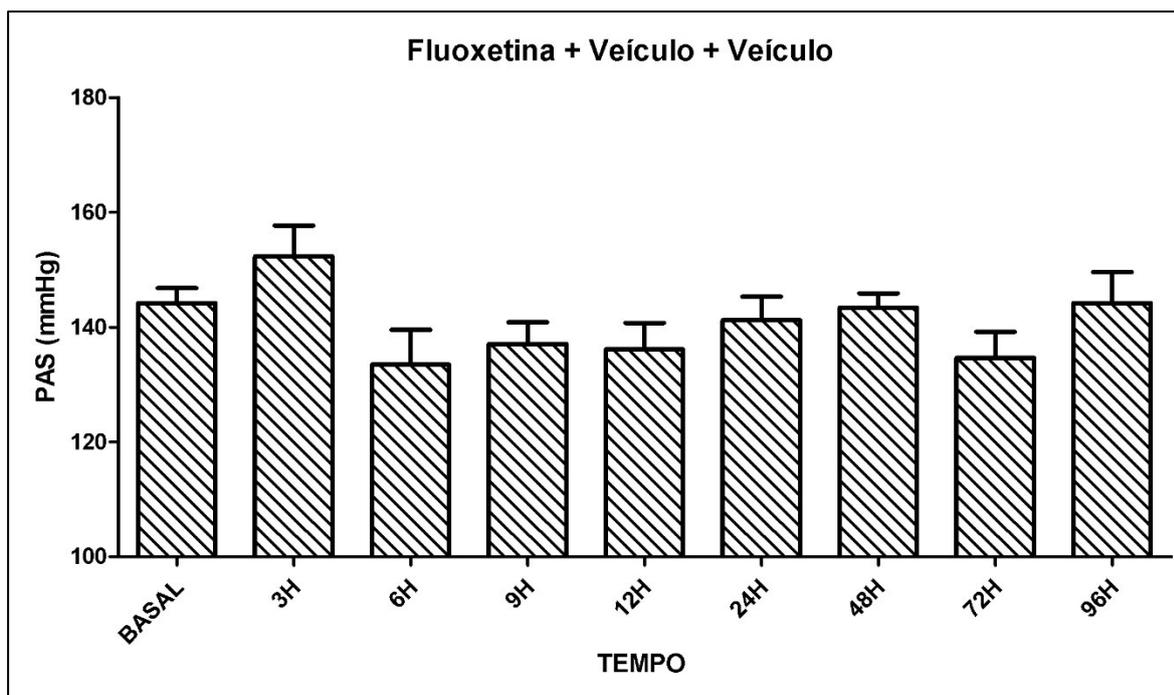
O gráfico representado na **FIGURA 21** é referente às médias dos valores de PAS em mmHg obtidos de 4 animais do grupo veículo + LPS + veículo. É possível notar que o LPS promoveu uma diminuição da PAS desses animais com diferença significativa após 9, 24 e 48 h da sua administração.

**Figura 21: Pressão arterial sistólica de ratos tratados agudamente por via oral com veículo e que receberam por via IP LPS e veículo.** Os animais receberam tratamento com veículo (Creme de avelã) um dia antes de serem submetidos à administração de LPS (10 mg/Kg, I.P.) e de veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.). Foram obtidas medidas de pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda em diferentes tempos. Antes da administração de LPS, foram obtidas as medidas de PAS basal. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 4 animais em todos os tempos. \*  $P < 0,05$  vs. PAS basal (ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



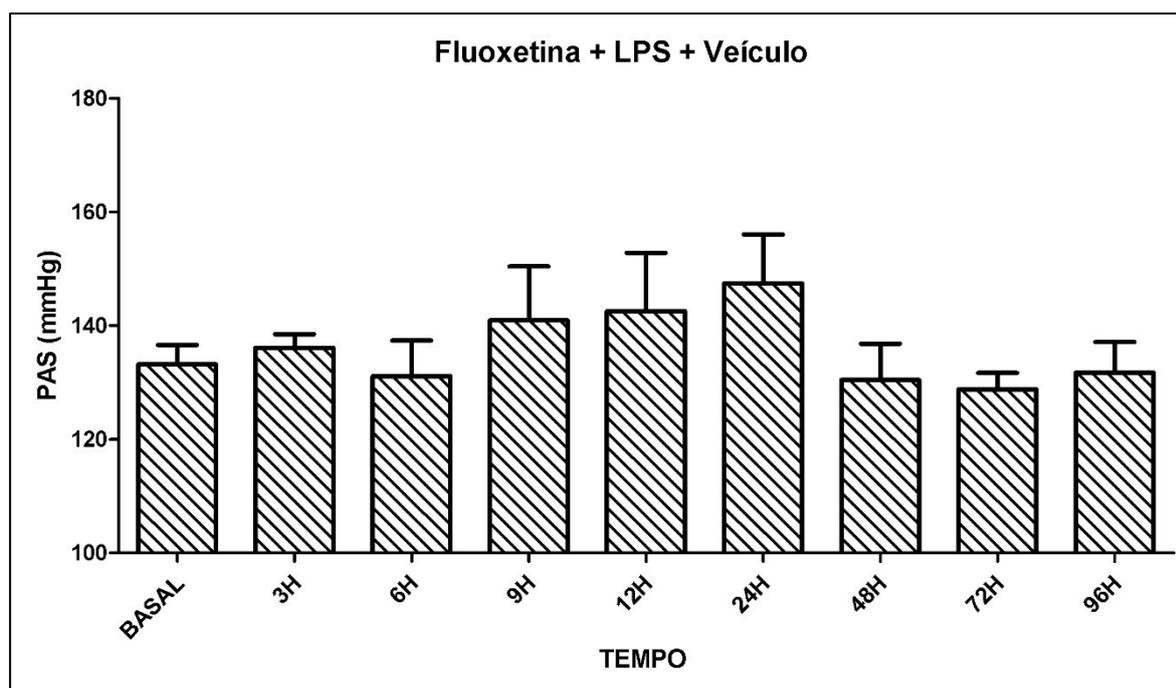
O gráfico obtido a partir das médias dos valores de PAS em mmHg de 4 animais do grupo fluoxetina + veículo + veículo está representado na **FIGURA 22**. Podemos observar variações nas PAS em diferentes tempos, entretanto não foram significantes.

**Figura 22: Pressão arterial sistólica de ratos tratados agudamente por via oral com fluoxetina e que receberam por via IP veículo e veículo.** Os animais foram tratados com fluoxetina (10 mg/Kg) por apenas 1 dia, após isso, receberam veículo (PBS;1 ml/Kg, I.P.) e em seguida nova administração de veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) após 2h. Medidas de pressão arterial sistólica (PAS) foram obtidas por pletismografia de cauda em diferentes tempos. As medidas de PAS basal foram obtidas antes da primeira administração de PBS. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 4 animais em todos os tempos. ( $P > 0,05$ ; ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



As médias dos valores de PAS em mmHg obtidas de 4 animais do grupo fluoxetina + LPS + veículo estão apresentadas no gráfico da **FIGURA 23**. Podemos perceber que os animais que receberam tratamento agudo com fluoxetina previamente ao LPS não apresentaram queda da PAS.

**Figura 23: Pressão arterial sistólica de ratos tratados agudamente por via oral com fluoxetina e que receberam por via IP LPS e veículo.** Os animais foram tratados com uma dose de fluoxetina (10 mg/Kg), no dia seguinte foram submetidos à administração de LPS (10 mg/Kg, I.P.) e em seguida, 2h depois, veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.). Foram obtidas medidas de pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda em diferentes tempos. Imediatamente antes da administração de LPS foram obtidas as medidas de PAS basal. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 4 animais em todos os tempos. ( $P > 0,05$ ; ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



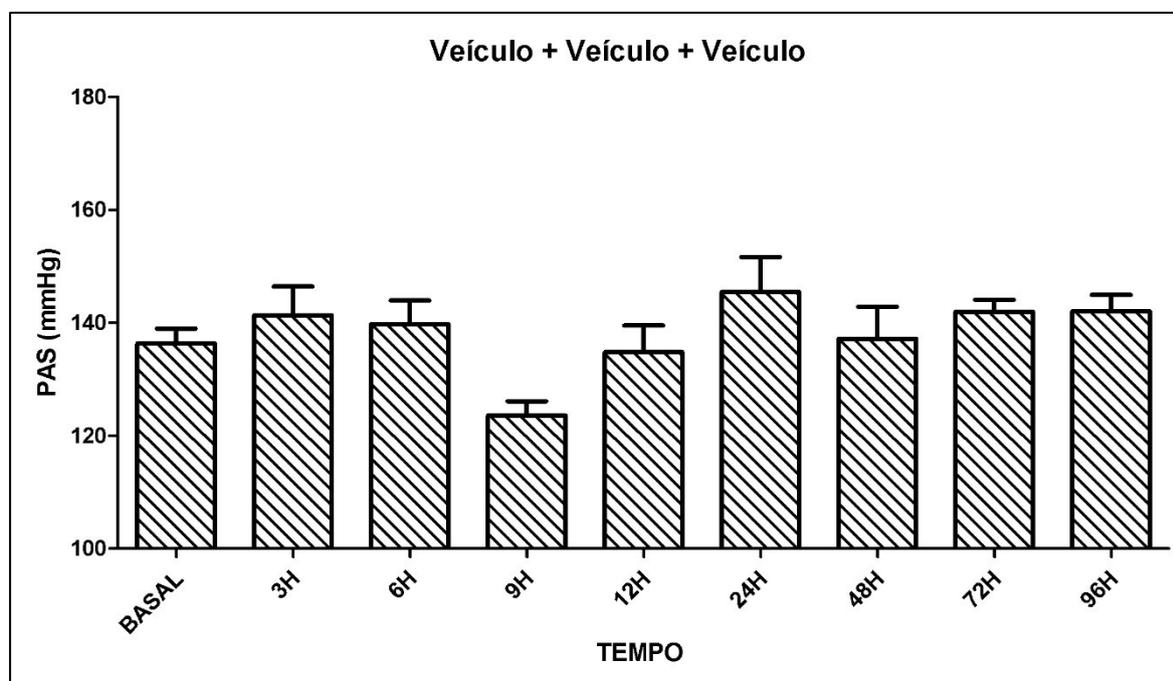
De acordo com esses dados, poderíamos sugerir um efeito de melhora por parte da fluoxetina, que quando administrada de forma aguda seria capaz de prevenir a queda da pressão arterial de ratos endotoxêmicos, porém, muitos animais não fizeram a ingestão correta do tratamento e o número amostral é pequeno, visto que o experimento foi interrompido por conta dessa dificuldade na administração da fluoxetina, o que torna difícil, então, chegar a uma conclusão.

### c. Tratamento agudo por via intraperitoneal (I.P.)

Este protocolo se assemelha ao anterior, entretanto, na tentativa de contornar alguns vieses observados, como por exemplo o fato de alguns animais não terem consumido o creme de avelã, optamos por utilizar outra via de administração: a via intraperitoneal. Dessa forma, no quinto dia do protocolo, metade dos animais recebeu como tratamento o veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) e a outra metade, fluoxetina (10 mg/Kg, I.P.). O experimento seguiu da mesma forma que o anterior a partir do 6º dia.

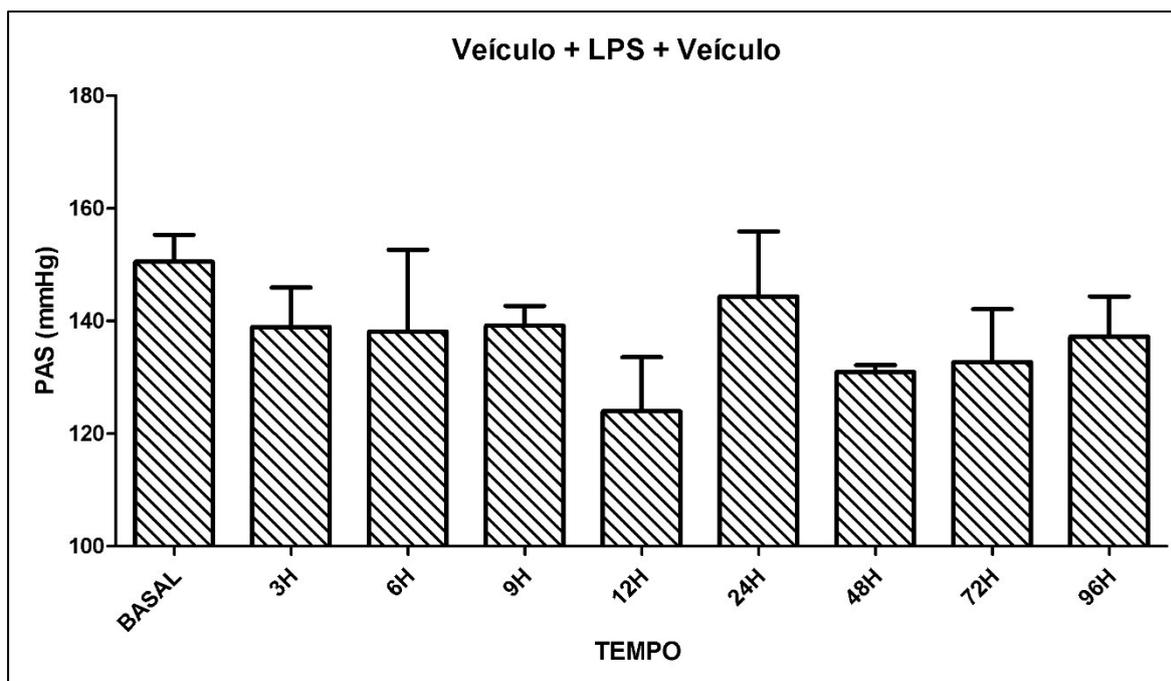
A **FIGURA 24** traz as médias dos valores de PAS em mmHg obtidos de 4 animais do grupo veículo + veículo + veículo. É possível perceber algumas variações na PAS desses animais nos diferentes tempos, porém não foram diferentes significativamente.

**Figura 24: Pressão arterial sistólica de ratos tratados agudamente por via IP com veículo e que receberam por via IP veículo e veículo.** Os animais foram tratados com veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) por 1 dia, e após, foi administrado veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) e novamente veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) após 2h. Em seguida, foram submetidos a medidas de pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda em diferentes tempos. Os animais tiveram as medidas de PAS basal imediatamente antes da primeira administração de PBS após o fim do tratamento. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 4 animais em todos os tempos. ( $P > 0,05$ ; ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



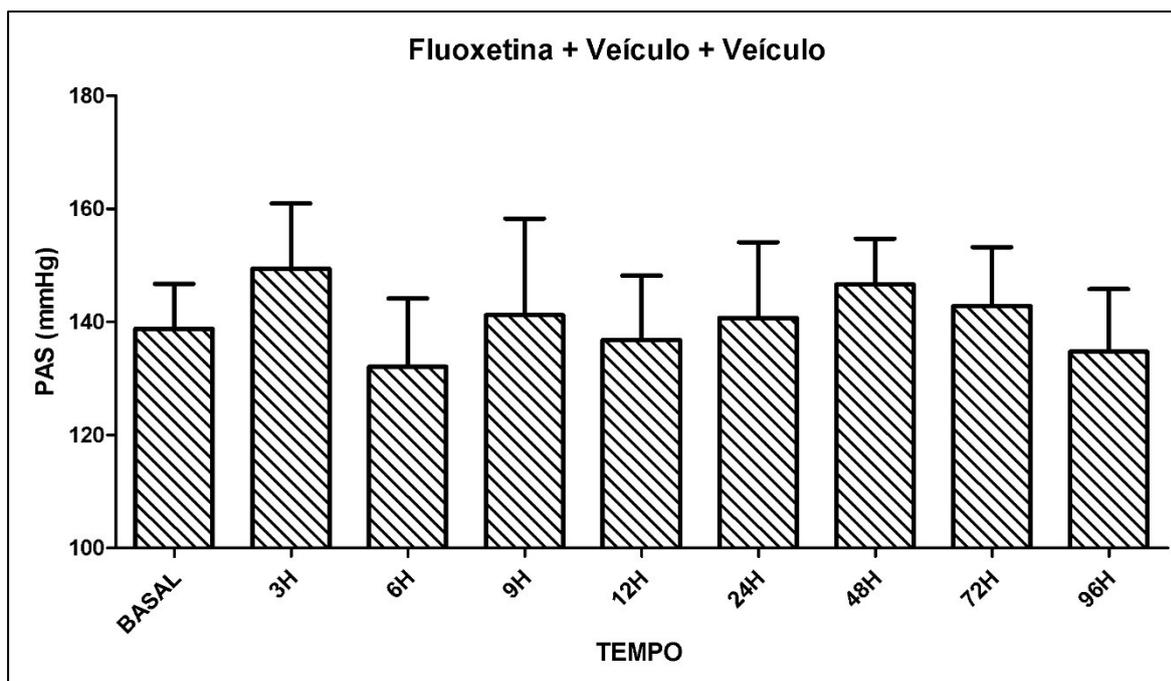
As médias dos valores de PAS em mmHg obtidas de 3 animais do grupo veículo + LPS + veículo são mostradas no gráfico da **FIGURA 25**. Podemos perceber que o LPS por si só não foi capaz de causar uma queda significativa na PAS desses animais.

**Figura 25: Pressão arterial sistólica de ratos tratados agudamente por via IP com veículo e que receberam por via IP LPS e veículo.** Os animais receberam tratamento com veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) por 1 dia, e após isto, foram submetidos à administração de LPS (10 mg/Kg, I.P.) e de veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) depois de 2h. Foram obtidas medidas de pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda em diferentes tempos. Antes da administração de LPS, foram obtidas as medidas de PAS basal. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 3 animais em todos os tempos. ( $P > 0,05$ ; ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



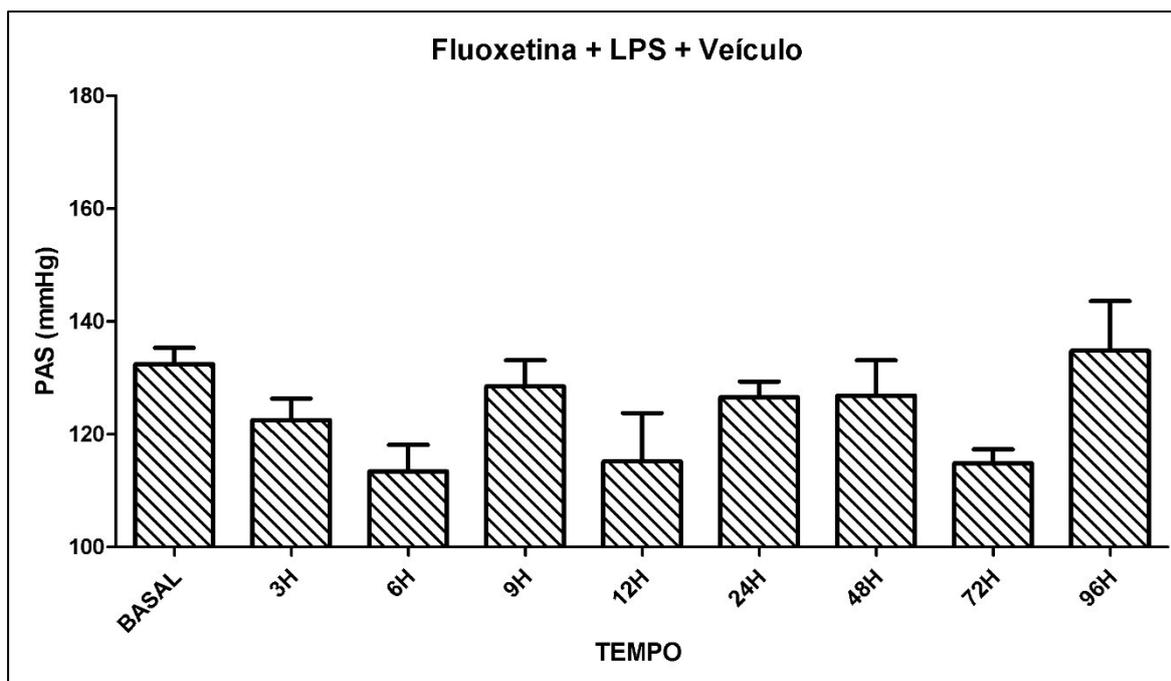
O gráfico da **FIGURA 26** apresenta as médias dos valores de PAS em mmHg de 3 animais do grupo fluoxetina + veículo + veículo. É possível notar que apesar de haver algumas variações, estas não foram significantes.

**Figura 26: Pressão arterial sistólica de ratos tratados agudamente por via IP com fluoxetina e que receberam por via IP veículo e veículo.** Durante 1 dia os animais foram tratados com fluoxetina (10 mg/Kg), após isso, receberam veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) e depois de 2h nova administração de veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.). Medidas de pressão arterial sistólica (PAS) foram obtidas por pletismografia de cauda em diferentes tempos. As medidas de PAS basal foram obtidas antes da primeira administração de PBS. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 3 animais em todos os tempos. ( $P > 0,05$ ; ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



A **FIGURA 27** apresenta o gráfico com as médias dos valores de PAS em mmHg obtidas de 4 animais do grupo fluoxetina + LPS + veículo. Podemos observar que estes animais também apresentaram algumas variações nas medidas de PAS nos diferentes tempos, mas não foram diferentes significativamente.

**Figura 27: Pressão arterial sistólica de ratos tratados agudamente por via IP com fluoxetina e que receberam por via IP LPS e veículo.** Os animais foram tratados com uma dose de fluoxetina (10 mg/Kg), no dia seguinte o LPS (10 mg/Kg, I.P.) foi administrado e após 2 h o veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.). Foram obtidas medidas de pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda em diferentes tempos. Antes da administração de LPS foram obtidas as medidas de PAS basal. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 4 animais em todos os tempos. ( $P > 0,05$ ; ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



Os experimentos foram interrompidos novamente devido ao fato do LPS não estar diminuindo a PAS desses animais, que é o que esperávamos observar durante a endotoxemia, de acordo com nossos resultados anteriores. Houve a necessidade então de um novo protocolo experimental, para testar o LPS e continuar com os futuros experimentos. Dessa forma, esses dados não são conclusivos.

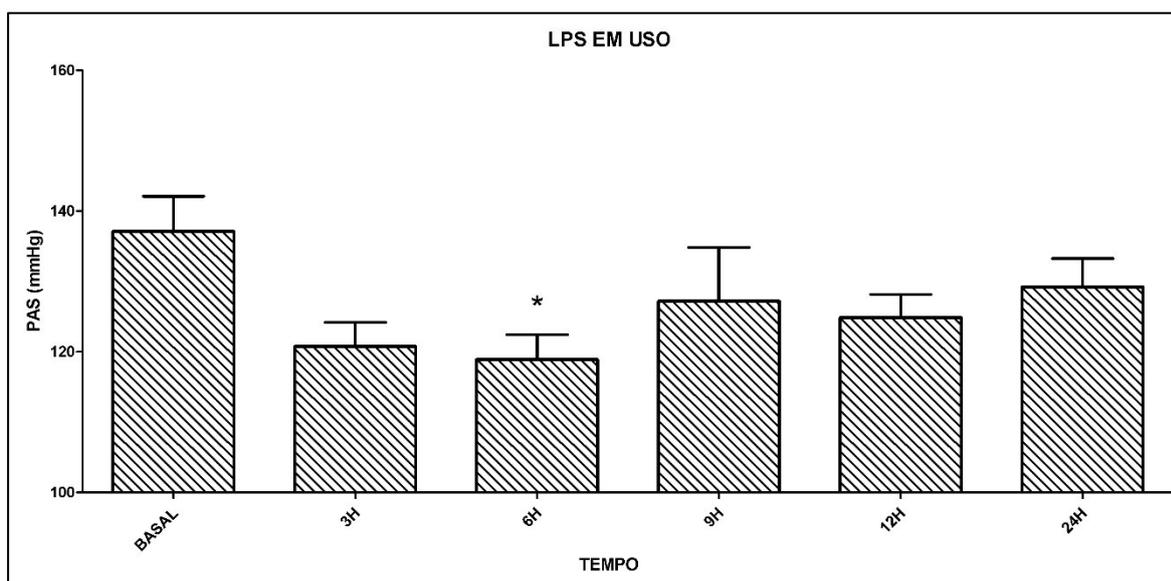
#### d. Teste do LPS

Durante os experimentos de tratamento agudo descritos acima, foi observado que os animais tratados com LPS não estavam apresentando queda na pressão arterial, ou seja, o LPS por si só, independente de tratamento, não estava promovendo o seu efeito esperado, de acordo com a literatura e com nossos resultados prévios do laboratório. Devido a isto, realizamos um teste para validar o LPS. Nesse teste comparou-se o efeito do LPS que estava sendo usado com o de um LPS recém adquirido e aberto. Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos: veículo + LPS em uso; veículo + LPS novo. Após os 4 dias de testes para medidas de PAS,

todos os animais, de ambos os grupos, receberam veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) como tratamento agudo. No sexto dia foi realizada a indução da endotoxemia para todos os animais, sendo que, metade recebeu o LPS em uso e outra metade o LPS novo. As medidas de PAS foram realizadas nos tempos: 3, 6, 9, 12 e 24 h após LPS.

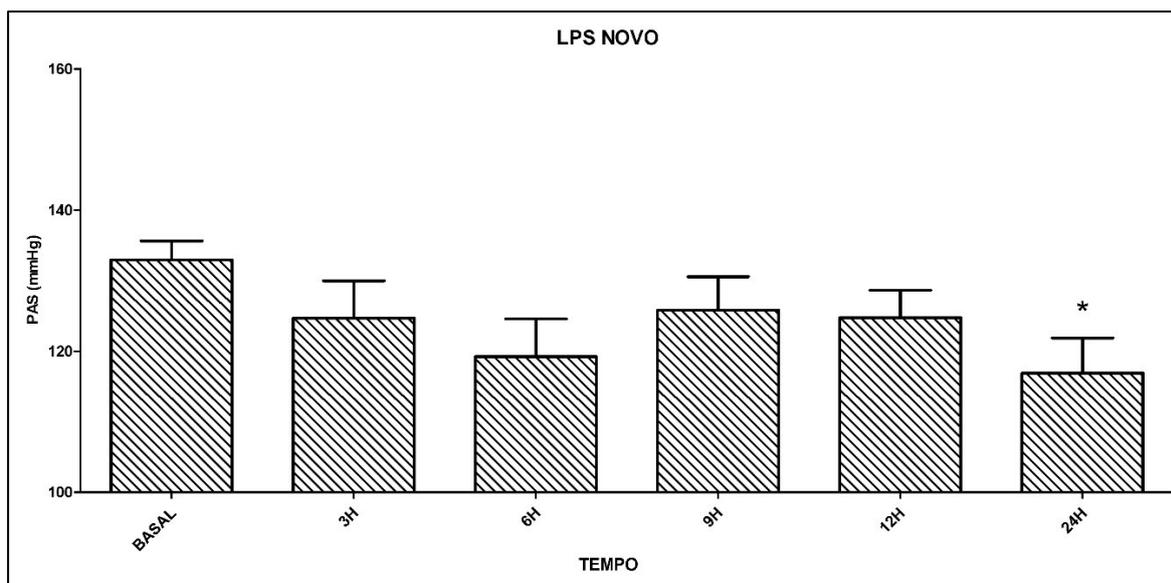
O gráfico da **FIGURA 28** foi obtido a partir das médias dos valores de PAS em mmHg de 8 animais do grupo veículo + LPS em uso. Podemos observar que o LPS causou uma queda na PAS, e esta foi estatisticamente significativa no tempo de 6h.

**Figura 28: Pressão arterial sistólica de ratos submetidos ao LPS em uso.** Os animais foram tratados com uma dose de veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.), no dia seguinte foram submetidos ao LPS (10 mg/Kg, I.P.) que estava em uso, e após 2 h receberam veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.). Foram obtidas medidas de pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda em diferentes tempos. Antes da administração de LPS foram obtidas as medidas de PAS basal. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 8 animais em todos os tempos. \*  $P < 0,05$  vs. PAS basal (ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



A **FIGURA 29** apresenta o gráfico com as médias dos valores de PAS em mmHg obtidas de 7 animais do grupo veículo + LPS novo. É possível notar o LPS também causou uma queda na PAS destes animais, apresentando significância estatística no tempo de 24 h.

**Figura 29: Pressão arterial sistólica de ratos submetidos ao LPS novo.** Foi administrado veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) como tratamento por um dia, no dia seguinte os animais foram submetidos ao LPS (10 mg/Kg, I.P.) novo e em seguida receberam veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) após 2 h. Foram obtidas medidas de pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda em diferentes tempos. Antes da administração de LPS foram obtidas as medidas de PAS basal. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 7 animais em todos os tempos. \*  $P < 0,05$  vs. PAS basal (ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



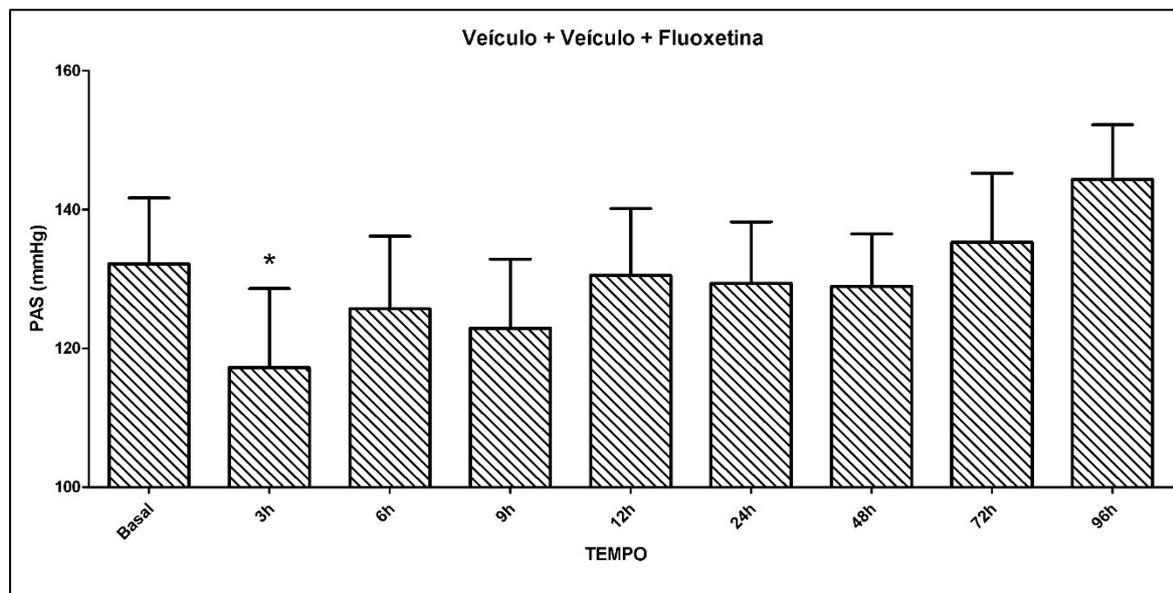
Esses dados nos mostram que, apesar de não ter sido observada diferença estatística nos demais tempos, ambos os LPS foram capazes de promover o seu efeito hipotensor.

#### e. Tratamento com fluoxetina após LPS

Esse protocolo experimental se assemelha ao que foi exposto na sessão 3.3.2 da metodologia. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 diferentes grupos: veículo + veículo + fluoxetina; veículo + LPS + fluoxetina; fluoxetina + veículo + fluoxetina; fluoxetina + LPS + fluoxetina. Os 4 primeiros dias consistiram em um treinamento para as medidas de pressão arterial, de forma a ambientar os animais ao procedimento. No quinto dia foi iniciado o tratamento crônico, sendo que metade dos grupos recebeu veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) e a outra metade fluoxetina (10 mg/Kg/dia, I.P.). No 19º dia, foi realizada a indução da endotoxemia com LPS (10 mg/Kg, I.P.) ou administração de veículo (PBS; 1 mL/Kg, I.P.) para controle. Após 2 h todos os grupos receberam fluoxetina (10 mg/Kg, I.P.). Medidas de pressão arterial foram realizadas nesses animais conforme apresentado no **DIAGRAMA 2** (sessão 3.3.2 da metodologia).

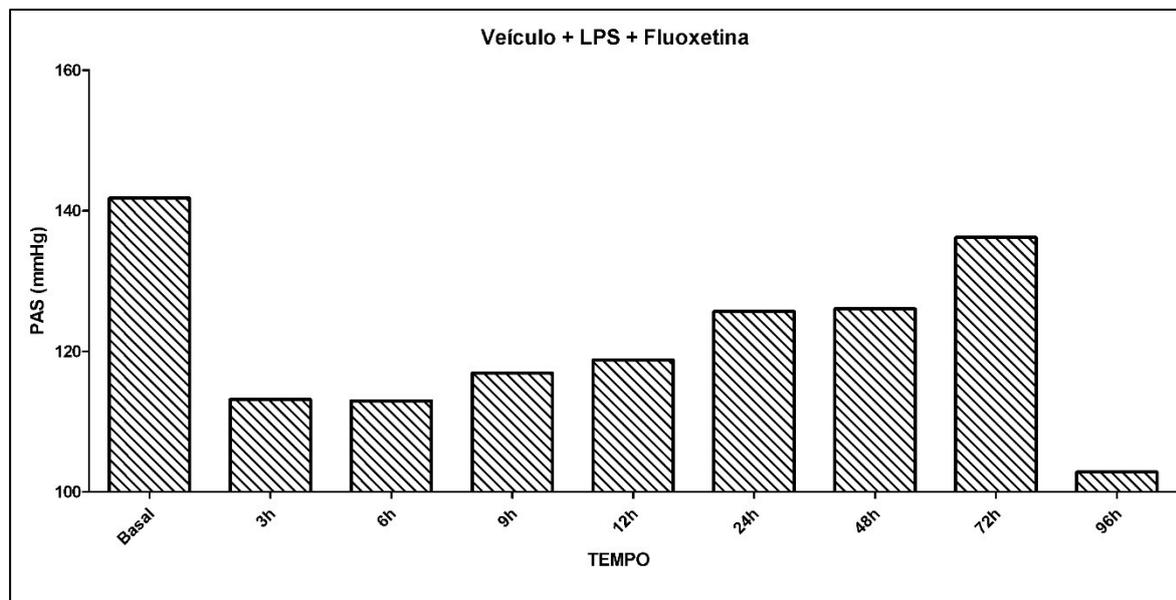
As médias dos valores de PAS em mmHg obtidas de 4 animais do grupo veículo + veículo + fluoxetina são mostradas no gráfico da **FIGURA 30**. Podemos notar que mesmo se tratando de um grupo controle, que não recebeu LPS, houve bastante variação nas medidas de PAS nos diferentes tempos, apresentando uma queda significativa no tempo de 3 h, que equivale a 1 h após administração da fluoxetina.

**Figura 30: Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via IP com veículo e que receberam por via IP veículo e fluoxetina.** Os animais receberam veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) como tratamento durante 14 dias, em seguida, foi administrado veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) e após 2 h fluoxetina (10 mg/Kg, I.P.). Os animais foram submetidos a medidas de pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda em diferentes tempos, e tiveram a PAS basal medida imediatamente antes da administração de PBS. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 4 animais em todos os tempos. \*  $P < 0,05$  vs. PAS basal (ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



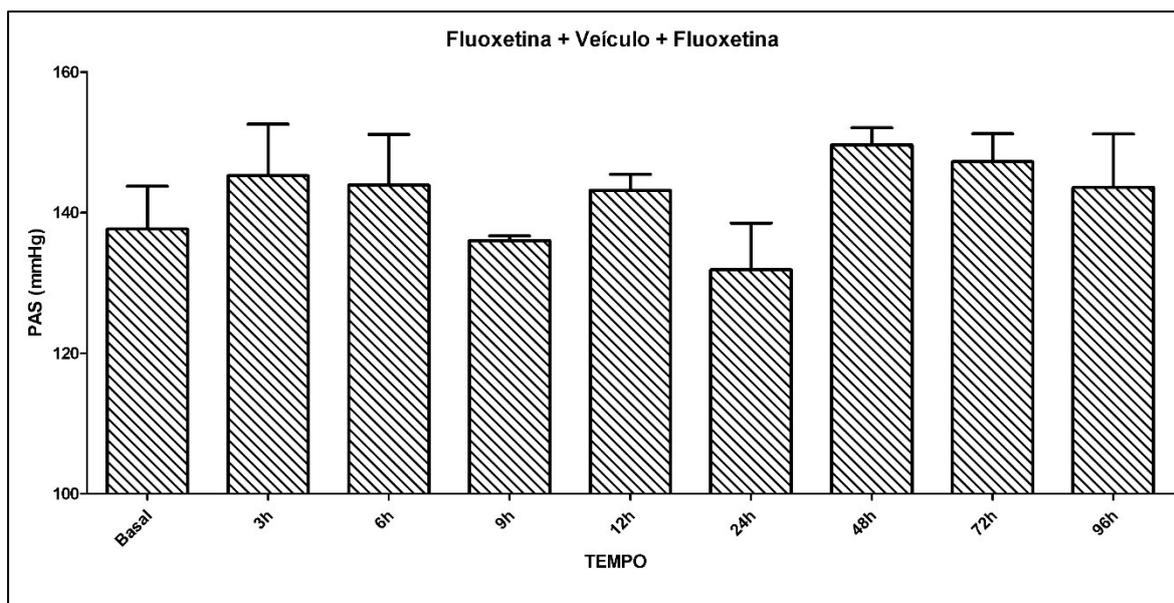
A **FIGURA 31** apresenta as médias dos valores de PAS em mmHg obtidas de apenas um animal do grupo veículo + LPS + fluoxetina. É possível perceber grandes variações na PAS desse rato nos diferentes tempos, inclusive uma queda bastante acentuada em 96 h. Porém não foi realizado nenhum teste estatístico, visto que só há resultado de um animal. Os outros animais deste grupo, vieram a óbito, por esse motivo não foi possível coletar mais dados de PAS e aumentar o número amostral.

**Figura 31: Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via IP com veículo e que receberam por via IP LPS e fluoxetina.** Após receberem tratamento com veículo (PBS; 1 ml/Kg, I.P.) por 14 dias, os animais foram submetidos à administração de LPS (10 mg/Kg, I.P.) e depois de 2 h receberam fluoxetina (10 mg/Kg, I.P.). Foram obtidas medidas de pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda em diferentes tempos. Imediatamente antes da administração de LPS foram obtidas as medidas de PAS basal. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 1 animal em todos os tempos.



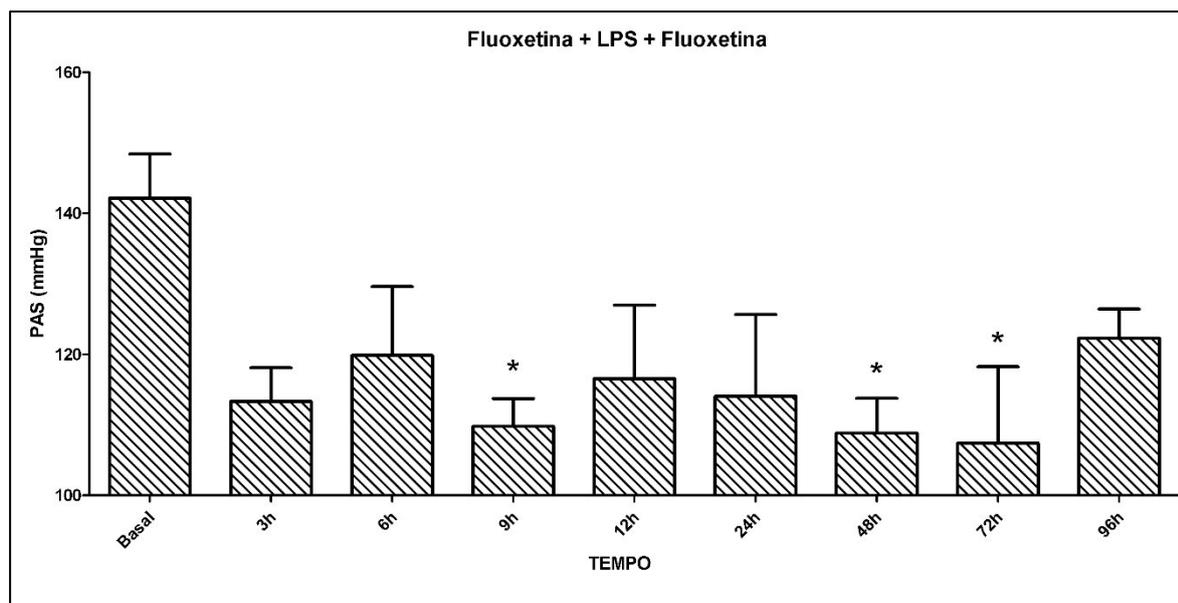
O gráfico da **FIGURA 32** traz as médias dos valores de PAS em mmHg de 4 animais do grupo fluoxetina + veículo + fluoxetina. Podemos observar que apesar de haver algumas variações, estas não foram significantes.

**Figura 32: Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via IP com fluoxetina e que receberam por via IP veículo e fluoxetina.** Após tratamento por 14 dias com fluoxetina (10 mg/Kg), os animais receberam veículo (PBS;1 ml/Kg, I.P.) e em seguida, uma nova administração de fluoxetina (10 mg/Kg, I.P.) após 2 h. Medidas de pressão arterial sistólica (PAS) foram obtidas por pletismografia de cauda em diferentes tempos. As medidas de PAS basal foram obtidas antes da administração de PBS. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 4 animais em todos os tempos. ( $P > 0,05$ ; ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



A **FIGURA 33** representa o gráfico obtido a partir das médias dos valores de PAS em mmHg de 3 animais do grupo fluoxetina + LPS + fluoxetina. Podemos observar que estes animais apresentaram queda na PAS, e esta foi significativa apenas em 9, 48 e 72 h após administração de LPS.

**Figura 33: Pressão arterial sistólica de ratos tratados cronicamente por via IP com fluoxetina e que receberam por via IP LPS e fluoxetina.** Os animais foram tratados com fluoxetina (10 mg/Kg) durante 14 dias, após isto, foram submetidos à administração de LPS (10 mg/Kg, I.P.) e novamente de fluoxetina (10 mg/Kg, I.P.) 2 h depois. Foram obtidas medidas de pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda em diferentes tempos. Antes da administração de LPS, foram obtidas as medidas de PAS basal. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos valores de PAS obtidos de 3 animais em todos os tempos. \*  $P < 0,05$  vs. PAS basal (ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni).



De forma geral os resultados observados nesta sessão, avaliando o efeito da fluoxetina administrada após indução da endotoxemia, não são conclusivos. Novos experimentos são necessários para aumentar o número amostral, possibilitando encontrar diferenças significativas e que contribuam para um melhor entendimento destes efeitos.

## ANEXO 1 – Aprovação da CEUA



Universidade Federal  
de Santa Catarina

Comissão de Ética no  
Uso de Animais



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Antidepressivos e a serotonina na hipertensão, sepse e comportamento sexual com um olhar para dois gêneros.", protocolada sob o CEUA nº 4181170516, sob a responsabilidade de **Aurea Elizabeth Linder** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 06/12/2016.

We certify that the proposal "Antidepressants and serotonin in hypertension, sepsis and sexual behavior: one look at two gender", utilizing 5280 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 4181170516, under the responsibility of **Aurea Elizabeth Linder** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 12/06/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [06/2016](#) a [12/2019](#)

Área: [Farmacologia](#)

Origem: [CCB - Lafex- Laboratório de Farmacologia Experimental](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [8 a 12 semanas](#)

N: [5280](#)

Linhagem: [wistar](#)

Peso: [180 a 250 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso

Florianópolis, 06 de dezembro de 2016

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Catarina

Aderbal Silva Aguiar Júnior  
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Catarina