MÔNICA SAKAI

Efeitos do diazepam sobre o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich: envolvimento do Receptor Periférico para Benzodiazepínico (PBR) ou Proteína Translocadora (TSPO)

São Paulo
2009

MÔNICA SAKAI

Efeitos do diazepam sobre o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich: envolvimento do Receptor Periférico para Benzodiazepínico (PBR) ou Proteína Translocadora (TSPO)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:
Patologia

Área de Concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientador:
Prof. Dr. João Palermo-Neto

São Paulo
2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2141
FMVZ

Sakai, Mônica

Efeitos do diazepam sobre o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich: envolvimento do Receptor Periférico para Benzodiazepínico (PBR) ou Proteína Translocadora (TSPO) / Mônica Sakai. – São Paulo : M. Sakai, 2009.

147 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. João Palermo-Neto.

1. Benzodiazepínicos. 2. Diazepam. 3. Neuroimunomodulação. 4. PBR. 5. TSPO. 6. Tumor de Ehrlich. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos do diazepam sobre o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos: envolvimento dos PBRs (Peripheral-Type Benzodiazepine Receptors).", protocolo nº717/2005, utilizando 128 camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Palermo Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendun".

(We certify that the Research "Diazepam effects on tumor growth in Ehrlich tumor bearing mice: role of PBRs (Peripheral-Type Benzodiazepine Receptors)", protocol number 717/2005, utilizing 128 mice, under the responsibility of Prof. Dr. João Palermo Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendun", meeting).

São Paulo, 23 de agosto de 2005

Profª Drª Julia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 - 05508-270 - Cidade Universitária. "Armando de Salles Oliveira"
Fax: (011) 3032-2224 Fone: (011) 3091-7671 -3091-7676 e-mail: fmvz@edu.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SAKAI, Mônica

Título: Efeitos do diazepam sobre o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich: envolvimento do Receptor Periférico para Benzodiazepínico (PBR) ou Proteína Translocadora (TSPO)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ___/___/___

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

DEDICATÓRIAS

Dedico esta tese,

À minha mãe,

Pelo exemplo de determinação e coragem, pelo apoio irrestrito, pela compreensão em todos os momentos, pela pessoa que sou hoje, por todo seu amor.

Ao meu pai Toshiuke *(in memorian)* e ao Jum,

Pelas boas recordações e aprendizados, pelas conversas e pelo carinho.

Aos meus irmãos Flávio e Paulo Roberto e a Rita,

Por estarem sempre presentes, pelo apoio constante, pela amizade, por serem parte da minha família e da minha vida.

Ao Claudio,

Pela compreensão, pela paciência, pelo respeito e pelo carinho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Professor Doutor João Palermo Neto

Não tenho palavras suficientes para agradecer
pela oportunidade em ser sua orientada,
pela confiança que depositou em mim desde sempre,
pelo aprendizado constante,
pelo exemplo de profissionalismo, de liderança e de competência,
pelo apoio e incentivo em todos os momentos.
Muito Obrigada.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

Ao Departamento de Patologia e Toxicologia (VPT) da FMVZ-USP, local onde este trabalho foi realizado.

Ao Programa de Patologia Experimental e Comparada, programa pelo qual este trabalho foi desenvolvido.

Ao Prof. Dr. Vassilios Papadopoulos pela doação do anticorpo anti-TSPO, pelas sugestões e por ter me recebido em seu laboratório na Universidade McGill.

Ao Prof. Dr. Luciano Freitas Felício (VPT-FMVZ-USP) pela amizade, pelo carinho e pelas agradáveis conversas.

Ao Prof. Dr. Paulo César Maiorka (VPT-FMVZ-USP) pela amizade, pelo incentivo e pelos conselhos sempre presentes.

À Profa. Dra. Dr. Silvana Lima Górniak (VPT-FMVZ-USP) pelo profissionalismo, pelo apoio e pela atenção imediatamente dispensada sempre que precisei.

À Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli (VPT-FMVZ-USP) pelo apoio científico, pelo entusiasmo e pelo carinho demonstrados nos últimos anos.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Sá Rocha (VPT-FMVZ-USP) pelo apoio e pelos valiosos questionamentos.

Ao Prof. Dr. Frederico Azevedo da Costa Pinto (VPT-FMVZ-USP) pela amizade, pelos ensinamentos, pelos momentos científicos e pela atenção sempre dispensada de maneira inquestionável.

À pesquisadora Cristina de Oliveira Massoco pela presença constante de modo ímpar, pelos seus conselhos de amiga e de cientista.

Aos funcionários do Biotério (VPT-FMVZ-USP): Cláudia, Idalina, Rosiris, Nelson, Herculano e Mauro pela dedicação e atenção diária aos alunos e aos animais utilizados nesses experimentos.

Aos funcionários do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia (VPT-FMVZ-USP): Priscila, Magali e Ricardo pela ajuda e atenção presente nos experimentos.

Às funcionárias da Secretaria (VPT-FMVZ-USP): Cristina, Sílvia e Adriana por toda atenção e carinho.

Aos funcionários do Departamento (VPT-FMVZ-USP): Buga, Edson, Lívia, Lúcia, Luciana, Marguite, Raimundo e Shirley pelo ótimo convívio diário.

Às funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação (FMVZ-USP): Cláudia, Dayse e Joana, pela eficiência e pela ajuda.

Aos funcionários da Biblioteca (FMVZ-USP), em especial Elza, Fátima, Helena e Solange, pelo excelente atendimento.

Ao Rodrigo Vieira pelo bom humor e pela inestimável ajuda em resolver todos nossos problemas.

Às eternas amigas-irmãs científicas: Evelise, Silvia e Patrícia, por estarem sempre presentes, por podermos dividir nossas alegrias e angústias, tornando tudo mais fácil.

Aos amigos de Pós-Graduação: Alison, Basso, Daniel Cohn, Denise, Domenica, Milena, Renato, Ricardo, Viviane, Wanderley, pelo apoio nos experimentos, pelas conversas e conselhos, pelo respeito recíproco, pelos incentivos, pelos momentos de descontração, pelo amadurecimento pessoal e profissional.

Aos alunos, pesquisadores e professores do Grupo de Neuroimunomodulação por todo o apoio mútuo, pelo acolhimento e pelo crescimento científico proporcionado.

Aos alunos de Pós-Graduação do VPT: Altamir, Ana Paula, Ana Karina, Andréia, Bárbara, Beatriz, Bruno, Camila Lima, Camila Moreira, Carolina Dizzioli, Daniel Sanches, Daniel Stankevicius, Dario, Eduardo Hamasato, Eduardo Zarzana, Elaine, Felipe, Glaucie, Heidge, Ísis, Ivony, Juliana, Karin, Kátia, Lucas, Luciana Vismari, Luciana Lippi, Luciana Cunha, Márcia Nagamine, Márcia Kahve, Márcio, Maria Isabel, Marina, Thiago, Tarso, Tereza pela convivência no laboratório ou em congressos, pelo constante aprendizado e pelos momentos de descontração.

Aos colegas e aos professores da Universidade McGill: Martini Culty, Amani, Annie, Charles, Daniel, Fan, Georges, Laurent Lecanu, Laurent Tillment, Malena e Monty.

Às alunas de Pós-Graduação da Anatomia: Rose e Janaína pelas conversas e ótimos momentos, assim como pelo imprescindível apoio nas técnicas laboratoriais.

À todos amigos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho, que por inúmeras vezes compreenderam minhas ausências mas sempre estiveram por perto e torceram incondicionalmente por mim.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, com apoio financeiro da **FAPESP** – Modalidade Projeto Temático (04-14128-0) e Modalidade Bolsa de Doutorado no País (05/01388-6).

Uma parte deste trabalho foi realizado no Laboratório do Professor Vassilios Papadopoulos, no Instituto de Pesquisa do Hospital Geral Universitário (RI-MUHC) da Universidade McGill (Montreal - Canadá), com apoio financeiro da **CAPES** – Modalidade PDEE (BEX-2185-07-5).

Eu poderia viver recluso numa casca de noz
e me considerar o rei do espaço infinito.

Shakespeare, Hamlet, Ato 2, Cena 2

RESUMO

SAKAI, M. **Efeitos do diazepam sobre o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich:** envolvimento do Receptor Periférico para Benzodiazepínico (PBR) ou Proteína Translocadora (TSPO). [Diazepam effects on Ehrlich ascitic tumor growth: role of Peripheral Benzodiazepine Receptor (PBR) or Translocator Protein (TSPO)]. 2009. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Os benzodiazepínicos são amplamente utilizados devido às suas propriedades ansiolíticas e sedativas mediadas pelo complexo $GABA_A$ no Sistema Nervoso Central. Porém, posteriormente foi demonstrado que os mesmos também atuam no Receptor Periférico para Benzodiazepínico (PBR), conhecido atualmente como Proteína Translocadora (TSPO), expresso tanto em células normais como também em células tumorais. O presente trabalho avaliou os efeitos *in vivo* da administração de diazepam sobre o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos e o envolvimento da TSPO mediando este efeito. Mais especificamente, estudamos o crescimento tumoral, fases do ciclo e morte celular, assim como a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e a expressão de TSPO nas células tumorais, após o tratamento com diazepam, Ro5-4864 ou clonazepam (3,0 mg/kg, via oral, por 7 dias). Quantificou-se também os níveis de diazepam no plasma e no fluido ascítico dos camundongos portadores do tumor. Finalmente, o sequenciamento parcial de *Tspo* das células do tumor de Ehrlich e a presença de receptores de estrógeno foram avaliadas. Os resultados mostraram que o tratamento *in vivo* com diazepam aumentou: (1) o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich e a porcentagem de células em fase G2-M, (2) a porcentagem de células positivas para anexina e PI, (3) a produção de EROs. No mesmo sentido, o tratamento *in vivo* com Ro5-4864: (4) Aumentou o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich e a porcentagem de células em fase S, (5) Não modificou a porcentagem de morte celular, (6) Aumentou a produção de EROs. Por outro lado, o tratamento *in vivo* com clonazepam não modificou: (7) quer o crescimento do tumor quer o ciclo celular, (8) a porcentagem de morte celular, (9) a produção de EROs. Além disso, o tratamento *in vivo* com diazepam não interferiu com a expressão de TSPO (*western blot* e citometria de fluxo) ou com os valores de Kd e Bmax de PK11195 (*binding*)

presentes nas células do tumor de Ehrlich; entretanto, detectou-se a presença de polímeros, de alta porcentagem de células positivas para TSPO e uma alta afinidade de PK11195 por TSPO. Este mesmo tratamento resultou em níveis quantificáveis de diazepam no plasma e no fluido ascítico de animais portadores do tumor de Ehrlich. Finalmente, o sequenciamento parcial da *Tspo* presente nas células tumorais revelou 3 mutações nos nucleotídeos, sendo 1 delas silenciosa. Desta forma, estes resultados sugerem que as ações *in vivo* do diazepam sobre o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich ocorram de maneira dependente e direta na TSPO existente em células do tumor de Ehrlich. Essas ações parecem envolver um aumento da produção de EROs e não modificam a expressão de TSPO. Finalmente o padrão farmacológico e bioquímico de expressão de TSPO nas células do tumor de Ehrlich pode indicar um papel dos mesmos na patogênese do câncer.

Palavras-chave: Benzodiazepínicos. Diazepam. Neuroimunomodulação. PBR. TSPO. Tumor de Ehrlich.

ABSTRACT

SAKAI, M. **Diazepam effects on Ehrlich ascitic tumor growth:** role of Peripheral Benzodiazepine Receptor (PBR) or Translocator Protein (TSPO). [Efeitos do diazepam sobre o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich: envolvimento do Receptor Periférico para Benzodiazepínico (PBR) ou Proteína Translocadora (TSPO)]. 2009. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Benzodiazepines are widely used due to their anxiolitic and sedative properties, acting on specific site coupled to $GABA_A$ complex in the Central Nervous System. However, benzodiazepines have been shown to have high affinity for Peripheral Benzodiazepine Receptor site (PBR), now renamed as Translocator Protein (TSPO), expressed in normal cells, and being up-regulated on cancer cells. The present study evaluated the diazepam *in vivo* effects on Ehrlich ascitic tumor growth in mice and also the TSPO role in mediating this effect. Specifically we evaluated the tumor growth, cell cycle and cell death, and also the Reactive Oxygen Species (ROS) production and TSPO expression on tumor cells after diazepam, Ro5-4864 or clonazepam treatments (3.0 mg/kg, per oral, during 7 days). Furthermore, diazepam levels on plasma and on ascitic fluid taken from Ehrlich ascitic tumor bearing mice were quantified. Finally, the parcial *Tspo* sequencing on Ehrlich cells and Estrogen Receptor detection was evaluated. Results showed that diazepam *in vivo* treatment increased: (1) Ehrlich tumor growth and percentage of cells on G2-M phase, (2) percentage of positive cells for both annexin and PI, (3) ROS production. In the same way, Ro5-4864 *in vivo* treatment: (4) increased Ehrlich tumor growth and percentage of cells on S phase, (5) did not change the percentage of cell death, (6) increased ROS production. On the other hand, clonazepam *in vivo* treatment did not modify: (7) both Ehrlich tumor growth and cell cycle, (8) the percentage of cell death, and, (9) ROS production. Moreover, the *in vivo* diazepam treatment did not interfere with TSPO expression (western blot and flow cytometry) or Kd and Bmax values for PK11195 (binding) detected on Ehrlich tumor cells; however, the presence of TSPO polymers, a high percentage of TSPO positive cells and a high PK11195 afinity were found on these cells. This same treatment resulted on diazepam levels that were quantified on plasma and ascitic fluid from Ehrlich tumor bearing mice. Finally, *Tspo*

partial nucleotide sequencing reaveled three point mutations, one of them is silent. Taken together, these data suggest that diazepam *in vivo* effects on Ehrlich tumor growth are TSPO-dependent. These actions may involve an increase on ROS production and seems not to be related to modifications on TSPO expression on tumor cells. Finally, TSPO pharmacological and biochemical properties on Ehrlich tumor cells are similar to those described in other tumor cells and may indicate a possible role for this protein on cancer pathogenesis.

Keyword: Benzodiazepines. Diazepam. Ehrlich tumor. Neuroimmunodulation. PBR. TSPO.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	-	Hormônio Adrenocorticotrófico
ANC	-	Carreador do Nucleotídeo Adenina
Bmax	-	Quantidade de sítios de ligação
BSA	-	Albumina Sérica Bovina
CBR	-	Receptores Centrais para Benzodiazepínicos
CD	-	*Cluster of Differentiation*
CDK	-	*Cyclin Dependent Kinase*
COX-2	-	Cicloxigenase-2
CRF	-	Fator Liberador de Corticotrofina
CYP	-	Enzima Citocromo P450
DBI	-	*Diazepam Binding Inhibitor*
DCFH-DA	-	2'7' – dicloro dihidroflurescéína diacetato
DEN	-	N-dietilnitrosamina
DMEM	-	*Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium*
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DNA	-	Ácido Desoxirribonucleico
DTT	-	Dithiothreitol
EDTA	-	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ER	-	Receptor de Estrógeno
EROs	-	Espécies Reativas de Oxigênio
FSC	-	*Foward Scatter*
FITC	-	Isoticianato de Fluoresceína
GAPDH	-	Gliceraldeído Fosfato Deidrogenase
HPLC	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IFN γ	-	Interferon γ
Ig	-	Imunoglobulina
IL	-	Interleucina
$GABA_A$	-	Ácido Gama Aminobutírico A
HPA	-	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
Kd	-	Constante de afinidade
LB	-	*Millers Luria Broth Base*
LPS	-	Lipopolisacarideo de E. Coli
MDMA	-	N-metil-3,4 metilenodioximetanfetamina
m.w.	-	Peso Molecular
NK	-	*Natural Killer*
NO	-	Óxido Nítrico
NOEL	-	*No Observed Effect Dose Level*
Onco-BCG	-	Cepa atenuada do bacilo Calmette-Guerin
PBR	-	Receptor Periférico para Benzodiazepínico
PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase
PGE	-	Prostaglandina E
PI	-	Iodeto de Propídeo
PK11195	-	Ligante de TSPO: Isoquinolona Carboxamida
PMSF	-	Phenyl-methylsulfonyl fluoride

PVDF	-	Polifluoreto de Polivinilideno
RNA	-	Ácido Ribonucleico
Ro5-4864	-	Ligante de TSPO: 4-cloro-diazepam
RU 486	-	Antagonista de receptores para glicocorticóides
SDS	-	Sodium dodecyl sulfate
SSC	-	*Side Scatter*
SFB	-	Soro Fetal Bovino
SI	-	Sistema Imunológico
SNC	-	Sistema Nervoso Central
SNS	-	Sistema Nervoso Simpático
Solução PBS	-	Solução *Phosphate Buffer Saline*
Solução TAE	-	Solução *Tris-Acetate-EDTA*
Solução TTBS	-	Solução *Tris-Tween Buffered Saline*
TAE	-	Tumor Ascítico de Ehrlich
TNF	-	Fator de Necrose Tumoral
TSH	-	Hormônio Tireotrófico
TSPO	-	Proteína Translocadora
Tspo	-	Gene da Proteína Translocadora
VDAC	-	Canal de Ânion Voltagem-Dependente

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fármacos ligantes de TSPO ou $GABA_A$ utilizados nos experimentos e suas principais características 55

Tabela 2 - *Primers* utlizados para o ensaio de PCR para *Tspo* 59

Tabela 3 - Efeitos da administração de diazepam (3,0mg/kg) ou solução controle deste sobre o volume, número de células tumorais/ml e número de células tumorais totais da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal) 70

Tabela 4 - Efeitos da administração de diazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre as fases do ciclo (fase G0-G1, S ou G2-M) de células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal) 72

Tabela 5 - Efeitos da administração de diazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre a porcentagem de necrose e de apoptose de células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal) 75

Tabela 6 - Efeitos da administração de diazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre a produção de EROs por células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal) 78

Tabela 7 - Efeitos da administração de Ro5-4864 (3,0mg/kg) ou solução controle deste sobre o volume, número de células tumorais/ml e número de células tumorais totais da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal) 80

Tabela 8 - Efeitos da administração de Ro5-4864 (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre as fases do ciclo (fase G0-G1, S ou G2-M) de células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal) 81

Tabela 9 - Efeitos da administração de Ro5-4864 (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre a porcentagem de morte de células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal) 83

Tabela 10 - Efeitos da administração de Ro5-4864 (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre a produção de EROs por células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal) 85

Tabela 11 - Efeitos da administração de clonazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre o volume, número de células tumorais/ml e número células tumorais totais da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal) 87

Tabela 12 - Efeitos da administração de clonazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre as fases do ciclo (fase G0-G1, S ou G2-M) de células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal) 88

Tabela 13 - Efeitos da administração de clonazepam (3,0mg/kg) ou solução controle deste sobre a porcentagem de apoptose ou de necrose de células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal) 90

Tabela 14 - Efeitos da administração de clonazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre a produção de EROs por células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal) 91

Tabela 15 - Efeitos da administração de diazepam 3,0mg/kg ou da solução controle deste sobre a quantidade de TSPO (razão TSPO/GAPDH) detectado por *western blot* em células tumorais de ascite induzida em camundongos pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal) 94

Tabela 16 - Efeitos da administração de diazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre a porcentagem de células positivas e quantidade de TSPO presente nas células da ascite induzida em camundongos pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal) 96

Tabela 17 - Efeitos da administração de diazepam 3,0mg/kg ou da solução controle deste sobre a Kd (constante de afinidade) e Bmax (quantidade de sítios de ligação) de PK11195 presentes nas células da ascite induzida em camundongos pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal) 99

Tabela 18 - Concentrações de diazepam mensuradas no plasma e fluido ascítico após a administração de 3,0mg/kg/dia, via oral, durante 7 dias, em camundongos portadores do tumor de Ehrlich 104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeitos da administração de diazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre o volume (A), número de células tumorais/ml (B) e número de células tumorais totais (C) da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal). Os dados representam a média ± desvio padrão, *p<0,05 em relação ao grupo controle (teste "t" de Student) 70

Figura 2 - Gráficos utilizados na análise do ciclo celular. (A) Citograma de células do tumor ascítico de Ehrlich ilustrando a população R1 analisada e equivalente às células tumorais e (B) Histograma do ciclo celular do tumor ascítico de Ehrlich ilustrando as três regiões analisadas: células em fase G0-G1 (pico verde), células em fase S (pico vermelho) e G2-M (pico azul) 71

Figura 3 - Efeitos da administração de diazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre as fases do ciclo (fase G0-G1, S ou G2-M) de células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal). Os dados representam a média ± desvio padrão, *p<0,05 em relação ao grupo controle (teste "t" de Student) 73

Figura 4 - Gráficos utilizados na análise da morte celular. (A) Citograma ilustrando a população R1 analisada e equivalente às células tumorais e (B) *Dot Plot* de células incubadas com anexina e iodeto de propídeo (PI). Os quadrantes indicados ilustram especificamente a porcentagem de células em apoptose (duplamente positivas para anexina e PI) e em necrose (somente positivas para PI) 74

Figura 5 - Efeitos da administração de diazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre a porcentagem de necrose e de apoptose de células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal). Os dados representam a média ± desvio padrão, *p<0,05 em relação ao grupo controle (teste "t" de Student) 76

Figura 6 - Efeitos da administração de diazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre a produção de EROs por células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x10^6 células/animal). Os dados representam a média ± desvio padrão, *p<0,05 em relação ao grupo controle (teste "t" de Student 78

Figura 7 - Efeitos da administração de Ro5-4864 (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre o volume (A), número de células tumorais/ml (B) e número de células tumorais totais (C) da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal). Os dados representam a média ± desvio padrão, **p<0,01 em relação ao grupo controle (teste "t" de Student) 80

Figura 8 - Efeitos da administração de Ro5-4864 (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre as fases do ciclo (fase G0-G1, S ou G2-M) de células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal). Os dados representam a média ± desvio padrão, *p<0,05 em relação ao grupo controle (teste "t" de Student) 82

Figura 9 - Efeitos da administração de Ro5-4864 (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre a produção de EROs por células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x10^6 células/animal). Os dados representam a média ± desvio padrão, *p<0,05 em relação ao grupo controle (teste "t" de Student) 85

Figura 10 - Efeitos da administração de clonazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre o volume (A), número de células tumorais/ml (B) e número de células tumorais totais (C) da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal). Os dados representam a média ± desvio padrão, * p<0,05 em relação ao grupo controle (teste "t" de Student) 87

Figura 11 - *Western blot* ilustrando bandas imunoreativas para TSPO e GAPDH. (A) Controle de peso molecular (coluna 1) e bandas imunoreativas para TSPO de extratos de proteína de adrenal (coluna 2), testículo (coluna 3) e tumor de Ehrlich (coluna 4). (B) Bandas imunoreativas para TSPO e GAPDH de extratos de proteína de células do tumor de Ehrlich do grupo controle (colunas 1-3) e do grupo tratado com diazepam (colunas 4-6) ... 93

Figura 12 - *Dot Plot* e Histograma representativos de células do tumor ascítico de Ehrlich, respectivamente. (A) população R1 analisada e equivalente às células tumorais. (B) histograma de sobreposição da fluorescência das células incubadas apenas com o anticorpo secundário conjugado a FITC (cinza) e outro de células incubadas com o anticorpo primário anti-TSPO e também o anticorpo secundário conjugado a FITC (verde) 95

Figura 13 - Gráficos representativos do *binding* específico e inespecífico de (A) células do tumor de Ehrlich (objeto de estudo), (B) células MDA-MB-231 e (C) células MA-10 (utilizadas como controle positivo) incubadas com duas diferentes concentrações de [^{3}H] PK11195 (1nM e 10nM) 97

Figura 14 - Gráficos representativos utilizados para a determinação de Kd e Bmax do ensaio de *binding* de PK11195 por células do tumor de Ehrlich. (A) Curva não linear com os valores de *binding* total, específico e inespecífico. (B) Representação linear dos valores de *binding* específico 98

Figura 15 - Fotomicrografia de pulmão, linfonodo pancreático-duodenal e baço de de camundongos inoculados com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal): (A e B) Pulmão com células do tumor de Ehrlich livres em espaco alveolar (seta); (C e D) Linfonodo pancreático-duodenal com invasão de células tumorais atraves do hilo (seta); (E e F) Baço com células tumorais na superfície capsular (seta). Coloração Hematoxilina-Eosina, Aumento de 20x 101

Figura 16 - Perfil cromatográfico da análise das concentrações de diazepam no fluido ascítico de animais portadores de tumor de Ehrlich: (A e B) Amostra de fluido ascítico de animais do grupo controle, (C e D) Amostra de fluido ascítico com concentração de 10ng/ml de diazepam utilizada na curva padrão, (E e F) Amostra de fluido ascítico de animais do grupo diazepam e coletada 1h após o último tratamento. Os perfis A, C e E mostram a detecção de diazepam nos tempos de retenção entre 2,1 e 2,3 e os perfis B, D e F mostram a detecção do padrão interno bromazepam nos tempos de retenção entre 1,4 e 1,6 103

Figura 17 - Concentrações de diazepam mensuradas no plasma e fluido ascítico após a administração de 3,0mg/kg/dia, via oral, durante 7 dias, em camundongos portadores do tumor de Ehrlich. As amostras foram coletadas nos tempos 0h, 1h, 6h e 24h após a última administração do diazepam. (n.d. = não detectável) 104

Figura 18 - Cromatograma do sequenciamento de *Tspo*. (A) Gráfico de qualidade de sequenciamento. As amostras apresentaram um alto *score* de qualidade de sequenciamento da região de interesse como indicado pela seta (aproximadamente entre a posição 150 e 550). (B) Quadro ilustrando em detalhes os nucleotídeos sequenciados e ilustrados com diferentes cores (A=adenina, C=citosina, G=guanina, T=timina), assim como sua posição como indicados pelas setas. Os picos detectados encontram-se espaçados, agudos e altos, parâmetros indicativos de acurácia da técnica 106

Figura 19 - Sequência parcial de nucleotídeos de *Tspo* de células do tumor de Ehrlich e de *Tspo* de células normais. Observa-se o alinhamento das sequências de nucleotídeos de *Tspo* das células do tumor de Ehrlich com a sequência de *Tspo* já publicada para camundongo. A dedução dos aminoácidos revelou que somente duas dessas mutações alteram a sequência dos aminoácidos (& - alanina 54 por glicina e alanina 168 por prolina) enquanto a outra mutação permanece silenciosa (# - prolina 132) 107

Figura 20 - *Western blot* ilustrando bandas imunoreativas para receptor de estrógeno β (ERβ). Controle de peso molecular (coluna 1) e bandas imunoreativas para ERβ (~ 50kDa e ~80kDa) de extratos de proteína de células do tumor de Ehrlich (coluna 2 - 4) 109

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 26

2 REVISÃO DE LITERATURA 28

2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO 28

2.2 BENZODIAZEPÍNICOS E O DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS 34

2.3 CARACTERIZAÇÃO DA TSPO E O ENVOLVIMENTO COM O CÂNCER 41

3 OBJETIVOS 49

3.1 OBJETIVOS GERAIS 49

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 49

4 MATERIAL E MÉTODOS 51

4.1 ANIMAIS 51

4.2 SOLUÇÕES 52

4.3 DROGAS E TRATAMENTO 54

4.4 CÉLULAS DO TUMOR DE EHRLICH 56

4.4.1 Obtenção das Células do Tumor de Ehrlich 56

4.4.2 Avaliação do Crescimento do Tumor de Ehrlich 56

4.5 CÉLULAS TUMORAIS MDA-MB-231 E MA-10 57

4.6 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DE *Tspo*..... 58

4.6.1 Extração e quantificação de DNA 58

4.6.2 PCR 58

4.6.3 Clonagem e sequenciamento 59

4.7 CITOMETRIA DE FLUXO 60

4.7.1 Citômetro de Fluxo 60

4.7.2 Ciclo Celular 61

4.7.3 Morte Celular 61

4.7.4 Produção de EROs 62

4.7.5 Detecção de TSPO 62

4.8 WESTERN BLOT 63

4.8.1 Extração de Proteína 63

4.8.2 Quantificação de Proteína 64

4.8.3 Eletroforese e Transferência 64

4.8.4 Imunodetecção de TSPO ou ER 65

4.9 ENSAIO DE *BINDING* POR PK11195 66

4.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DIAZEPAM 67

4.11 ANÁLISE HISTOLÓGICA 68

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA 68

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS 69

5.1 EXPERIMENTO 1 - AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM DIAZEPAM (AGONISTA DE TSPO E $GABA_A$) SOBRE O CRESCIMENTO E O CICLO CELULAR DO TAE 69

5.2 EXPERIMENTO 2 – AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM DIAZEPAM (AGONISTA DE TSPO E $GABA_A$) SOBRE APOPTOSE DE CÉLULAS TUMORAIS 73

5.3 EXPERIMENTO 3 - AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM DIAZEPAM (AGONISTA DE TSPO E $GABA_A$) SOBRE PRODUÇÃO DE EROS POR CÉLULAS DO TAE 77

5.4 EXPERIMENTO 4 - AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM RO5-4864 (LIGANTE DE TSPO) SOBRE CRESCIMENTO E CICLO CELULAR DO TAE 79

5.5 EXPERIMENTO 5 - AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM RO5-4864 (LIGANTE DE TSPO) SOBRE A MORTE DE CÉLULAS TUMORAIS 82

5.6 EXPERIMENTO 6 - AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM RO5-4864 SOBRE A PRODUÇÃO DE EROS POR CÉLULAS DO TAE 84

5.7 EXPERIMENTO 7 - AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM CLONAZEPAM (AGONISTA DE $GABA_A$) SOBRE O CRESCIMENTO E O CICLO CELULAR DO TAE 86

5.8 EXPERIMENTO 8 - AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM CLONAZEPAM (AGONISTA DE $GABA_A$) SOBRE A APOPTOSE DE CÉLULAS TUMORAIS 89

5.9 EXPERIMENTO 9 - AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM CLONAZEPAM (AGONISTA DE $GABA_A$) SOBRE A PRODUÇÃO DE EROS POR CÉLULAS DO TAE 90

5.10 EXPERIMENTO 10 - AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM DIAZEPAM SOBRE A EXPRESSÃO DE TSPO EM CÉLULAS DO TAE AVALIADAS POR MEIO DA TÉCNICA DE *WESTERN BLOT* E CITOMETRIA DE FLUXO 92

5.11 EXPERIMENTO 11 - AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM DIAZEPAM SOBRE OS VALORES DE Kd E BMAX POR PK11195 EM CÉLULAS DO TAE AVALIADOS PELO ENSAIO DE *BINDING* 96

5.12 EXPERIMENTO 12 - AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO *IN VIVO* COM DIAZEPAM SOBRE A DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS EM ÓRGÃOS INTRACAVITÁRIOS DE ANIMAIS PORTADORES DO TAE POR MEIO DE ANÁLISE HISTOLÓGICA 100

5.13 EXPERIMENTO 13 - AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA CINÉTICA DA CONCENTRAÇÃO DE DIAZEPAM NO FLUIDO ASCÍTICO E PLASMA DE ANIMAIS PORTADORES DO TAE E TRATADOS COM DIAZEPAM (0, 1, 6 E 24HS APÓS O ÚLTIMO TRATAMENTO) 102

5.14 EXPERIMENTO 14 - DETERMINAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO DE *Tspo* EM CÉLULAS DO TUMOR DE EHRLICH E COMPARÁ-LO COM A SEQUÊNCIA NORMAL DE CAMUNDONGO 105

5.15 EXPERIMENTO 15 - DETECÇÃO DE RECEPTORES DE ESTRÓGENO EM CÉLULAS DO TAE POR MEIO DA TÉCNICA DE *WESTERN BLOT* 108

6 DISCUSSÃO 110

7 CONCLUSÕES 122

7.1 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS 122

7.2 CONCLUSÃO GERAL 123

REFERÊNCIAS 124

1 INTRODUÇÃO [1]

Nos últimos anos as relações bidirecionais entre os Sistemas Nervoso Central (SNC) e Imune (SI) têm sido amplamente analisadas. Sabe-se que as interleucinas liberadas durante reações imuno-inflamatórias como a interleucina-1 (IL-1) afetam o comportamento. Por outro lado, alterações da atividade nervosa cerebral induzidas por estresse, ansiedade ou por ação de fármacos, produzem marcantes efeitos sobre a função imune. A existência de receptores comuns para citocinas e para fármacos em células do SNC e do SI, como neurônios, macrófagos e linfócitos responde, em parte, por essa reciprocidade de ações.

Neste contexto, mostrou-se que os benzodiazepínicos além de atuar em receptores $GABA_A$ centrais produzindo seus clássicos efeitos ansiolíticos, sedativos e relaxantes musculares, atuam também em outro tipo de receptor: Receptor Periférico para Benzodiazepínico (PBR), presente em células do sistema imune, células da adrenal e células tumorais, dentre outras. Devido aos avanços no conhecimento das função e localização do PBR, atualmente o mesmos é chamado de Proteína Translocadora 18 kDa (TSPO).

Os benzodiazepínicos foram inseridos na terapêutica clínica durante a década de 60 e várias moléculas desta classe foram desenvolvidas desde então, sendo amplamente utilizadas em todo o mundo. Entretanto, algumas pesquisas tem mostrado serem os benzodiazepínicos capazes de interferir com o desenvolvimento de algumas doenças, dentres elas em algumas infecções e tumores experimentais. Embora os mecanismos ainda não sejam completamente esclarecidos, acredita-se que a TSPO existente em células do sistema imunológico e também nas células tumorais seja um possível alvo dos efeitos induzidos por estas drogas.

De fato, alguns trabalhos têm mostrado a presença de uma maior densidade de TSPO em células tumorais, como nas células de carcinoma de ovário, linfoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma colo-retal, astrocitomas e tumor de mama.

---

[1] As referências bibliográficas encontram-se citadas no item 2 Revisão de Literatura

Estudos de imunoistoquímica correlacionaram positivamente a existência de uma maior expressão de TSPO nos tumores com o grau de malignidade dos mesmos. Este fato já foi observado para astrocitomas, carcinoma hepatocelular, carcinoma colo-retal, tumor de próstata e tumor de mama. Além disso, foi demonstrado que ligantes de TSPO como o diazepam, o PK11195 e o Ro5-4864 foram capazes de interferir com a proliferação de células de um tumor mamário humano BT-20 e células de hepatocarcinomas T1 causando: em baixas doses (1nM) um aumento de proliferação celular e em altas doses (1μM) uma diminuição desta proliferação.

Em trabalho anterior mostramos que o tratamento com diazepam (3,0 mg/kg) induziu um aumento do crescimento tumoral, fato este correlacionado com uma diminuição do número de leucócitos peritoneais e, tambem, da atividade de macrófagos observada por meio da avaliação de taxa de espraiamento e de níveis de NO. Foi também descrito que células do tumor de Ehrlich expressam TSPO na região nuclear e portanto apresentam potencial para serem alvo de efeitos diretos do diazepam.

Uma vez que 1- os benzodiazepínicos são amplamente utilizados, 2- a TSPO está presente em células tumorais e, 3- considerando que o uso de ligantes de TSPO sejam capazes de modificar a proliferação e apoptose de células tumorais *in vitro*, propomo-nos estudar os efeitos de um tratamento *in vivo* com diazepam sobre o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Especificamente, pretendemos verificar se este benzodiazepínico interfere com o crescimento tumoral por mecanismo dependente de TSPO.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO

Os estudos inter-disciplinares que mostram as relações bidirecionais entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema imunológico (SI) nos dias de hoje, tornam-se cada vez mais relevantes e despertam grande interesse da área biomédica. Embora as antigas observações de Galeno (2000 ac), já descrevessem serem mulheres melancólicas mais susceptíveis ao câncer que mulheres de natureza sanguínea, e outros relatos também mostrassem a existência dessas relações, apenas recentemente tem sido possível compreender, de forma mais lógica, os mecanismos a elas subjacentes.

Um estudo pioneiro desta área foi aquele conduzido por Hans Selye (1936). Este autor descreveu o desenvolvimento de uma síndrome que chamou de “adaptação geral” decorrente da exposição de um organismo a agentes nocivos; mostrou que estímulos físicos e psicológicos com decorrências comportamentais e endócrinas (dentre eles a exposição ao frio, injúria cirúrgica, exercício muscular intenso e intoxicações), produziam hipertrofia das adrenais, úlceras gástricas, atrofia de timo, baço e linfonodos (SELYE, 1998). Outro importante estudo foi o realizado por Bartrop e colaboradores que mostraram ser uma situação de estresse psicológico severo (o luto pela perda do companheiro) capaz de induzir a diminuição da proliferação de células T, aparentemente de maneira independente de alteração dos níveis hormonais, incluindo-se neste estudo, os glicocorticóides (BARTROP et al., 1977).

Desde então, diferentes abordagens experimentais têm sido importantes para o estudo das relações funcionais entre SNC e a resposta imunológica, em especial, os grupos de pesquisa têm buscado compreender e estabelecer, de maneira crítica, as vias neuroanatômicas, neuroquímicas e neuroendócrinas dessa relação bidirecional.

Uma abordagem relevante foi a que usou do condicionamento de respostas imunológicas. Desta forma, o uso de estímulos condicionados (ingestão de uma solução adocicada com sacarina) pareados com um estímulo incondicionado (a administração de ciclofosfamida, uma droga imunosupressora) foi abordado experimentalmente; os autores mostaram que a reapresentação do estímulo condicionado era capaz de inibir a produção de anticorpos contra hemácias de carneiro em ratos (ADER; COHEN, 1975) e aumentar a latência para aparecimento de sintomas como proteinúria e mortes, decorrentes de lupus sistêmico em camundongos (ADER; COHEN, 1982).

Neste mesmo sentido, lesões experimentais de áreas específicas como o *locus ceruleus* (área do SNC com maior concentração de corpos celulares de neurônios adrenérgicos) induzem, em ratos, a uma redução da produção de anticorpos contra albumina sérica bovina (BSA), do tamanho do timo, do número de células TCD4+ circulantes e da reação de hipersensibilidade do tipo tardia (JOVANOVA-NESIC et al., 1993; NIKOLIC et al., 1993).

Não somente as lesões acima descritas, mas também variações psicológicas assim como estados de ansiedade e depressão induzidos por estímulos estressores podem interferir com a imunidade. Desta forma, já foram descritas alterações induzidas pelo estresse como uma redução significante na atividade de células *Natural Killer* (NK), na atividade de macrófagos e neutrófilos, na proliferação de linfócitos T e B, alterações estas associadas a uma redução significante da resistência ao desenvolvimento de infecções e de neoplasias em animais de laboratório (WU et al., 2000; FONSECA et al., 2002; MORGULIS et al., 2004; SA-ROCHA et al., 2006; ALVES et al., 2007; PALERMO-NETO et al., 2008; QUEIROZ JDE et al., 2008).

Mais especificamente, já foi demonstrado em nossos laboratórios que animais submetidos a um estresse fisico ou psicológico apresentaram elevados níveis de corticosterona, diminuição da atividade de macrófagos peritoneais e aumento do crescimento do tumor ascítico de Ehrlich (PALERMO-NETO et al., 2003; PALERMO-NETO et al., 2008). Trabalho semelhante mostrou que este mesmo tipo de estresse induziu a uma mielosupressão e a uma piora no desenvolvimento de uma infecção experimentalmente induzida por *Listeria*

monocytogenes (QUEIROZ JDE et al., 2008). Neste sentido, camundongos machos submissos apresentam elevados níveis de ansiedade, reduzida atividade de células NK e aumento de metástases pulmonares induzidas pelo implante de melanoma B16/F10 quando comparados com animais dominantes (SA-ROCHA et al., 2006). Animais estressados por conviverem com seus conespecíficos doentes apresentaram tanto um aumento do *turnover* de noradrenalina hipotalâmica, reduzida atividade de macrófagos e aumento do crescimento do tumor de Ehrlich (ALVES et al., 2006; ALVES et al., 2007), quanto um déficit na maturação de células dendríticas e no desenvolvimento de uma hipersensibilidade do tipo tardia induzida por ovalbumina (TOMIYOSHI et al., 2009).

Importante lembrar que alguns estressores não suprimem simplesmente a resposta imunológica, mas podem induzir também a uma mudança no padrão de citocinas Th1/Th2 com um direcionamento para o perfil Th2; isso pode ser causado por corticosteróides e catecolaminas induzindo uma supressão nas citocinas de perfil Th1 ou aumento da síntese das citocinas de perfil Th2 (SALICRU et al., 2007). Desta forma, indivíduos estressados podem apresentar um padrão de resposta inflamatória que aumente a susceptibilidade dos mesmos a algumas doencas, como a asma e outras doencas alérgicas (MARSHALL; AGARWAL, 2000). De fato, foi observado em nossos laboratórios que ratos estressados e imunizados com ovoalbumina apresentaram maior edema pulmonar e contagem de células do lavado broncoalveolar indicativos de piora do quadro inflamatório em modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar (PORTELA CDE et al., 2002).

Neste contexto, o SNC regula a atividade do SI principalmente através de dois mecanismos: (a) uma resposta hormonal ao estresse com a consequente produção de glicocorticóides e (b) uma resposta do Sistema Nervoso Simpático – SNS, via liberação de catecolaminas (SAPOLSKY et al., 2000; NANCE; SANDERS, 2007). Outras moléculas têm sido descritas como importantes nas relações entre estes dois grandes sistemas, dentre as quais: dopamina, opióides endógenos, melatonina e neuropeptídeos (substância P, peptídeo intestinal vasoativo) (FONSECA et al., 2005; HERBERTH et al., 2008; LEVITE, 2008; COUTO-MORAES et al., 2009). Sabe-se que alguns fármacos ou drogas psicoestimulantes também são capazes de ativar o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) ou até mesmo

atuarem como estressores químicos e, consequentemente, interferir com a imunidade de ratos e camundongos, dentre eles podemos citar os benzodiazepínicos, a anfetamina, a N-metil-3,4 metilenodioximetanfetamina (MDMA) e a picrotoxina (LAZZARINI et al., 2003; SAKAI et al., 2006a; LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2008; STANKEVICIUS et al., 2008; DE PAULA et al., 2009).

Dados de literatura mostram que a ativação do eixo HPA e quanto do SNS em resposta ao estresse altera tanto a capacidade funcional quanto o padrão migratório das células do sistema imune, estas alterações são dependentes das características do agente estressor, em especial, de sua intensidade, tipo (fisiológico ou psicológico) e tempo de exposição (agudo ou crônico) (SAPOLSKY et al., 2000; DHABHAR, 2002; 2003; ENGLER et al., 2004), e também são dependentes das características comportamentais existentes e estratégias de *coping* do indivíduo submetido ao estressor (VEGAS et al., 2006; AZPIROZ et al., 2008) . As respostas elaboradas em consequência destes estímulos são geralmente adaptativas a curto prazo; no entanto, podem também ser prejudiciais, especialmente quando o estímulo estressor se mantém por um período prolongado ou crônico (SELYE, 1998; SAPOLSKY et al., 2000; DHABHAR, 2003; MCEWEN, 2007).

Relações no sentido oposto, ou seja, do sistema imune para o sistema nervoso também têm sido estudadas. Neste sentido, Besedovsky e colaboradores mostraram, de maneira pioneira, que um aumento na produção de anticorpos induzido por hemácias de carneiro era acompanhado de um aumento de aproximadamente até três vezes nas concentrações séricas de corticosterona (BESEDOVSKY, H. et al., 1975). Posteriormente, estes mesmos autores mostraram um aumento de até 100% na atividade elétrica da érea ventromedial do hipotálamo de ratos durante o pico da formação de anticorpos em resposta a uma imunização prévia (BESEDOVSKY, H.; SORKIN, 1977; BESEDOVSKY, H. et al., 1977). Em seu conjunto, estes resultados levavam a crer que a ativação do sistema imune e a consequente produção de mediadores solúveis provocava uma resposta endócrina desencadeada pelas ações destes mediadores no SNC. Posteriormente foi demonstrado que dentre os fatores liberados por leucócitos, a administração de Interleucina (IL) -1 (mas não o fator de necrose tumoral - TNF, IL-2 ou Interferon γ – IFN γ) induzia a um aumento não somente dos níveis circulantes de corticosterona,

mas também do hormônio adrenocorticotrofico (ACTH) (BESEDOVSKY, H. et al., 1986). O envolvimento da liberação do fator liberador de corticotrofina (CRF) como um evento essencial para a ativação do eixo HPA induzido por IL-1, foi subsequentemente estudado, sugerindo a existência de um circuito de feedback imunoregulatório, entre o SI e SNC (BERKENBOSCH et al., 1987; DEL REY et al., 1987). Alguns autores sugerem que esse circuito tenha um relevante papel no controle de reações inflamatórias excerbadas e expansão inespecífica de células imunes (BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, 2000; DEL REY; BESEDOVSKY, 2000; BOTTASSO et al., 2009; ROGGERO et al., 2009).

Posteriormente, mostrou-se que a injeção intraperitoneal de IL-1 promovia não apenas um decréscimo no conteúdo de noradrenalina, mas, também, um aumento do metabolismo e *turnover* deste neurotransmissor (relação MHPG/NE) no hipotálamo de ratos (KABIERSCH et al., 1988). Outros trabalhos correlacionaram estas alterações no metabolismo da noradrenalina com um aumento dos níveis de corticosterona, mostrando que o mecanismo pelo qual a IL-1 ativava o eixo HPA envolvia modificações no metabolismo da noradrenalina hipotalâmica e um aumento da atividade de neurônios noradrenérgicos (DUNN, 1988; CHULUYAN et al., 1992). Ainda nesta linha de pesquisa, trabalhos atuais tem mostrado que outras citocinas, em menor potência, também são capazes de induzir um aumento de atividade do eixo HPA e que outros mecanismos (que não somente os que envolvem o metabolismo da noradrenalina) também respondam a injeções de interleucinas periféricas (DUNN, 2006).

Em nossos laboratórios, trabalhos realizados por Basso e colaboradores, mostraram que uma reação alérgica intestinal é capaz de alterar tanto o comportamento dos animais quanto a atividade de células do núcleo paraventricular do hipotálamo de camundongos de maneira dependente nos níveis circulantes de Imunoglubulina (Ig) E em camundongos (BASSO et al., 2003). Estes correlatos neurais também foram demonstrados em modelo murino de asma, confirmando ser um mecanismo dependente de IgE, mediado por degranulação de mastócitos e não necessitando de infiltrado inflamatório pulmonar (COSTA-PINTO et al., 2005; COSTA-PINTO et al., 2007). Estes trabalhos, mais uma vez, reforçam a existência

de uma relação direta entre a função do SNC e a presença de uma resposta imunológica.

Neste mesmo sentido, a administração periférica de lipopolisacarídeo de *E. Coli* (LPS) ou de interleucinas (como a IL-1) podem modificar o comportamento de camundongos induzindo um padrão de respostas chamadas de comportamento doentio e que incluem febre, anorexia, diminuição da atividade exploratória e da interação social (DANTZER et al., 1998; KELLEY et al., 2003). Importante salientar que o comportamento doentio não deve ser compreendido como um estado de depressão inespecífica e/ou generalizada do SNC, um efeito indesejável da doença, mas sim como uma estratégia orgânica altamente organizada que visa a adaptação do animal ao estímulo (no caso, uma infecção) e que, em última instância, pode ser crítico para a sua sobrevivência (HART, 1988). Sabe-se também que a expressão do comportamento doentio induzido por LPS pode ser dependente de vários fatores individuais; dentre eles, podemos citar a idade e o *ranking* social (COHN; DE SA-ROCHA, 2006; GODBOUT et al., 2008; KINOSHITA et al., 2009).

Desta forma, acredita-se que a sinalização de eventos imunológicos em curso na periferia para o SNC ocorra de duas maneiras diferentes, embora não excludentes. A primeira pode ser chamada de via neural e é representada fundamentalmente pelo nervo vago (KONSMAN et al., 2002; PARNET et al., 2002). Assim, relatou-se que a liberação de IL-1 por macrófagos estimulados por LPS é capaz de estimular fibras vagais, as quais transmitiriam a informação para o SNC. De fato, a vagotomia cirúrgica evitou as manifestações de comportamento doentio induzidas pelo LPS ou IL-1 (MAIER et al., 1998; KONSMAN et al., 2002; CAMPISI et al., 2003). Outra via de comunicação é chamada de humoral; neste caso as citocinas produzidas após a injeção de LPS ou IL-1 alcançariam a corrente sanguínea e a sua mensagem atingiria o cérebro por meio de dois intermediários. Um deles é representado pelas células endoteliais que expressam enzimas (Cicloxigenase-2 (COX-2) e Prostaglandina E sintetase (PGE)), que quando induzidas, levam à produção de prostaglandina E_2 (PGE_2); o outro intermediário é representado por células da micróglia (macrófagos) localizadas em regiões específicas nas quais a barreira hematoencefálica é permeável (plexo coróide e órgãos circunventriculares) (KONSMAN et al., 2002).

Finalmente, haveria uma razão bioquímica lógica que justificaria essas interações bidirecionais: os sistemas neuro-endócrino e imune compartilham de receptores para citocinas, neurotransmissores, hormônios e neuropeptideos (BLALOCK, 1989; 1994). Mais que isso, produtos originalmente tidos como específicos de cada desses sistemas coexistem em sistema endócrino, linfóide e nervoso, ou seja, mostrou-se que há citocinas sendo produzidas no SNC e, também, hormônios como ACTH e TSH sendo sintetizados em células linfóides (BLALOCK, 1989; 1994; 2005). Estes fatos, em seu conjunto, têm embasado molecularmente a noção da existência de um relacionamento bidirecional entre os sistemas neuro-endócrino e imune.

2.2 BENZODIAZEPÍNICOS E O DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS

Os benzodiazepínicos foram inseridos na terapêutica clínica durante a década de 60. Diversos fármacos da classe dos benzodiazepínicos têm sido desenvolvidos e, atualmente, acredita-se que existam mais de 100 substâncias desta classe comercialmente disponíveis; dentre elas, destacam-se clinicamente o diazepam, o clonazepam, o lorazepam, o alprazolam, o bromazepam e o midazolam.

Os efeitos ansiolíticos, anti-convulsivantes, sedativos, e relaxante muscular, associados a algumas características positivas dessa classe de fármacos como a ampla margem de segurança do ponto de vista cardiovascular, a baixa toxicidade e a menor capacidade de criar dependência, têm contribuído para que esses medicamentos sejam amplamente utilizados em terapêutica humana ou animal. O principal mecanismo de ação descrito para a os efeitos acima relatados, é decorrente da interação dos benzodiazepínicos com o complexo formado pelo receptor do ácido gama aminobutírico A e canais de cloro ($GABA_A$). Após ligação com agonistas, ocorre uma mudança conformacional das proteínas que formam o canal de íons cloreto, ocasionando este fato um rápido influxo de íons Cl^- para o

interior da célula, hiperpolarizando-a. Assim, é importante salientar que a neurotransmissão GABAérgica mediada por esses receptores é inibitória.

Porém, além do $GABA_A$, recentemente foi descrito outro sítio de ligação para os benzodiazepínicos; este receptor está localizado, em sua maioria, fora do SNC sendo denominados Receptor Periférico para Benzodiazepínico (PBR) ou, mais recentemente, de Proteína Translocadora (TSPO) (BRAESTRUP; SQUIRES, 1977; PAPADOPOULOS et al., 2006a). Este receptor já foi descrito em tecidos esteroidogênicos como adrenal e testículos (PAPADOPOULOS et al., 1990; PAROLA et al., 1991), em células do sistema imune como macrófagos e neutrófilos (LENFANT et al., 1985; COSENTINO et al., 1996) e em células tumorais (HARDWICK, M. et al., 1999; HAN et al., 2003), como descrito em maiores detalhes no próximo item.

Diversos estudos vêm relatando o amplo uso e prescrição de benzodiazepínicos, até mesmo, em alguns casos, o seu uso indiscriminado. Dentre os países que mais consomem benzodiazepínicos no mundo estão: Estados Unidos, Japão, Brasil, Espanha e Inglaterra (WHO, 1996). De acordo com a literatura internacional os índices de consumo de benzodiazepínicos encontram-se, em sua maioria, na faixa de 2,5% a 17,6% da população; sendo que essa variação depende, dentre outros fatores, do período de uso considerado e da definição de uso dos benzodiazepínicos nos diferentes estudos (ZANDSTRA et al., 2002). Em pesquisa realizada no Chile, a prevalência do uso de benzodiazepínicos foi de 3,84% (FRITSCH MONTERO et al., 2005) sendo que 5,9% dos usuários relataram uma frequência diária de uso por período maior ou igual a 12 meses (BUSTO et al., 1996). O uso de benzodiazepínicos em países em desenvolvimento e desenvolvidos foi abordado comparativamente entre Chile e Canadá; mostrou-se que o uso total de benzodiazepínicos era similar, embora o padrão desse uso tenha variado entres os dois países (RUIZ et al., 1993). Em outro estudo, mostrou-se que o uso dos benzodiazepínicos na Nova Escócia era o dobro daquele feito na Austrália; mostrou-se, ainda, que algumas das diferenças encontradas eram decorrrentes dos tipos de fármacos desta classe disponíveis nos diferentes países (SMITH et al., 2008).

Dados de uma pesquisa realizada pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP)

mostraram que os benzodiazepínicos são os fármacos com efeitos ansiolíticos mais utilizados no Brasil. De fato, o relatório do CEBRID sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil em 2001 mostra que os benzodiazepínicos foram utilizados ao menos uma vez na vida por 2,2% da população masculina e 4,3% da população feminina (CARLINI et al., 2002). Em 2005, as porcentagens relatadas pelo CEBRID apontaram um aumento expressivo do número de usuários, ou seja, indicaram uma porcentagem de 3,4% da população masculina e 6,9% da população feminina. Mais especificamente, estes valores estavam elevados principalmente quando a população de estudo pertencia à faixa etária acima dos 35 anos; nesta faixa etária, 4,4% dos homens e 8,0% das mulheres usavam benzodiazepínicos. Este relatório é relevante pois o levantamento foi realizado em 108 das maiores cidades brasileiras, isto é, com mais de 200 mil habitantes e abrangeu cerca de 8 mil entrevistados (CARLINI, 2006).

Neste sentido, é importante destacar que apesar de pequenas variações descritas nos padrões de uso dos benzodiazepínicos mundialmente, um fato foi comum a todos os estudos acima, o uso de medicamentos desta classe é amplo e tem aumentado nos últimos anos nos diferentes países e faixas etárias avaliadas.

Sabe-se que a dose de diazepam utilizada em humanos depende da finalidade e via de administração; entretanto, a dose ansiolítica frequentemente prescrita é de 5 a 10 mg, administrada por via oral. As concentrações plasmáticas de diazepam após essa dose em humanos é de 24,1 a 173,1ng/ml duas horas após administração oral (ATTA-POLITOU et al., 1999). Outra publicação mostrou que a administração diazepam (10mg) por via oral induziu uma concentração plasmática máxima de 510,8ng/ml no tempo 1,5h, sendo que ainda foi possível detectar aproximadamente 100ng/ml de diazepam 48hs após a administração em humanos (ROUINI et al., 2008). Já o uso de 5mg de diazepam, por via intravenosa, induziu uma concentração máxima de aproximadamente 340ng/ml, 30 minutos após sua administração sendo que 50ng/ml ainda eram detectados até 10h após (KAMALI, 1993).

Em camundongos, as doses ansiolíticas de diazepam foram determinadas por meio de estudos comportamentais. Embora já tenham sido relatadas algumas diferenças na sensibilidade aos efeitos do diazepam para diferentes linhagens de

ratos e camundongos (GRIEBEL et al., 2000; MECHAN et al., 2002); doses entre 1 a 4 mg/kg (via oral, s.c. ou i.p.; administradas agudamente ou por 8 dias) são consideradas ansiolíticas por aumentarem o número de entradas e a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (RODGERS et al., 1992; GRIEBEL et al., 2000; HAGENBUCH et al., 2006). Neste mesmo sentido, a concentração intra-cerebral de diazepam parece também ter correlação direta com seus efeitos ansiolíticos em ratos e camundongos (FRIEDMAN et al., 1986; DAILLY et al., 2002).

Diversas evidências experimentais têm apontado para a capacidade dos benzodiazepínicos em modificar a resposta imunológica, interferindo desta forma com a evolução de doenças. Estudo conduzido por Massoco e colaboradores mostrou que camundongos tratados com diazepam na dose de 1,5 a 3,0mg/kg, apresentavam aumento dos níveis circulantes de corticosterona e redução da atividade de macrófagos peritoneais ativados pelo Onco-BCG; especificamente, observaram uma redução dos índices de espraimento e fagocitose, assim como dos níveis de H_2O_2 liberados por estas células (MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, 1999). Em outro estudo, mostrou-se que o tratamento agudo de ratos com doses elevadas de diazepam (10mg/kg) diminuiu o pico do edema inflamatório induzido pela aplicação de carragenina na pata. Este efeito anti-inflamatório foi, no entanto, parcialmente revertido pela adrenalectomia cirúrgica (LAZZARINI et al., 2001), assim como pelo pré-tratamento com RU 486 (um antagonista de receptores para glicocorticóides) e com metirapona (adrenalectomia farmacológica) (LAZZARINI et al., 2003), mostrando o importante papel dos glicocorticóides neste fenômeno.

Não somente o tratamento com diazepam, mas também o tratamento com outras drogas ligantes de TSPO (Ro5-4864 e PK11195) interferem com a imunidade. Desta forma, o tratamento *in vitro* com diazepam, Ro5-4864 e PK11195 diminui a proliferação de linfócitos T e B (RAMSEIER et al., 1993) e a atividade de células NK (BESSLER et al., 1997). O tratamento *in vivo* com Ro5-4864 diminuiu o edema de pata induzido por carragenina em ratos (LAZZARINI et al., 2001) e os níveis de IL-6 e IL-13 obtidas do exsudato pleural em modelo de pleurisia experimental em camundongos (TORRES et al., 2000). Porém, estes efeitos anti-inflamatórios poderiam, em alguns casos, serem considerados desejáveis e

benéficos. Desta forma, mostrou-se que camundongos Mrl/Lpr (que desenvolvem patologias inflamatórias similares ao lupus eritematoso) quando tratados com Ro5-4864 e PK11195 desenvolveram uma menor sintomatologia e um número reduzido de lesões cutâneas como hiperqueratose, acantose e infiltrado inflamatório (BRIBES et al., 2003b) e, também, uma reduzida resposta inflamatória pulmonar e alveolite (BRIBES et al., 2003a).

Em outro trabalho foi demonstrado que ratos cujas mães foram tratadas com diazepam na dose de 1,25mg/kg/dia (durante os dias GD14 a GD15) apresentavam uma diminuição da proliferação de linfócitos (SCHLUMPF et al., 1989) sendo estes efeitos posteriormente atribuídos a ações do diazepam em sítios periféricos para benzodiazepínicos (SCHLUMPF et al., 1990). Posteriormente, mostrou-se que este mesmo tratamento induziu um maior desenvolvimento da infecção experimental induzida por *Trichinella spiralis*, como evidenciado pelo maior número de larvas musculares encontradas na prole de ratos (SCHLUMPF et al., 1994). No mesmo sentido, resultados semelhantes foram descritos em modelo experimental de tuberculose, ou seja, o tratamento pré-natal com diazepam (1,5mg/kg/dia) induziu um aumento na mortalidade e na quantidade de lesões hepáticas, esplênicas e pulmonares induzidas por *Mycobacterium bovis* na prole de hamsters (SCHLUMPF et al., 1994; RIGHI et al., 1999; UGAZ et al., 1999); resultados semelhantes foram obtidos com hamsters tratados com diazepam na fase adulta (2,0 a 3,0 mg/kg/dia) (RIGHI et al., 1999).

Em relação ao desenvolvimento de tumores, sabe-se que o tratamento com diazepam (1,7 a 2,5mg/Kg) induziu um aumento do crescimento de tumores, especificamente, em modelos de tumor de mama transplantável R3230AC em ratos (KARMALI et al., 1979; HORROBIN; TROSKO, 1981) e do tumor de Walker 256 transplantado no rim de ratos (KARMALI et al., 1980). Em nossos laboratórios, mostramos que o tratamento de camundongos com diazepam na dose de 3,0 mg/kg (mas não de 0,6 e 1,0 mg/Kg) induziu um maior crescimento do tumor ascítico de Ehrlich; este fato foi associado a uma redução da atividade de macrófagos peritoneais (menor índice de espraiamento e liberação de óxido nítrico - NO por estas células) (SAKAI et al., 2006a).

Outros estudos relacionados ao uso de benzodiazepínicos e desenvolvimento de neoplasias foram realizados em modelos experimental de hepatocarcinogênese. Desta forma, camundondongos B6C3F1 que foram submetidos a um protocolo de iniciação de carcinogênese com N-dietilnitrosamina (DEN) e que, posteriormente, receberam concentrações de 0,05% a 0,15% de diazepam ou oxazepam em sua dieta, apresentaram maior incidência, área de focos proliferativos e neoplasmas hepatocelulares (DIWAN et al., 1986). Além disso, após 21 semanas de tratamento com diazepam, observou-se que a incidência de adenomas hepáticos em camundongos injetados com DEN era correspondente a 0% nos animais controle, a 25% nos que receberam diazepam 0,5% e a 88% nos que receberam diazepam 0,15%. Neste mesmo sentido, resultados similares foram encontrados após 33 e 53 semanas, avaliando-se não somente os focos característicos de adenomas mas, também, os de carcinomas hepatocelulares (DIWAN et al., 1986). Entretanto, estes resultados não foram observados quando os camundongos foram injetados com DEN e tratados com o benzodiazepínico clonazepam (DIWAN et al., 1989).

Uma extensa pesquisa posterior do Programa Nacional de Toxicologia (NTP) dos Estados Unidos também mostrou que a exposição prolongada de oxazepam (125, 2500, 5000 ppm na ração) foi capaz de promover experimentalmente tumores hepáticos (adenomas e carcinomas hepatocelulares) em camundongos machos e fêmeas B6C3F1 e Swiss (NTP, 1993) mas não em ratos (NTP, 1998; BUCHER et al., 1998). Embora o mecanismo ainda não esteja elucidado, essa diferença de resultados em camundongos e ratos tem sido atribuída a uma indução de diferentes subtipos da enzima citocromo P450 (CYP) para o metabolismo de diazepam e oxazepam. Especificamente, sabe-se que há indução de ambos subtipos de enzimas CYP2B e CYP4A em camundongos porém somente de CYP2B em ratos (PARKINSON et al., 2006).

A Agência Internacional para a Pesquisa do Câncer (IARC), órgão ligado à Organização Mundial da Saúde, analisa e publica dados sobre avaliação de riscos de carcinógenos em humanos. Esta agência em 1996, produziu um relatório em forma de monografia contendo uma avaliação preliminar dos riscos decorrentes do uso dos benzodiazepínicos. Apesar de algumas evidências experimentais *in vitro* e *in vivo*, após análise conjunta dos resultados, classificou-se o diazepam como uma

substância com evidências inadequadas de indução de carcinogênese em humanos e em animais (pertencente ao Grupo 3); o oxazepam, entretanto, foi classificado como uma substância com evidências inadequadas apenas em humanos, mas suficientes para animais (pertencente ao Grupo 2B) (WHO, 1996)

Uma revisão mais atualizada apresentando informações sobre testes de genotoxicidade e carcinogenicidade de 51 benzodiazepínicos e análogos (41 destes ainda são comercializados) foi publicada em 2007 (BRAMBILLA et al., 2007). Destes 51 fármacos, 12 (23,5%) não apresentaram registros de testes de genotoxicidade e carcinogenicidade realizados e 39 (76,5%) apresentaram registro de ao menos 1 teste. Destes 39 benzodiazepínicos, ao menos 12 (30,8%) apresentaram ao menos 1 resultado positivo para um desses testes. O diazepam foi o fármaco mais estudado, apresentando alguns resultados positivos e negativos nos ensaios de genotoxicidade; e, também, resultados positivos em testes de carcinogenicidade apenas em camundongos (mas não para ratos, hamsters e gerbils). Os autores concluíram que o número limitado ou insuficiente de estudos e de ensaios de genotoxicidade e carcinogenicidade dos benzodiazepínicos possa ser decorrente de fatores ligados ao tempo de uso, já que estes fármacos foram introduzidos na terapêutica na década de 60 e a maioria dos testes de genotoxicidade e carcinogenicidade foram regulamentados há apenas 20 anos atrás (BRAMBILLA et al., 2007).

Desta forma, entende-se que atualmente os benzodiazepínicos sejam fármacos amplamente utilizados principalmente pelos seus efeitos ansiolíticos e sedativos; entretanto, os mesmos apresentam alguns efeitos que poderiam ser chamados de colaterais sobre o sistema imunológico e/ou sobre as células tumorais. De fato, as evidências experimentais, em sua maioria, tem apontado para uma importante relação entre o uso de benzodiazepínicos e o risco para um maior desenvolvimento de doenças como infecções e tumores. Esta relação, assim como os mecanismos a ela subjacentes, ainda não se encontram completamente esclarecidos, mas é possivel que os efeitos dos benzodiazepínicos sobre o sistema imunológico e sobre as células tumorais estejam embasados na existência, e também, em uma ação dos mesmos no Receptor Periférico (PBR) também chamado de Proteína Translocadora (TSPO).

2.3 CARACTERIZAÇÃO DA TSPO E O ENVOLVIMENTO COM O CÂNCER

O Receptor Periférico para Benzodiazepínico (PBR) foi inicialmente descrito como um sítio de afinidade para o diazepam em tecidos periféricos de ratos, mas que apresentava propriedades farmacologicamente distintas dos receptores centrais para benzodiazepínicos (CBR) associados aos canais de cloro regulados pelo ácido gama-aminobutírico (GABA) (BRAESTRUP; SQUIRES, 1977). Por este motivo histórico, esta denominação é amplamente aceita na literatura científica, embora recentemente tenha sido proposta uma nova nomenclatura para esta molécula, considerando os avanços no conhecimento de sua estrutura, sua função molecular e a localização subcelular desta proteína (de PBR para Proteína Translocadora 18kDa - TSPO). Dentre as principais razões para a mudança do nome destacam-se: 1- não apenas os benzodiazepínicos tem afinidade por estas moléculas, mas também o colesterol e as porfirinas; 2- já foram descritos sítios centrais como, por exemplo, em células da glia; 3- falta de conhecimento sobre a transdução de sinais e ausência de fatos que comprovem ser esta proteína um receptor clássico devido a sua localização celular variável (mitocondrial ou nuclear) (PAPADOPOULOS et al., 2006a). Esta mudanca de nomenclatura foi submetida e aprovada pelo HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC).

A TSPO apresenta massa molecular de 18kDa e foi descrita como parte de um complexo multimérico que consiste de outras duas proteínas: 1- um canal de ânion voltagem-dependente de 32kDa (VDAC) e um carreador do nucleotídeo adenina de 30kDa (ANC) (MCENERY et al., 1992). Posteriormente, foram detectadas, por meio de *westen blot*, polímeros de TSPO nos tamanhos aproximados de 18, 40 e 56kDa; e ocasionalmente 72, 90 e 110kDa, em células tumorais de mama e de testículo (DELAVOIE et al., 2003).

A clonagem e sequenciamento da TSPO já foi realizada em algumas espécies como em humanos, camundongos, suínos e bovinos (PAROLA et al., 1991; LIN et al., 1993; TAKETANI et al., 1994; ZHANG et al., 2006). Esta proteína de 18kDa apresenta 169 aminoácidos, tendo alto grau de identidade (71%) e

homologia (80%) entre as diversas espécies animais (PAPADOPOULOS, 1993; GAVISH et al., 1999; CASELLAS et al., 2002); também apresenta sítios para fatores de transcrição Sp-1, considerados típicos de genes *housekeeping* (LIN et al., 1993).

A distribuição tecidual, densidade e localização subcelular da TSPO é bastante variável. Desta forma, tecidos glandulares como a adrenal, os ovários e os testículos são ricos em TSPO, o tecido renal e o cardíaco apresentam quantidades intermediárias e, por último, o tecido hepático apresenta pequena quantidade (ANHOLT et al., 1985; DE SOUZA et al., 1985). Diferentes densidades de TSPO podem ser encontradas nos leucócitos dependendo da subpopulação analisada. Especificamente, foi estabelecida a seguinte escala: neutrófilos = monócitos > linfócitos B e células NK > linfócitos T (CANAT et al., 1993; ROCCA et al., 1993; ZAVALA, 1997). Em relação à localização subcelular, a TSPO já foi encontrada na mitocôndria, no complexo de Golgi, na membrana plasmática e no núcleo (ANHOLT et al., 1986; OLSON et al., 1988; O'BEIRNE et al., 1990; HARDWICK, M. et al., 1999; SAKAI et al., 2006b).

Sabe-se que a TSPO esta envolvida em diversos processos fisiológicos e patológicos; entretanto, apesar dos inúmeros estudos nas últimas decadas, sua função precisa ainda não está completamente estabelecida e permanece um enigma. Por outro lado, sabe-se que a TSPO apresenta um papel relevante na fisiologia do desenvolvimento embrionário, já que camundongos *knockout* para a TSPO morrem em fase bastante precoce (PAPADOPOULOS, 2003). Estudos sobre a expressão desta proteína também têm sido realizados em processos fisiológicos e patológicos, dentre eles: a apoptose (CARAYON et al., 1996; FENNELL et al., 2001; VEENMAN et al., 2007; SHOUKRUN et al., 2008), a proliferação celular (LI et al., 2007; VLODAVSKY; SOUSTIEL, 2007; CHELLI et al., 2008), a diferenciação celular (STOEBNER et al., 1999; ROCHARD et al., 2004), o câncer (HARDWICK, M. et al., 1999; LI et al., 2007; CORSI et al., 2008), a inflamação (TORRES et al., 2000; HARDWICK, M. J. et al., 2005; LAZZARINI et al., 2006), a síntese de hormônios (KRUEGER; PAPADOPOULOS, 1990; BROWN; PAPADOPOULOS, 2001; PAPADOPOULOS et al., 2006a), os processos de isquemia e reperfusão (HAUET et al., 2002) e o estresse (NUDMAMUD et al., 2000; SERRA et al., 2004).

Já foram descritas substâncias endógenas com alta finidade por TSPO, dentre elas as porfirinas e o DBI (*Diazepam Binding Inhibitor*). Sabe-se que as porfirinas estão envolvidas no transporte e metabolismo intracelular do heme (TAKETANI et al., 1995) e na esteroidogênese (SNYDER et al., 1987; GAVISH et al., 1992). Importante lembrar que porfirinas sintéticas são utilizadas em tratamentos antitumorais, mais especificamente na terapia fotodinâmica como agente fotosensibilizador de células tumorais (LUKSIENE et al., 2006). Por outro lado, o DBI foi inicialmente descrito como um peptídeo capaz de inibir a ligação do diazepam com seus receptores (GUIDOTTI et al., 1983). O DBI ja foi descrito em órgãos como o cérebro, adrenais e testículos (GRAY et al., 1986; BOVOLIN et al., 1990), células do sistema imune (ROCCA et al., 1993) e também em células tumorais como astrocitoma e glioblastoma (ALHO et al., 1994). Evidências experimentais mostram a co-localização de DBI e TSPO, assim como o envolvimento do DBI em processos de esteroidogênese e proliferação celular (GARNIER et al., 1993; ALHO et al., 1994).

Outro ligante endógeno descrito para a TSPO é o colesterol. Sabe-se que a TSPO é abundantemente expressa em órgãos esteroidogênicos como adrenal e testículos e que a TSPO está associada à ligação e à translocação do colesterol de fora para dentro das membranas das mitocôndrias (KRUEGER; PAPADOPOULOS, 1990; PAPADOPOULOS, 1993), importante lembrar que o colesterol é um precursor dos hormônios esteróides. No SNC, a TSPO esta envolvida na produção de neuroesteróides e desenvolvimento de neuropatologias (PAPADOPOULOS et al., 2006b).

Moléculas da classe dos benzodiazepínicos são importantes ferramentas farmacológicas para a distinção de efeitos de benzodiazepínicos decorrentes da interação com $GABA_A$ ou com TSPO. Desta forma, o 4-cloro-diazepam (Ro5-4864) apresenta alta afinidade por TSPO (nanomolar) e baixa (micromolar) pelo receptor $GABA_A$, enquanto que o clonazepam apresenta alta afinidade pelo receptor $GABA_A$ e baixa por TSPO (BEURDELEY-THOMAS et al., 2000). Já o diazepam e midazolam, por exemplo, são considerados agonistas mistos pois apresentam afinidade por ambos sítios (WEIZMAN; GAVISH, 1993; DOBLE, 1999). Embora estruturalmente diferente dos benzodiazepínicos, as isoquinolonas carboxamidas

também apresentam alta afinidade por TSPO e baixa pelo receptor $GABA_A$. Dentre elas, a mais utilizada é o PK11195 com afinidade menor que 20nM em diversas espécies animais (LE FUR et al., 1983a; LE FUR et al., 1983b; FARGES et al., 1993). Estudos farmacológicos e termodinâmicos classificaram o Ro5-4864 como agonista de TSPO e o PK11195 como antagonista (BENAVIDES et al., 1983; LE FUR et al., 1983c; BENAVIDES et al., 1984). Entretanto, devido a diferentes resultados obtidos na literatura, atualmente os mesmos são simplesmente chamados de ligantes de TSPO. De fato, devido à sua alta especificidade, estes ligantes têm sido ferramentas farmacológicas de grande contribuição para o estudo *in vivo* e *in vitro* de funções específicas da TSPO.

Diversos estudos descrevem ser a TSPO um possível marcador de células tumorais. Especificamente, já foi descrita uma maior expressão de TSPO em tecidos tumorais em relação à tecidos normais para: carcinoma de ovário, hepatocarcinoma celular, astrocitomas, tumores de mama, carcinoma cólon-retal, tumores de próstata (VENTURINI et al., 1998; HARDWICK, M. et al., 1999; HAN et al., 2003; GALIEGUE et al., 2004; MAASER et al., 2005; VLODAVSKY; SOUSTIEL, 2007). Além disso, a expressão de TSPO tem sido diretamente correlacionada ao grau de malignidade de alguns tipos de tumores; ou seja, tumores com elevada expressão de TSPO apresentam características histológicas e fenotípicas de tumores mais invasivos e metastáticos (VENTURINI et al., 1998; MAASER et al., 2002; HAN et al., 2003; VEENMAN et al., 2004; CORSI et al., 2005; VLODAVSKY; SOUSTIEL, 2007). Por outro lado, fibrosarcomas e tumores de pele apresentam menor expressão de TSPO quando comparados com seus tecidos normais (HAN et al., 2003; KLETSAS et al., 2004). A existência de uma correlação positiva entre expressão de TSPO e malignidade tumoral é especifica para cada tipo de tumor, não sendo possível fazer generalizações.

Entretanto, evidências experimentais mostram que células do tumor de mama MDA-MB-231 possuem maior densidade de TSPO, maior potencial invasivo e quimiotático, maior expressão de CD44 e de vimentina quando comparadas com as células do tumor de mama MCF-7 (HARDWICK, M. et al., 1999). Em estudo subsequente este mesmo grupo de pesquisa verificou a existência de dois sub-clones distintos de células MDA-MB-231 classificados de acordo com a expressão

de TSPO, ou seja, clones destas células com altos e baixos níveis desta proteína (MDA-MB-231PH e MDA-MB-231 PL, respectivamente). Embora estes dois sub-clones de células apresentassem a mesma taxa de proliferação *in vitro*, apenas a população MDA-MB-231 PH foi capaz de induzir nódulos tumorais *in vivo* em camundongos SCID, sugerindo novamente esse fato que o aumento da expressão de TSPO pudesse conferir um fenótipo mais agressivo às células tumorais *in vivo* (HARDWICK, M. et al., 2001; HARDWICK, M. et al., 2002).

Outro estudo comparativo, utilizando células de tumor de mama mantidas em cultura, mostrou que aproximadamente 90% das células que não expressam receptor de estrógeno – ER (linhagem BT-20, MDA-MB-435-S e SK-BR-3) e 60% das células que expressam ER (linhagem T47-D, MCF-7 e BT-474) são positivas para TSPO; embora apenas as primeiras (com maior expressão de TSPO) apresentem valores de afinidade (Kd) detectáveis pelo ensaio de *binding* por [^{3}H] Ro5-4864 (entre 8,5nM a 26,3nM) (BEINLICH et al., 2000). Importante lembrar que embora neste estudo não tenha sido determinada uma relação funcional entre a expressão de ER e de TSPO, a presença de receptores de estrógeno é um preditor de sobrevida em tratamentos clínicos de tumores de mama (BEINLICH et al., 2000). Em estudos conduzidos com pacientes portadores de tumor de mama (entretanto sem hiperplasia de linfonodo), o subgrupo que apresentava tumores com maior marcação para TSPO obteve um menor período livre da doença, sugerindo, portanto, que a elevada expressão de TSPO pudesse ser um fator de risco para a população deste subgrupo (GALIEGUE et al., 2004).

Nos tumores, esta proteína apresenta duas localizações subcelulares já descritas: localização citoplasmática e perinuclear. Estudos comparativos com tumores de tipo celulares similares, mas com diferentes localizações de TSPO permitiram, num primeiro momento, inferir que células tumorais de mama MCF-7 (menos agressivas) apresentavam esta proteína localizada no citoplasma e as MDA-MB-231 (mais agressivas) a apresentavam na região perinuclear (HARDWICK, M. et al., 1999); ou seja, a localização intracelular da TSPO nos tumores tem estreita relação com um fenótipo maligno destas células. Resultados nesta mesma direção foram obtidos com linhagens de glioma MGM-3 (TSPO em região citoplasmática) e MGM-1 (TSPO em região nuclear), especificamente, as

células MGM-3 necessitavam de fatores presentes no Soro Fetal Bovino (SFB) para se proliferarem *in vitro*, enquanto as células MGM-1 proliferavam independentemente da presença dos mesmos (BROWN et al., 2000). Em células tumorais hepáticas a expressão de TSPO na região nuclear/perinuclear também apresentou correlação direta com o índice de proliferação celular (CORSI et al., 2005).

Estes estudos claramente mostram uma estreita relação entre a expressão desregulada e a localização de TSPO com a malignidade de tumores. Entretanto, pouco se sabe sobre o real papel da TSPO nestes processos. Mais especificamente, se a sua maior expressão é uma causa ou uma consequência do câncer. Foi demonstrado que a expressão reduzida de uma subunidade de TSPO em clones de células MA-10 induziu aumento da tumorigenicidade *in vitro* (perda de inibição por contato e capacidade de crescer em *soft agar*) e *in vivo* (diminuição da sobrevida de camundongos C57 inoculados com os clones das células tumorais); esses dados levaram os autores a sugerir que a desregulação da expressão de TSPO pudesse ser um evento tardio na progressão tumoral (WEISINGER et al., 2004). Outro estudo funcional também sugere que a TSPO esteja envolvida na regulação da proliferação e sobrevivência celular; mais especificamente, a indução de TSPO em células MCF-7 aumentou a proliferação destas células, e a diminuição dos níveis de TSPO em células MDA-MB-231 diminuiu a proliferação das mesmas; este último fato foi associado a uma ativação de p53, aumento de caspase-3 e também de ciclina A (LI et al., 2007).

Sabe-se, porém, que as células tumorais podem apresentar mutações em alguns aminoácidos da sequência parcial de TSPO quando comparadas com a sequência obtida de células normais. Embora não se compreenda a relação destas mutações com a patogênese dos tumores, este fato já foi descrito para algumas células como as de linfoma Jurkat e células de tumor de mama do tipo MDA-MB-231 e MCF-7 (HARDWICK, M. et al., 1999; COSTA et al., 2006) .

Têm sido realizados outros tipos de estudos que buscam a compreensão dos efeitos de benzodiazepínicos sobre a proliferação e morte de células tumorais. Neste sentido, células MDA-MB-231 tratadas *in vitro* com o Ro5-4864 (um ligante de TSPO) em concentrações nanomolares apresentaram um aumento da proliferação

celular, sendo que esta proliferação estava inversamente correlacionada com a incorporação nuclear de colesterol pelas células (HARDWICK, M. et al., 1999). Em estudo posterior, Beinlich e colaboradores demonstraram que ligantes de TSPO como o diazepam, o PK11195 (um ligante de TSPO) e o Ro5-4864 foram capazes de interferir de maneira diferente com a proliferação do tumor mamário BT-20 *in vitro*: baixas doses (100nM) induziram um aumento da proliferação e altas doses (10-100 μM) induziram uma redução (BEINLICH et al., 1999). Em pesquisa realizada com outro tipo celular, o mesmo resultado bifásico foi observado, ou seja, células de Leydig quando tratadas *in vitro* com o DBI ou com o Ro5-4864 em concentrações baixas (1nM) apresentaram um aumento da proliferação celular e na presença de concentrações altas (1μM) uma reduzida proliferação celular, avaliada pela incorporação de [^{3}H] timidina (GARNIER et al., 1993). Landau e colaboradores relataram que os ligantes de diazepam, PK11195 e Ro5-4864, em doses micromolares, diminuiram a proliferação de células melanoma B16, assim como modificaram tanto a morfologia e quanto a diferenciação das mesmas (LANDAU et al., 1998). Estudo mais recente utilizando células SNU-C4 (tumor de cólon-retal) e MDA-MB-231 (tumor de mama) apontaram para o mesmo sentido: altas concentrações de diazepam induziram uma inibição da proliferação celular (KIM et al., 2008). Entretanto, demonstrou-se que os efeitos de altas doses PK11195 sobre a viabilidade celular pareciam decorrer da quantidade de TSPO presente nas células de astrocitoma ADF (CHELLI et al., 2008). Ainda não se compreende a razão desta discrepância de resultados obtidos entre as concentrações nanomolares e micromolares, já que concentrações micromolares são reconhecidamente bastante elevadas em relação à afinidade nanomolar da TSPO pelos ligantes PK11195 e Ro5-4864 na maioria dos tipos de tumores estudados (VEENMAN et al., 2007).

Entretanto, o envolvimento da TSPO com a apoptose parece relacionar-se, dentre outros eventos celulares, com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Fennell e colaboradores (2001) avaliaram a produção de EROs em células leucêmicas humanas (HL60) tratadas com concentrações micromolares citotóxicas de PK11195 e observaram que estas células tratadas apresentaram aumento da produção de EROs. Este fato envolve alteracções do potencial de membrana mitocondrial e é independente da citoproteção mediada por Bcl-2, já que não foi

impedido após a sua transfecção. Neste sentido, Carayon e colaboradores (1996) demonstraram que células de leucemia Jurkat transfectadas com TSPO adquiriram aumento da resistência à citotoxicidade induzida por EROs.

Também sugere-se que células tumorais apresentem aumento do estresse oxidativo, porém, sendo este fato associado à transformação oncogênica, alterações da atividade metabólica e aumento da geração de EROs (TOYOKUNI et al., 1995; BEHREND et al., 2003). Especificamente este aumento de EROs pode causar estimulação da proliferação celular, promoção de mutações e instabilidade genética, alterações na sensibilidade à agentes anti-neoplásicos e também morte celular (PELICANO et al., 2004). EROs podem ser mensageiros em vias de transdução de sinais intracelulares, em especial, podem participar de vias que promovem aumento da proliferação de células tumorais (BENHAR et al., 2002). Neste sentido, um estudo recente mostrou que a administração *in vivo* de diazepam induziu a um aumento da proliferação, do índice de síntese de DNA e do estresse oxidativo em hepatócitos de ratos. Mais que isso, observou-se que este efeitos foram atenuados pelo pré-tratamento com anti-oxidantes como a Vitamina C e a Melatonina, mostrando o importante papel deste aumento da produção de EROs induzido por diazepam na proliferação destas células (EL-SOKKARY, 2008)

Em trabalho anterior mostramos em nossos laboratórios que o tratamento com diazepam induziu *in vivo* (3,0 mg/kg) um maior crescimento do tumor ascítico de Ehrlich, assim como induziu *in vitro* (100nM) um aumento da proliferação destas células (SAKAI et al., 2006a; SAKAI et al., 2006b). Embora o uso de benzodiazepínicos seja amplo e maior nos últimos anos, assim como o interesse da comunidade científica em estudar os efeitos de benzodiazepínicos sobre a proliferação de células tumorais, e em especial de ligantes de TSPO, poucos estudos têm sido realizados *in vivo* com os mesmos nos últimos anos. Neste sentido, dados epidemiológicos mostraram ausência de correlação positiva entre o uso de benzodiazepínicos e a incidência de câncer em humanos (ROSENBERG et al., 1995; HALAPY et al., 2006); entretanto, questões sobre os efeitos do diazepam sobre o crescimento tumoral *in vivo* ainda permanecem pouco elucidadas. O objetivo do presente estudo foi analisar o papel da TSPO nos efeitos *in vivo* induzidos pelo diazepam no crescimento do tumor de Ehrlich.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Verificar se os efeitos induzidos pelo diazepam sobre o crescimento do tumor de Ehrlich são decorrentes de sua ação na Proteína Translocadora 18kDa (TSPO), previamente conhecida como Receptor Periférico para Benzodiazepínico (PBR), bem como as consequências destes efeitos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a. Estudar *in vivo* os efeitos do tratamento com diazepam (agonista de TSPO e $GABA_A$) sobre o crescimento e o ciclo celular do TAE.

b. Estudar *in vivo* os efeitos do tratamento com diazepam sobre apoptose de células tumorais.

c. Estudar *in vivo* os efeitos do tratamento com diazepam sobre produção de EROs por células do TAE.

d. Estudar *in vivo* os efeitos do tratamento com Ro5-4864 (ligante de TSPO) sobre crescimento e ciclo celular do TAE.

e. Estudar *in vivo* os efeitos do tratamento com Ro5-4864 sobre apoptose de células tumorais.

f. Estudar *in vivo* os efeitos do tratamento com Ro5-4864 sobre produção de EROs por células do TAE.

g. Estudar *in vivo* os efeitos do tratamento com clonazepam (agonista de $GABA_A$) sobre crescimento e o ciclo celular do TAE.

h. Estudar *in vivo* os efeitos do tratamento com clonazepam sobre apoptose de células tumorais.

i. Estudar *in vivo* os efeitos do tratamento com clonazepam sobre produção de EROs por células do TAE.

j. Estudar *in vivo* os efeitos do tratamento com diazepam sobre expressão de TSPO em células do TAE avaliados por meio da técnica de *western blot* e citometria de fluxo.

k. Estudar *in vivo* os efeitos do tratamento com diazepam sobre valores de Kd e Bmax por PK11195 em células do TAE avaliados pelo ensaio de *binding.*

l. Avaliar os efeitos do tratamento *in vivo* com diazepam sobre a distribuição de células tumorais em órgãos intracavitários de animais portadores do TAE por meio de análise histológica

m. Avaliar *in vivo* a cinética da concentração de diazepam no fluido ascítico e no plasma de animais portadores do TAE e tratados com diazepam (0, 1, 6 e 24hs após o último tratamento).

n. Determinar o sequenciamento parcial de *Tspo* em células do TAE e compará-lo com a sequência normal de camundongo.

o. Detectar a presença de receptores de estrógeno em células do TAE por meio da técnica de *western blot.*

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss com peso corporal variando entre 30g a 35g no início dos experimentos, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/SP). Os animais foram utilizados em conformidade às normas e procedimentos relativos ao uso de animais de laboratório da FMVZ-USP (protocolo de bioética nº 717/2005); as normas desse comitê são semelhantes àquelas descritas pelo "Comittee on Care and Use of Laboratory Animal Resources", National Research Council, EUA. Durante todo o experimento os animais permaneceram em sala com temperatura e umidade ambientes mantidas aproximadamente constantes (entre 22-25°C e umidade relativa de 65 a 70%) através de aeração, exaustão e ventilação central controlada. A iluminação foi mantida em um ciclo de noite/dia de 12h, sendo a fase clara iniciada às 7:00 horas. Os animais foram alimentados com ração balanceada e água fornecidas *ad libitum* e foram mantidos nestas condições por um período de adaptação de no mínimo 7 dias antes do início de cada experimento. Neste período, todos os animais foram habituados no manuseio a fim de minimizar a ocorrência de possíveis situações estressantes decorrentes desse manejo durante a fase experimental. Ao final desse período todos os camundongos foram pesados para o cálculo do volume de fármacos a serem administrados, o que foi reajustado a cada dois dias.

4.2 SOLUÇÕES

- ***Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium* - DMEM**

  DMEM (enriquecido com 4,5g/L de glicose, 4mM de L-glutamina e 1mM de piruvato de sódio - Gibco) 500ml
  Penicilina 10U/ml
  Estreptomicina 10µg/ml
  SFB (Gibco) 50ml

- **Soluções de Lise**

  Solução de Lise (Cloreto de Amônio)

  Solução Cloreto de Amônio 0,16M:

  Cloreto de Amônio 8,56g
  H_2O mili-Q qsp 1000ml

  Solução Tris 0,17M (pH 7,5):

  Tris 20,5 g
  H_2O mili-Q qsp 1000ml

  Para uso, adicionar 9 partes da Solução Cloreto de Amônio à 1 parte da Solução Tris.

- **Solução NaCl 0,2%**

  NaCl 2g
  H_2O destilada qsp 1000ml

- **Solução NaCl 1,6%**

  NaCl 16g
  H_2O destilada qsp 1000ml

- **Solução *Phosphate Buffer Saline* (PBS) 10x**

$Na_2PO_4.7H_2O$	26,79g
$Na_2PO_4.H_2O$	4,14g
NaCl	82,00g
H_2O mili-Q qsp	1000ml

Para uso, esta solução foi diluída a 1:10 em H_2O miliQ, e pH final = 7,2 a 7,4.

- **Solução Tampão de Ligação**

NaCl	8,766g
KCl	0,373g
$MgCl_2.6H_2O$	0,203g
$CaCl_2.2H_2O$	0,265g
H_2O mili-Q qsp	1000ml

- **Solução Tampão de Migração Tris Glicina**

Tampão de Migração Tris Glicina 10x (Invitrogen)	100ml
H_2O destilada qsp	1000ml

- **Solução Tampão de Transferência Tris Glicina (pH 8,2 a 8,5)**

Tampão de Transferência Tris Glicina 25x (Invitrogen)	40ml
Metanol	200ml
H_2O destilada qsp	1000ml

- **Solução *Tris-Acetate-EDTA* (TAE)**

Tampão TAE 50x (Fisher)	18ml
H_2O destilada qsp	900ml

- **Solução *Tris-Tween Buffered Saline* (TTBS) 8x**

NaCl	243,00g
Solução Tris 1M (pH 7,5)	160ml
Tween 20	4 ml
H_2O destilada qsp	1000ml

Para uso, esta solução foi diluída a 1:8 em H_2O miliQ.

- **Solução Dithio-DL-Threitol (DTT) 1M**

DTT	3,09g
Acetato de Sódio 10mM (pH 5,2)	20ml

- **Tampão Sample Buffer 2x para Extração de Proteína**

Sodium dodecyl sulfate – SDS 10%	40ml
Tris-HCl 1M pH 6,8	12ml
Glicerol	24ml
H_2O destilada qsp	100ml

- ***Working solution***

Sample Buffer 2x	5ml
Solução DTT 1M	1ml
Phenyl-methylsulfonyl fluoride – PMSF 100mM	100µl
H_2O destilada qsp	10ml

4.3 DROGAS E TRATAMENTO

A tabela 1 mostra os fármacos ligantes da proteína translocadora 18kDa (TSPO) e/ou do receptor Ácido Gama Aminobutírico$_A$ (GABA$_A$): diazepam, clonazepam, Ro5-4864, PK11195 utilizados nos experimentos.

Uma solução de propilenoglicol 20% diluído em Ringer simples foi utilizada como solução controle do diazepam, Ro5-4864 e PK11195. A solução de Tween 5% diluída em NaCl 0,9% foi utilizada como solução controle do tratamento com clonazepam. Os tratamentos foram realizados durante 7 dias, sendo a administração feita por via oral, uma vez ao dia, sempre no mesmo horário.

Tabela 1 - Fármacos ligantes de TSPO ou $GABA_A$ utilizados nos experimentos e suas principais características

Fármaco	Nome Químico	Ação	Dose
Diazepam (Cristália)	7-cloro-1-metil-5-fenil-1,3-diidro-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona	TSPO $GABA_A$	3,0 mg/kg
Clonazepam (Renochen)	5-(2-clorofenil)-1,3-diidro-7-nitro-2H-1,4-benzodiapina-2-ona	$GABA_A$	3,0 mg/kg
Ro5-4864 (Fluka)	7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-(*p*-clorofenil)-2*H*-1,4-benzodiazepina-2-ona	TSPO	3,0 mg/kg
PK11195 (Sigma)	1-2-clorofenil)-*N*-metil-*N*-(1-metilpropil)-3-isoquinolina carboxamida	TSPO	3,0 mg/kg

Justificou-se a escolha da dose de diazepam e o período de tratamento a serem empregados em função de resultados de experimentos anteriores realizados em nossos laboratórios; nestes, esta dose ansiolítica e período mostraram-se capazes de interferir com a atividade de macrófagos ativados pelo OncoBCG (MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, 1999), com a resistência de animais ao *Mycobacterium bovis* (RIGHI et al., 1999; UGAZ et al., 1999) e com o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich (SAKAI et al., 2006a).

4.4 CÉLULAS DO TUMOR DE EHRLICH

4.4.1 Obtenção das Células do Tumor de Ehrlich

Após eutanásia em câmara de CO_2 de um camundongo Swiss doador e portador do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) com 7 dias de evolução, procedeu-se à coleta do fluído ascítico. Esta suspensão de células foi centrifugada à 180g, por 5 minutos e ressuspensa por três vezes em Solução *Phosphate Buffer Saline* (PBS) para lavagem. Quando necessário, procedeu-se à lise hipotônica das hemácias por meio da adição de 20ml de solução de NaCl 0,2% durante 20 segundos seguida pela adição de 20ml de solução NaCl 1,6%. Procedeu-se, a seguir, à contagem das células tumorais em câmara de Neubauer e ao teste de viabilidade celular com Azul de Tripan.

Durante os experimentos as células foram ajustadas para uma concentração de 1,25 x 10^7 células/ml sendo diluídas em solução Phosphate Buffer Saline (PBS) com no mínimo 90% de viabilidade. Desta suspensão, um volume de 0,4 ml (contendo, portanto, 5,0 x 10^6 células tumorais) foi inoculado no peritôneo de cada camundongo.

Para manutenção do tumor *in vivo*, 0,1 ml de fluído ascítico de um camundongo doador era inoculado semanalmente em um camundongo receptor.

4.4.2 Avaliação do Crescimento do Tumor de Ehrlich

Para avaliação do crescimento do TAE, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO_2, ao final de 7 dias da inoculação do tumor. Desses animais foi coletado o líquido ascítico total com auxílio de uma seringa, para mensuração do volume e para a contagem do número de células tumorais presentes com auxílio de câmara de Neubauer, como descrito previamente em detalhes (MATSUZAKI et al., 2006).

4.5 CÉLULAS TUMORAIS MDA-MB-231 E MA-10

Células tumorais de camundongos MDA-MB-231 (tumor de mama) e MA-10 (tumor de células de Leydig) foram utilizadas como controle positivo do ensaio de *binding* por PK11195. As células MDA-MB-231 foram originalmente obtidas da ATCC Global Bioresource Center e as células MA-10 foram gentilmente doadas ao Professor Vassilios Papadopoulos (McGill University) pelo Professor Mario Ascoli (University of Iowa).

Para cultivo celular, os *criovials* (contendo células em meio de cultura 10% de dimetilsulfóxido - DMSO) foram retirados do nitrogênio líquido e colocados em banho-maria a 37°C. O conteúdo foi diretamente adicionado a garrafas de cultura de 175cm^2 (Corning) contendo 15 ml de meio de cultivo celular *Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium* - DMEM (enriquecido com 4,5g/L de glicose, 4mM de L-glutamina e 1mM de piruvato de sódio – Gibco), suplementado com 10U/ml de penicilina, 10µg/ml de estreptomicina e 10% de SFB (Gibco). Após um período de aproximadamente 6 horas (o suficiente para que as células fossem encontradas aderidas à garrafa), o meio de cultura foi renovado para eliminação do DMSO. As células foram mantidas em estufa de cultivo celular a 37°C e 6% de CO_2.

Observou-se diariamente as culturas celulares em microscópio de luz invertido. As células MDA-MB-231 (após atingirem confluência) foram divididas em garrafas de 175 cm^2, numa proporção de 1:4, 2 a 3x/semana; já as células MA-10 (antes de atingirem confluência) foram divididas numa proporção de 1:3, 2 a 3x/semana. Para tal procedimento utilizou-se tripsina 0,5% Ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA (Gibco).

Durante a coleta das células para os experimentos, a completa remoção das células das garrafas ou placas foi realizada com um auxílio de um *cell scrapper*. As células foram transferidas para microtubos de plástico do tipo *eppendorf*, lavadas em PBS e centrifugadas a 260g, por 8 minutos para obtenção do *pellet* celular.

4.6 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DE *Tspo*

4.6.1 Extração e quantificação de DNA

Células do TAE foram assepticamente coletadas de um camundongo portador do tumor ascítico de Ehrlich inoculado há aproximadamente 7 dias. O DNA dos *pellets* celulares foi extraído por meio do kit DNeasy (Qiagen). A quantificação do DNA foi realizada por meio do espetrofotômetro que avaliou a absorbância da amostra a 260nm/280nm. As amostras que apresentaram uma relação 260nm/280nm entre 1,7 e 1,9 foram consideradas como tendo qualidade suficiente para o ensaio.

4.6.2 PCR

O ensaio de Reação em Cadeia da Polimerase - PCR foi realizado utilizando *primers* para a sequência de *Tspo* já descrita para camundongos. Especificamente os *primers* utilizados para as seqüências sense (S) e antisense (AS) encontram-se descritos na tabela 2.

Tabela 2 – *Primers* utlizados para o ensaio de PCR para *Tspo*

Exon	Sequência	*Primer*
Exon 1	S	5' - GGA ATA AGT GGG CTG GTT GTT CCT G - 3'
	AS	5' - TTC CAG GGG CAA CAG AGC ACA G - 3'
Exon 2	S	5' - GCA AGC AGC TTC TTT GAG ATC ATA CAG A - 3'
	AS	5' - GCC TTA CCC CTG TAG ATA CTG ACC CTA TC - 3'
Exon 3	S	5' - TTG GTA CAG TCA GGC AGG GAT TTG C - 3'
	AS	5' - ACC TGG TGG CTT CCT GGG CTA A - 3'

A amplificação foi realizada nas seguintes condições de termociclagem: 1 ciclo na condição de 94°C por 3 minutos; 35 ciclos na condição de 94°C por 20 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos; seguido por um ciclo final estendido de 60°C por 30 minutos.

O gel de agarose foi preparado a 2% diluído em tampão *Tris-Acetate-EDTA* (TAE). Para visualização das bandas, adicionou-se ao gel os corantes Brometo de Etídeo (Sigma) ou CyberGreen (SYBR Safe DNA Gel Stain, Invitrogen), conforme instruções do fabricante. A eletroforese foi realizada a 85V durante 40 minutos. O gel foi constantemente monitorado com auxílio de um aparelho com luz UV.

4.6.3 Clonagem e sequenciamento

Após amplificação, as bandas correspondentes aos Exons 1, 2 e 3 foram removidas do gel, e o DNA foi purificado com auxílio do *kit* QIA quick gel extraction (Promega, San Luis Obispo, CA, USA). Os fragmentos obtidos foram quantificados e clonados em vetores com auxílio do *kit* p-GEM-T easy vectors (Promega, San Luis Obispo, CA, USA). A reação ocorreu durante 1 hora a temperatura ambiente e subsequentemente *overnight* a 4°C para obtenção de um número máximo de

transformações. Os clones foram selecionados em meio Luria Broth Base (LB) (Millers Luria Broth Base - Invitrogen) + Ágar (Bactro Agar - BD) na presença de ampicilina 50 µg/ml, *overnight*, 37°C em estufa.

As cópias do DNA do plasmídeo selecionado foram cultivadas em 3ml de meio LB na presença de ampicilina 50µg/ml, *overnight* (12h a 16h), 37°C, sob agitação vigorosa (220rpm). Após este período, os tubos foram centrifugados a 17.900 g, 8 minutos, 20°C, para obtenção dos *pellets* bacterianos de *E. Coli*. A purificação do DNA dos plasmídeos foi realizada com auxílio do *kit* QIAgen Spin Miniprep Kit (Qiagen). A presença dos genes inseridos foi realizada por meio de ensaio de digestão/restrição utilizando a enzima EcoR1 (Invitrogen).

As amostras foram sequenciadas pelo McGill University Innovation Centre (Montreal, Canadá) com auxílio dos promotores SP6 e T7.

4.7 CITOMETRIA DE FLUXO

4.7.1 Citômetro de Fluxo

Foi utilizado um citômetro de fluxo (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) conectado a um computador (Machintosh Apple, CA, USA) e 10.000 eventos foram adquiridos de cada amostra por meio de um software chamado Cell Quest Pro® (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA).

As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades de FSC – Foward Scatter e SSC - Side Scatter que avaliam o tamanho e a complexidade interna, respectivamente. As populações de interesse em cada experimento foram analisadas por meio dos gates, através do programa Flow Jo® ou Cell Quest Pro®, excluindo-se assim outros tipos celulares das amostras.

4.7.2 Ciclo Celular

Foi utilizada a metodologia previamente descrita em detalhes (SANGER et al., 2000). Para a realização do ensaio 1,0 x 10^6 células (fixadas em etanol 70%) foram lavadas em PBS e centrifugadas (720 g, durante 5 minutos), sendo este procedimento repetido por duas vezes. Estas células foram incubadas e permeabilizadas em 200µl de solução contendo Iodeto de Propídeo 20µg/ml, RNase A 200µg/ml, Triton 0,1% v/v diluídos em PBS à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após 30 minutos de incubação procedeu-se à leitura em Citômetro de Fluxo (FACScan Becton Dycson®), com velocidade máxima de leitura equivalente a 200 eventos/segundo. A análise foi realizada por meio software Flow Jo® (Versão 7.1 para windows, análise de Watson). Os dados foram expressos em porcentagem de células em fase G0-G1, S ou G2-M.

4.7.3 Morte Celular

Para a marcação da anexina V utilizamos protocolo previamente descrito (LORA et al., 2004). Para tanto, 2,0 x 10^5 células foram lavadas e ressuspensas em solução tampão para incubação. Estas células foram então marcadas com 100µl de anexina conjugada a Isoticianato de Fluoresceína - FITC (diluição 1:500 em tampão) durante 30 minutos (à temperatura ambiente e no escuro). No momento da leitura das amostras adicionou-se 40µl de solução de Iodeto de Propídeo (PI) a 100µg/ml. O PI foi utilizado para identificação de células mortas e a anexina para células em apoptose. A leitura foi realizada em Citômetro de Fluxo (FACScan Becton Dycson®) e análise por meio do Cell Quest Pro®. Os resultados foram expressos em porcentagem de células em necrose (células marcadas apenas com PI) e porcentagem de células em apoptose (células marcadas com PI e anexina).

4.7.4 Produção de EROs

Foi utilizada metodologia previamente descrita (HASUI et al., 1989) que se baseia na oxidação do reagente 2'7' – dicloro dihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) – Sigma® resultando na formação do reagente fluorescente 2'7' – dicloro dihidrofluoresceína (DCF). Para a realização do ensaio foram adicionados aos tubos de citometria 100µl com 2,0 x 10^5 células do TAE, 200µl de solução DCFH-DA (0,3 mM) e PBS q.s.p. 1ml. As amostras foram incubadas em estufa de CO_2, durante 30 minutos a 37°C. Em seguida as amostras foram centrifugadas e ressuspensas em 500µl de PBS para leitura em Citômetro de Fluxo (FACScan Becton Dycson®). A quantificação do *burst* ou espécies reativas de oxigênio (EROs) foi estimada pela intensidade média de fluorescência/célula emitida pelo DCF (Geo Mean).

4.7.5 Detecção de TSPO

Esta determinação foi realizada conforme metodologia descrita previamente (SANGER et al., 2000). Após a coleta do TAE, 1,0 x 10^6 células de animais controle e experimentais, foram fixadas em 100µl de solução de paraformaldeído a 0,4% em PBS por 5 minutos. Após a fixação, as amostras foram centrifugadas e ressuspensas em 100µl de solução de 0,1% de saponina em PBS 1% Albumina Sérica Bovina (BSA) por 5 minutos para permeabilização. Incubou-se o anticorpo primário policlonal de coelho (anti-TSPO, doado pelo Prof Vassilios Papadopoulos, Universidade McGill, Canada) diluído a 1:100, durante 60 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem das amostras em PBS, incubou-se o anticorpo secundário 1:100 (anti-IgG, cabra anti-coelho, conjugado a FITC, Santa Cruz Biotecnology) durante 60 minutos. O controle negativo foi realizado incubando-se as amostras apenas com o anticorpo secundário. As amostras foram centrifugadas e ressuspensas em 500µL de PBS para leitura em Citômetro de Fluxo (FACScan Becton Dycson®) e posterior análise. Os resultados foram expressos em média

geométrica da intensidade de fluorescência emitida/célula (quantidade de TSPO presentes/célula) e porcentagem de células tumorais positivas para TSPO (% de células que expressam TSPO).

4.8 *WESTERN BLOT*

4.8.1 Extração de Proteína

Foram coletadas as células do TAE (objeto de estudo), das adrenais e dos testículos (controle positivo), sendo estas mantidas a 4°C e processadas dentro de um intervalo de uma hora para obtenção dos extratos de proteína.

Para tanto aproximadamente 300µL de fluido ascítico dos animais portadores do TAE foram aliquotados em tubos de vidro para a extração. Procedeu-se à lise das hemácias adicionando-se 1ml de solução tampão para lise por 30 minutos, a 4°C. As amostras foram centrifugadas a 260 g, por 8 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* celular foi homogeneizado diretamente em 200µL de tampão (*sample buffer* 2x) (120mM de Tris-HCl, 4% de sodium dodecyl sulfate - SDS, 20% de glicerol). A mesma quantidade de tampão foi adicionada às amostras que continham as adrenais (duas adrenais/tubo) e testículos (um testículo/tubo). Adicionou-se à suspensão 200 µL de *working solution* (60mM de Tris-HCl, 2% de SDS, 10% de glicerol, 100mM DTT e 1mM de phenyl-methylsulfonyl fluoride - PMSF). As amostras dos lisados celulares foram sonicadas por 3x, na potência máxima por 5 segundos, antes e após a adição da *working solution* aos tubos.

A suspensão foi centrifugada a 17.900 g, por 15 minutos a 4°C, O sobrenadante foi armazenado a –20°C para posterior análise.

4.8.2 Quantificação de Proteína

A proteína total foi quantificada por meio da técnica de Bradford (kit Bradford - Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), usando BSA (Invitrogen) como curva padrão de concentrações conhecidas (0 a 20µg/ml de BSA). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595nm.

4.8.3 Eletroforese e Transferência

Para a eletroforese, os extratos de proteína (10-30µg) foram solubilizados em solução de β-mercaptoetanol 2,5% e azul de bromofenol, sendo, após, incubados a 95°C, durante 5 minutos e posteriormente separados em um gel de Poliacrilamida-SDS 4-20% (Invitrogen) à 130V durante aproximadamente 90 minutos. A eletroforese foi realizada em tampão de migração tris-glicina (Tris-Base 25mM, SDS 0,01%, glicina 192mM, pH 8,5) e para todos os ensaios utilizou-se um marcador de peso molecular (Kaleidoscope - Biorad).

Após eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de polifluoreto de polivinilideno (PVDF - Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) com auxílio do aparelho Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Este procedimento foi realizado em condições úmidas a 47mA, 20V durante 90 minutos e em tampão de transferência (Tris-Base 25mM, glicina 192mM, metanol 10%; pH 8,2 a 8,5).

4.8.4 Imunodetecção de TSPO ou ER

As membranas PVDF foram lavadas em solução *Tris-Tween Buffered Saline* - TTBS (20mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5M NaCl, 0,05% Tween 20), por 3x, durante 8 minutos. A saturação de antígenos não específicos foi realizada incubando-se a membrana com 10% de leite desnatado diluído em TTBS por 1h em temperatura ambiente. A membrana foi, então, incubada *overnight* com anticorpo policlonal anti-TSPO (1:1000 em TTBS) ou anti ER (1:1000 em TTBS) a 4°C. Uma segunda incubação foi realizada com anticorpo secundário (1:4000 em TTBS) durante 1 hora em temperatura ambiente. Todas as incubações foram realizadas sob agitação constante. Bandas específicas foram visualizadas por quimioluminescência, com auxílio do *Kit* ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

As membranas usadas para a marcação com TSPO foram então incubadas com solução tampão *Stripping* durante 20 minutos à temperatura ambiente (*Restore Plus Western Blot Stripping Buffer* – Pierce) e, posteriormente, reutilizadas para a marcação com anti-GAPDH (1:3000); desta forma, foi possível normalizar a quantidade de proteína usada para os ensaios.

As imagens foram adquiridas por meio do sistema de análise de imagens LAS4000 (FujiFilm Corporation). A análise densitométrica e a estimativa de tamanho das bandas imunoreativas foi realizada com auxílio do Software MultiGauge, versão 3.1 (FujiFilm Corporation). Os dados foram apresentados pela razão da quantidade de TSPO: GAPDH das bandas avaliadas.

4.9 ENSAIO DE *BINDING* POR PK11195

Células do tumor de Ehrlich foram coletadas de camundongos do grupo controle e tratados com diazepam. O ensaio de *binding* foi realizado conforme descrito previamente (GARNIER et al., 1994). Brevemente, *pellets* celulares foram homogeneizados em PBS com auxílio de um homogeneizador de Teflon-vidro. A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford como acima descrito no item 4.8.2.

Extratos de proteína de células tumorais de camundongo MA-10 (tumor de Leydig) e MDA-MB-231 (tumor de mama) obtidas com auxílio do homogeneizaador. Foram utilizados como controles positivos (10-30 µg) por apresentarem alta afinidade pelo PK11195.

Para a análise das células do tumor de Ehrlich, alíquotas de 50 a 100µg de proteína foram incubadas (em triplicata) na presença de 0,03-12,5nM [^{3}H]PK11195 (Perkin-Elmer, atividade específica 84,4Ci/mmol; 3,1376TBq/mmol) para determinação do *binding* total. O *binding* não específico foi determinado pela incubação (em duplicata) de 0,03-12,5nM [^{3}H]PK11195 seguido da adição do ligante PK11195 não marcado (Sigma, St Louis, MO, USA) em concentrações micromolares.

Após 180 minutos de incubação, amostras foram filtradas em PBS por meio de filtros Whatman GF/B (Brandel, Gaithersburg, Md). A radioatividade aprisionada nos filtros foi mensurada por meio da contagem por minuto (cpm) em líquido de cintilação (ScintVerse Cocktail II, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Os valores de *binding* específico foram obtidos a partir da subtração dos valores obtidos de *binding* total e de *binding* não específico.

A constante de dissociação (K_d) e o número de sítios de ligação (B_{max}) para o [^{3}H]PK 11195 foi determinado pelo Curve-Fit (Prism version 4.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) com base na curva de regressão não linear de saturação dos sítios de ligação para o PK11195. A curva linear foi utlizada apenas para melhor visualização dos dados obtidos.

4.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DIAZEPAM

A metodologia utilizada para a determinação de diazepam em amostras de líquido ascítico e plasma de camundongos foi a de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Esta é acoplada à espectrometria de massa, com ionização em *eletrospray* positivo de forma tal a monitorar os íons resultantes da fragmentação da substância de interesse, assim como do bromazepam, substância utilizada como padrão interno. Após a adição do padrão interno (50µl de solução de bromazepam 120ng/ml) às amostras de líquido ascítico ou plasma (50µl), os compostos foram extraídos utilizando-se da técnica de extração em fase líquida, isto é, utilizando-se de 4ml de uma mistura de dietil éter/diclorometano = 70/30 (v/v). Após a evaporação dos solventes (a 40°C sob corrente de N_2), o resíduo seco foi reconstituído com 100µl de solução aquosa de metanol (90% v/v) contendo 12mM de ácido fórmico, dos quais 30µl foram injetados no cromatógrafo.

A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada utilizando-se um sistema cromatográfico Agilent (série 1100). A coluna cromatográfica utilizada foi uma *Alltech Prevail* C_{18} 3 um (150mm x 4.6 mm i.d.) sendo a fase móvel composta por uma mistura de metanol/água (70/30; v/v) contendo 12mM de ácido fórmico. A detecção das massas foi realizada monitorando-se os íons resultantes no modo MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas). A curva padrão de diazepam (concentrações de 2, 5, 10, 20, 50, 100 e 200 ng/ml) foi realizada utilizando plasma ou fluido ascítico de animais não tratados, dependendo da amostra a ser avaliada.

O aparelho foi ajustado para as seguintes transições: 285>193,2 para o diazepam e 318>182 para o bromazepam. Os tempos de retenção foram entre 2,1 e 2,3 para o diazepam e entre 1,4 e 1,6 para o bromazepam nos dois tipos de amostra. O coeficiente de determinação (r^2) do diazepam foi equivalente a 0,9961 no plasma e 0,9952 no fluido ascítico. A concentração mínima quantificável de diazepam foi de 2 ng/ml e o método utilizado mostrou existência de linearidade para o diazepam na faixa de concentrações entre 2 ng/ml a 200 ng/ml para os dois tipos de amostras analisadas.

4.11 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os fragmentos coletados foram fixados em formaldeído 10% e a inclusão dos tecidos em parafina foi realizada em autoprocessador (Leica) no Laboratório de Histologia do VPT-FMVZ-USP. Os tecidos receberam 2 passagens em álcool 95% (1 hora cada), 5 passagens em álcool absoluto (1 hora cada), 3 passagens em xilol (1 hora cada) e 2 passagens em parafina fundida a 60°C (3 horas cada). Em seguida receberam novo banho de parafina e foram emblocados manualmente. Os cortes foram realizados na espessura de 5µm e a coloração utilizada foi a Hematoxilina-Eosina (H&E) para posterior avaliação em microscópio de luz. As imagens foram capturadas com auxílio do programa Nikon ACT-1C para DXM1200C versão 1.0.1.5 (LEAD Technologies, Inc).

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados pelo teste de Bartlet, para verificação de homocedasticidade. Os dados paramétricos foram avaliados pelo teste “t” de Student ou ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, para avaliação dos contrastes. Os resultados não paramétricos foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney ou por Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunnet. Foram consideradas significantes as análises que apresentaram nível de significância $p<0,05$. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1 - AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM DIAZEPAM (AGONISTA DE TSPO E $GABA_A$) SOBRE O CRESCIMENTO E O CICLO CELULAR DO TAE

Foram utilizados 16 camundongos divididos ao acaso em 2 grupos: grupo controle e experimental. Os animais do grupo experimental receberam 3,0 mg/Kg/dia de diazepam, e aqueles do grupo controle receberam 0,1ml/10g/dia de solução controle propilenoglicol 20% diluído em ringer simples. Os animais foram tratados por via oral, uma vez ao dia, durante 7 dias.

Animais de todos os grupos receberam 5,0 x 10^6 células do TAE no primeiro dia de tratamento (item 4.4.1) e foram avaliados após 7 dias da inoculação. Foi coletado o fluido ascítico dos camundongos para a avaliação do crescimento tumoral conforme descrito no item 4.4.2 e do ciclo celular descrito nos itens 4.7.1 e 4.7.2.

Resultados – Crescimento Tumoral

A tabela 3 mostra e a figura 1 ilustra os efeitos do tratamento com diazepam (3,0mg/kg) ou com solução controle do diazepam, durante 7 dias, via oral sobre o crescimento do tumor ascítico de camundongos inoculados com 5,0 x 10^6 células do tumor ascítico de Ehrlich por animal.

A análise estatística mostrou que há diferença significante entre os dados obtidos após os tratamentos com diazepam (3,0mg/kg) ou com a solução controle deste ($p<0,05$) no relativo ao crescimento tumoral avaliado por meio dos seguintes parâmetros: volume e número total de células tumorais (teste “t” de Student). Não foram encontradas diferenças significantes para o parâmetro número de células tumorais/ml (teste “t” de Student, com correção de Welch, $p>0,05$).

Tabela 3 - Efeitos da administração de diazepam (3,0mg/kg) ou solução controle deste sobre o volume, número de células tumorais/ml e número de células tumorais totais da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal)

Grupos [1]	Controle	Diazepam
Volume (ml)	2,18 ± 0,96	3,45 ± 0,91 *
Número de células tumorais/ml (x 10^6)	194,22 ± 23,58	183,33 ± 79,28
Número de células tumorais totais (x 10^6)	393,48 ± 152,72	638,14 ± 183,56 *

(1) os dados representam a média ± desvio padrão
* estatisticamente diferente do controle para p<0,05 (teste "t" de Student)

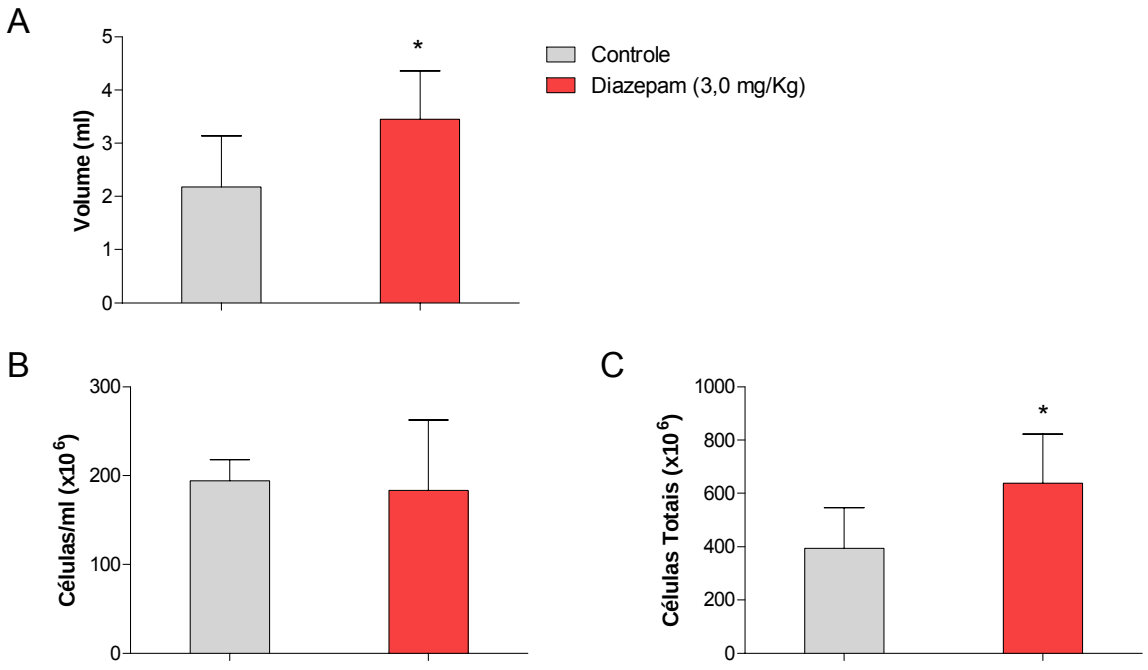

Figura 1 - Efeitos da administração de diazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre o volume (A), número de células tumorais/ml (B) e número de células tumorais totais (C) da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal). Os dados representam a média ± desvio padrão, *p<0,05 em relação ao grupo controle (teste "t" de Student)

Resultados – Ciclo Celular

A figura 2A ilustra um citograma de células do tumor ascítico de Ehrlich. Neste citograma as células tumorais foram identificadas pelas propriedades FL2-A e FL2-W conforme mostra a região R1. A figura 2B ilustra um histograma de fluorescência FL-2 em escala linear. As células deste histograma são da região R1 como ilustra a figura 2A e foram incubadas com solução de Iodeto de Propídeo para avaliação do ciclo celular. As diferentes regiões analisadas neste histograma indicam o conteúdo de DNA e são delimitadas com base na intensidade de fluorescência das células.

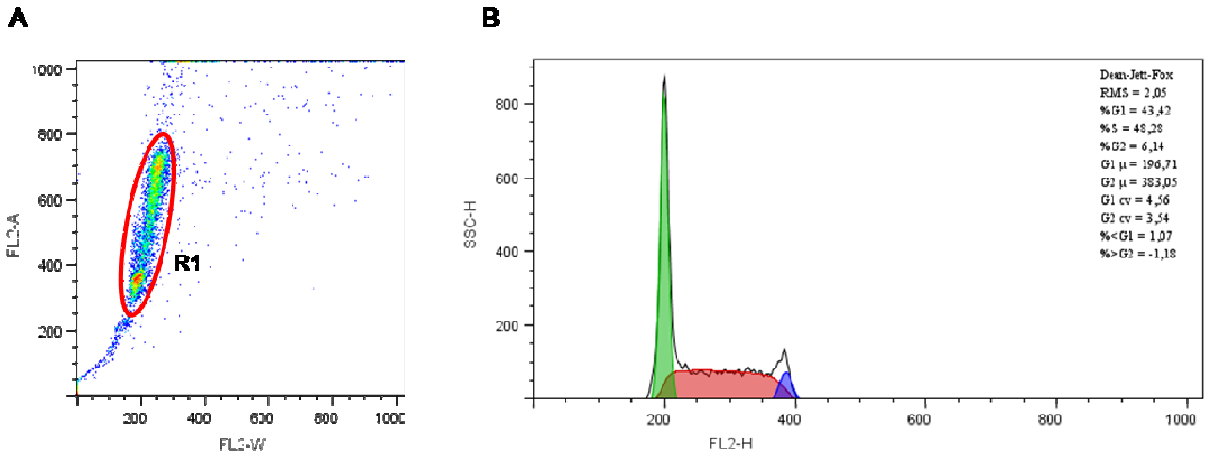

Figura 2 - Gráficos utilizados na análise do ciclo celular. (A) Citograma de células do tumor ascítico de Ehrlich ilustrando a população R1 analisada e equivalente às células tumorais e (B) Histograma do ciclo celular do tumor ascítico de Ehrlich ilustrando as três regiões analisadas: células em fase G0-G1 (pico verde), células em fase S (pico vermelho) e G2-M (pico azul)

A tabela 4 mostra e a figura 3 ilustra os efeitos do tratamento com diazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste, durante 7 dias, via oral sobre as fases do ciclo (fase G0-G1, S ou G2-M) de células da ascite de camundongos inoculados com 5,0 x 10^6 células do tumor ascítico de Ehrlich por animal.

A análise estatística mostrou que há diferença significante entre os dados obtidos após os tratamentos com diazepam (3,0mg/kg) ou com a solução controle para a porcentagem de células em fase S e G2-M ($p<0,05$, teste "t" de Student). Não foram encontradas diferenças significantes para a porcentagem de células em fase G0-G1 ($p>0,05$, teste "t" de Student).

Tabela 4 - Efeitos da administração de diazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre as fases do ciclo (fase G0-G1, S ou G2-M) de células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal)

Grupos(1)	**Controle**	**Diazepam**
Fase G0-G1 (%)	40,40 ± 4,11	40,22 ± 4,72
Fase S (%)	47,43 ± 3,82	41,10 ± 6,98 *
Fase G2-M (%)	10,83 ± 4,06	16,88 ± 5,56 *

(1) os dados representam a média ± desvio padrão
* estatisticamente diferente do controle para $p<0,05$ (teste "t" de Student)

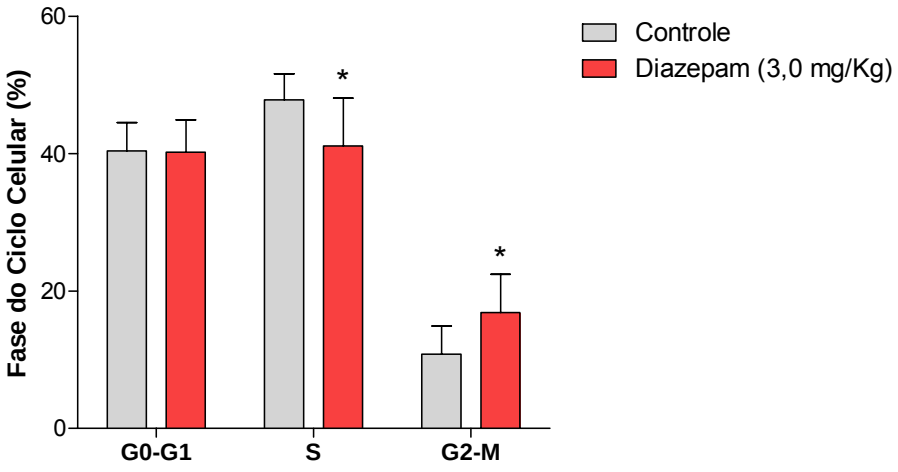

Figura 3 - Efeitos da administração de diazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre as fases do ciclo (fase G0-G1, S ou G2-M) de células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal). Os dados representam a média ± desvio padrão, *p<0,05 em relação ao grupo controle (teste "t" de Student)

5.2 EXPERIMENTO 2 – AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM DIAZEPAM (AGONISTA DE TSPO E $GABA_A$) SOBRE APOPTOSE DE CÉLULAS TUMORAIS

Foram utilizados 16 camundongos divididos ao acaso em 2 grupos: grupo controle e experimental. Os animais do grupo experimental receberam 3,0mg/Kg/dia de diazepam, e aqueles do grupo controle receberam 0,1ml/10g/dia de solução controle propilenoglicol 20% diluído em ringer simples. Os animais foram tratados por via oral, uma vez ao dia, durante 7 dias.

Animais de todos os grupos receberam 5,0 x 10^6 células do TAE no primeiro dia de tratamento (item 4.4.1) e foram avaliados após 7 dias da inoculação. Foi coletado o fluido ascítico dos camundongos para avaliação da apoptose como descrito nos ítens 4.7.1 e 4.7.3.

Resultados

A figura 4A ilustra um citograma de células do tumor ascítico de Ehrlich. Neste citograma as células tumorais foram identificadas pelas propriedades FSC e SSC e analisadas conforme mostra a região R1. A figura 4B ilustra um *dot plot* com fluorescência FL-1 (para o reagente anexina) e FL-2 (para o reagente iodeto de propídeo). A divisão do mesmo em quadrantes indica a porcentagem de células duplamente marcadas com anexina e com iodeto de propídeo (células em apoptose) ou células marcadas somente com iodeto de propídeo (células em necrose). As células deste *dot plot* são da região R1 ilustrada na figura 4A**.**

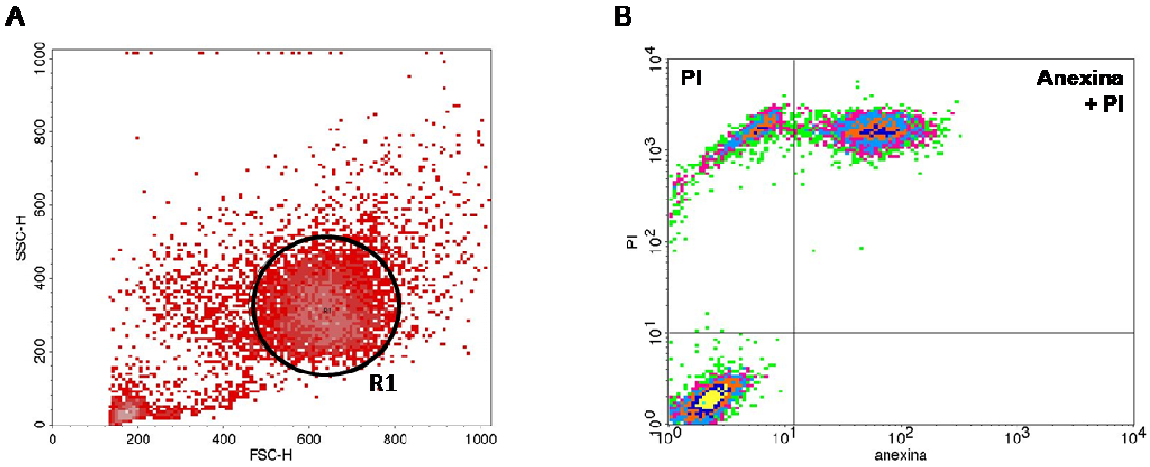

Figura 4 - Gráficos utilizados na análise da morte celular. (A) Citograma ilustrando a população R1 analisada e equivalente às células tumorais e (B) *Dot Plot* de células incubadas com anexina e iodeto de propídeo (PI). Os quadrantes indicados ilustram especificamente a porcentagem de células em apoptose (duplamente positivas para anexina e PI) e em necrose (somente positivas para PI)

A tabela 5 mostra e a figura 5 ilustra os efeitos do tratamento com diazepam (3,0mg/kg) ou com a solução controle deste, durante 7 dias, via oral sobre a morte de células (apoptose ou necrose) do tumor ascítico de camundongos inoculados com 5,0 x 10^6 células do tumor ascítico de Ehrlich por animal.

A análise estatística mostrou que há diferença significante entre os dados obtidos após os tratamentos com diazepam (3,0mg/kg) ou com a solução controle deste ($p<0,05$) no relativo à porcentagem de células em apoptose (teste "t" de Student). Não foram encontradas diferenças significantes para a porcentagem de células em necrose ($p>0,05$, teste "t" de Student).

Tabela 5 - Efeitos da administração de diazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre a porcentagem de necrose e de apoptose de células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal)

Grupos (1)	**Controle**	**Diazepam**
Necrose	7,08 ± 3,86	7,59 ± 5,02
Apoptose	20,86 ± 6,07	30,14 ± 9,46 *

(1) os dados representam a média ± desvio padrão
* estatisticamente diferente do controle para $p<0,05$ (teste "t" de Student)

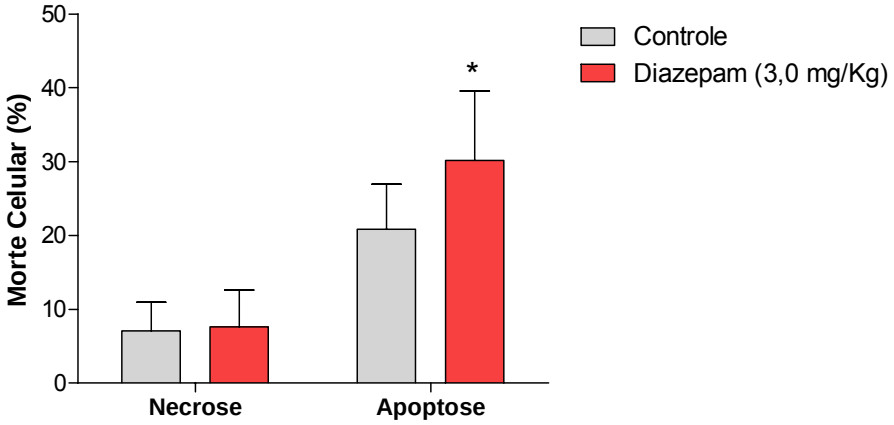

Figura 5 - Efeitos da administração de diazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre a porcentagem de necrose e de apoptose de células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal). Os dados representam a média ± desvio padrão, *p<0,05 em relação ao grupo controle (teste "t" de Student)

5.3 EXPERIMENTO 3 - AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM DIAZEPAM (AGONISTA DE TSPO E $GABA_A$) SOBRE PRODUÇÃO DE EROS POR CÉLULAS DO TAE

Foram utilizados 16 camundongos divididos ao acaso em 2 grupos: controle e diazepam. Os animais do grupo experimental receberam 3,0mg/Kg/dia de diazepam, e aqueles do grupo controle receberam 0,1ml/10g/dia de solução controle do diazepam (propilenoglicol 20% diluído em ringer simples). Os animais foram tratados por via oral, uma vez ao dia, durante 7 dias.

Animais de todos os grupos receberam 5,0 x 10^6 células do TAE no primeiro dia de tratamento (item 4.4.1) e foram avaliados após 7 dias da inoculação. Foi coletado o fluido ascítico dos camundongos para avaliação da produção de EROs como descrito nos ítens 4.7.1 e 4.7.4.

Resultados

A tabela 6 mostra e a figura 6 ilustra os efeitos do tratamento com diazepam 3,0mg/kg ou da solução controle do diazepam, durante 7 dias, via oral sobre a produção de EROs por células do tumor ascítico de camundongos inoculados com 5,0 x 10^6 células do tumor ascítico de Ehrlich por animal.

A análise estatística mostrou que há diferença significante entre os dados obtidos após os tratamentos com diazepam (3,0mg/kg) ou com solução controle deste ($p<0,05$) para a produção de EROs por células tumorais analisadas pelo teste “t” de Student.

Tabela 6 - Efeitos da administração de diazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre a produção de EROs por células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal)

Grupos[(1)]	Controle	Diazepam
EROs (intensidade de fluorescência do DCF)	243,27 ± 78,97	342,37 ± 93,07 *

(1) os dados representam a média ± desvio padrão
* estatisticamente diferente do controle para p<0,05 (teste "t" de Student)

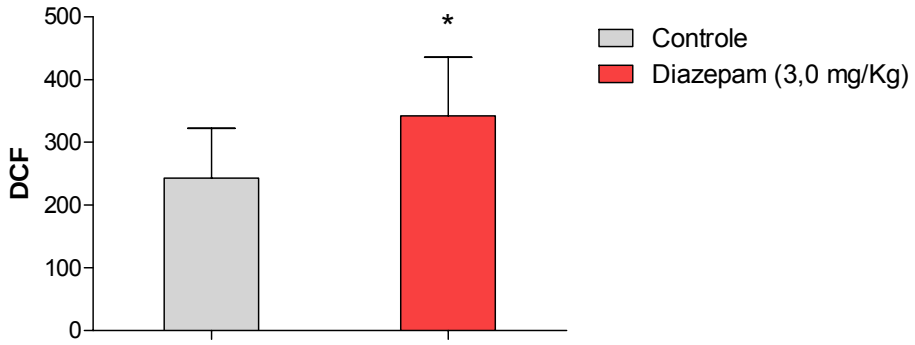

Figura 6 - Efeitos da administração de diazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre a produção de EROs por células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x10^6 células/animal). Os dados representam a média ± desvio padrão, *p<0,05 em relação ao grupo controle (teste "t" de Student)

5.4 EXPERIMENTO 4 - AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM RO5-4864 (LIGANTE DE TSPO) SOBRE CRESCIMENTO E CICLO CELULAR DO TAE

Foram utilizados 16 camundongos divididos ao acaso em 2 grupos: controle e Ro5-4864. Os animais do grupo experimental receberam 3,0mg/Kg/dia de Ro5-4864, e aqueles do grupo controle receberam 0,1ml/10g/dia de solução controle (propilenoglicol 20% diluído em ringer simples). Os animais foram tratados por via oral, uma vez ao dia, durante 7 dias.

Animais de todos os grupos receberam 5,0 x 10^6 células do TAE no primeiro dia de tratamento (item 4.4.1) e foram avaliados após 7 dias da inoculação. Foi coletado o fluido ascítico dos camundongos para avaliação do crescimento tumoral conforme descrito no item 4.4.2 e do ciclo celular descrito nos itens 4.7.1 e 4.7.2.

Resultados – Crescimento Tumoral

A tabela 7 mostra e a figura 7 ilustra os efeitos do tratamento com Ro5-4864 (3,0mg/kg) ou com solução controle, durante 7 dias, via oral sobre o crescimento do tumor ascítico de camundongos inoculados com 5,0 x 10^6 células do tumor ascítico de Ehrlich por animal.

A análise estatística mostrou que há diferença significante entre os dados obtidos após os tratamentos com Ro5-4864 (3,0mg/kg) ou com a solução controle deste ($p<0,01$) no relativo ao crescimento tumoral avaliado por meio dos seguintes parâmetros: volume e número total de células tumorais (teste “t” de Student). Não foram encontradas diferenças significantes para o parâmetro número de células tumorais/ml ($p>0,05$, teste “t” de Student).

Tabela 7 - Efeitos da administração de Ro5-4864 (3,0mg/kg) ou solução controle deste sobre o volume, número de células tumorais/ml e número de células tumorais totais da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal)

Grupos [1]	Controle	Ro5-4864
Volume (ml)	2,78 ± 0,84	3,86 ± 0,72 **
Número de células tumorais/ml (x 10^6)	160,80 ± 39,99	173,20 ± 21,99
Número de células tumorais totais (x 10^6)	407,12 ± 137,32	677,12 ± 177,82 **

(1) os dados representam a média ± desvio padrão
** estatisticamente diferente do controle para p<0,01 (teste "t" de Student)

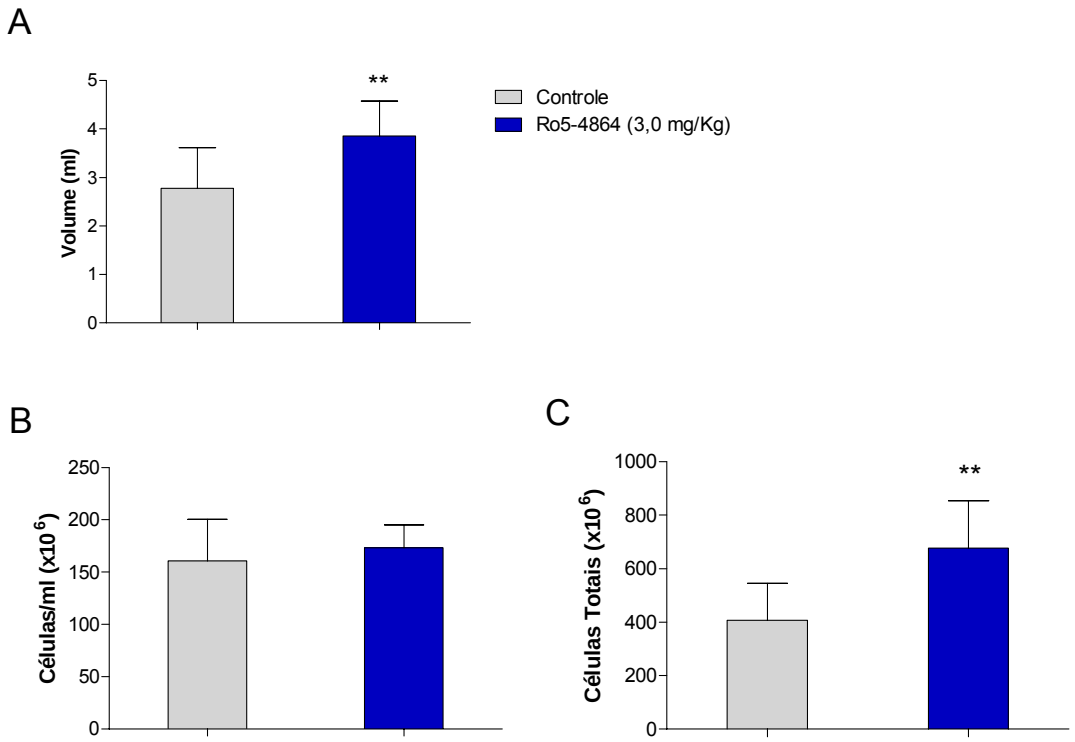

Figura 7 - Efeitos da administração de Ro5-4864 (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre o volume (A), número de células tumorais/ml (B) e número de células tumorais totais (C) da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal). Os dados representam a média ± desvio padrão, **p<0,01 em relação ao grupo controle (teste "t" de Student)

Resultados – Ciclo Celular

A tabela 8 mostra e a figura 8 ilustra os efeitos do tratamento com Ro5-4864 (3,0mg/kg) ou da solução controle deste, durante 7 dias, via oral sobre as fases do ciclo (fase G0-G1, S ou G2-M) de células da ascite de camundongos inoculados com 5,0 x 10^6 células do tumor ascítico de Ehrlich por animal.

A análise estatística mostrou que há diferença significante entre os dados obtidos após os tratamentos com Ro5-4864 (3,0mg/kg) ou com a solução controle deste para a porcentagem de células em fase S e G2-M ($p<0,05$, teste "t" de Student). Não foram encontradas diferenças significativas para a porcentagem de células em fase G0-G1 ($p>0,05$, teste "t" de Student).

Tabela 8 - Efeitos da administração de Ro5-4864 (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre as fases do ciclo (fase G0-G1, S ou G2-M) de células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal)

Grupos[(1)]	**Controle**	**Ro5-4864**
Fase G0-G1 (%)	35,44 ± 6,60	36,59 ± 2,67
Fase S (%)	49,04 ± 5,35	53,65 ± 3,73 *
Fase G2-M (%)	14,04 ± 2,26	11,25 ± 3,33 *

(1) os dados representam a média ± desvio padrão
* estatisticamente diferente do controle para $p<0,05$ (teste "t" de Student)

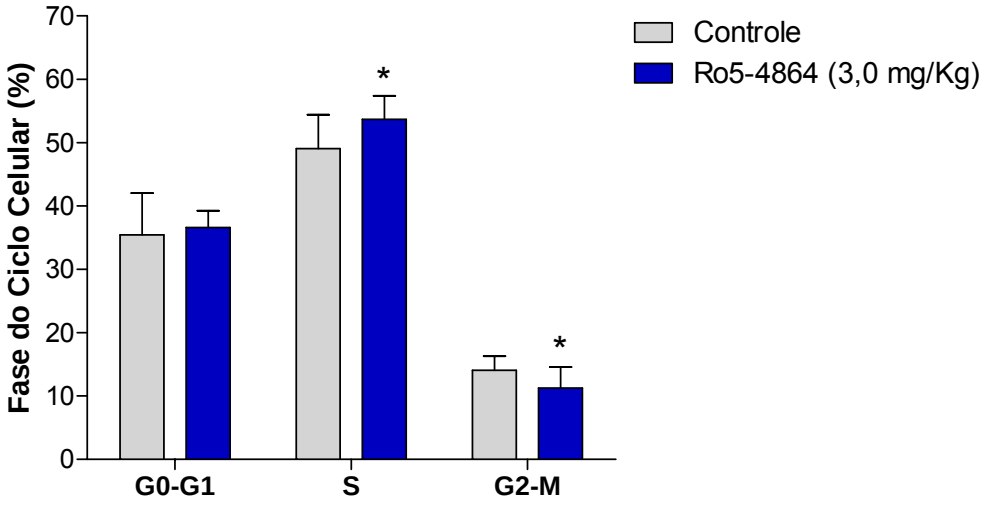

Figura 8 - Efeitos da administração de Ro5-4864 (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre as fases do ciclo (fase G0-G1, S ou G2-M) de células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal). Os dados representam a média ± desvio padrão, *p<0,05 em relação ao grupo controle (teste "t" de Student)

5.5 EXPERIMENTO 5 - AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM RO5-4864 (LIGANTE DE TSPO) SOBRE A MORTE DE CÉLULAS TUMORAIS

Foram utilizados 16 camundongos divididos ao acaso em 2 grupos: controle e Ro5-4864. Os animais do grupo experimental receberam 3,0mg/Kg/dia de Ro5-4864, e aqueles do grupo controle receberam 0,1ml/10g/dia de solução controle (propilenoglicol 20% em ringer simples). Os animais foram tratados por via oral, uma vez ao dia, durante 7 dias.

Animais de todos os grupos receberam 5,0 x 10^6 células do TAE no primeiro dia de tratamento (item 4.4.1) e foram avaliados após 7 dias da inoculação. Foi coletado o fluido ascítico dos camundongos para avaliação da apoptose como descrito nos ítens 4.7.1 e 4.7.3.

Resultados

A tabela 9 mostra os efeitos do tratamento com Ro5-4864 (3,0mg/kg) ou solução controle do Ro5-4864, durante 7 dias, via oral sobre a morte de células da ascite de camundongos inoculados com 5,0 x 10^6 células do tumor ascítico de Ehrlich por animal.

A análise estatística mostrou que não há diferenças significantes entre os dados obtidos após os tratamentos com Ro5-4864 (3,0mg/kg) ou com a solução controle deste para a porcentagem de células mortas ($p>0,05$, teste "t" de Student).

Tabela 9 - Efeitos da administração de Ro5-4864 (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre a porcentagem de morte de células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal)

Grupos (1)	**Controle**	**Ro5-4864**
Morte celular	9,26 ± 3,03	9,01 ± 3,41

(1) os dados representam a média ± desvio padrão
$p>0,05$ (teste "t" de Student)

5.6 EXPERIMENTO 6 - AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM RO5-4864 SOBRE A PRODUÇÃO DE EROS POR CÉLULAS DO TAE

Foram utilizados 16 camundongos divididos ao acaso em 2 grupos: controle e Ro5-4864. Os animais do grupo experimental receberam 3,0mg/Kg/dia de Ro5-4864, e aqueles do grupo controle receberam 0,1ml/10g/dia de solução controle (propilenoglicol 20% diluído em ringer simples). Os animais foram tratados por via oral, uma vez ao dia, durante 7 dias.

Animais de todos os grupos receberam 5,0 x 10^6 células do TAE no primeiro dia de tratamento (item 4.4.1) e foram avaliados após 7 dias da inoculação. Foi coletado o fluido ascítico dos camundongos para avaliação da produção de EROs como descrito nos ítens 4.7.1 e 4.7.4.

Resultados

A tabela 10 mostra e a figura 9 ilustra os efeitos do tratamento com Ro5-4864 (3,0mg/kg) ou da solução controle do Ro5-4864, durante 7 dias, via oral sobre a produção de EROs por células do tumor ascítico de camundongos inoculados com 5,0 x 10^6 células do tumor ascítico de Ehrlich por animal.

A análise estatística mostrou que há diferença significante entre os dados obtidos após os tratamentos com Ro5-4864 (3,0mg/kg) ou com solução controle deste ($p<0,05$) para a produção de EROs por células tumorais analisadas (teste “t” de Student).

Tabela 10 - Efeitos da administração de Ro5-4864 (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre a produção de EROs por células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal)

Grupos[(1)]	Controle	Ro5-4864
EROs (intensidade de fluorescência)	67,82± 27,94	119,27 ± 42,55 *

(1) os dados representam a média ± desvio padrão
* estatisticamente diferente do controle para p<0,05 (teste "t" de Student)

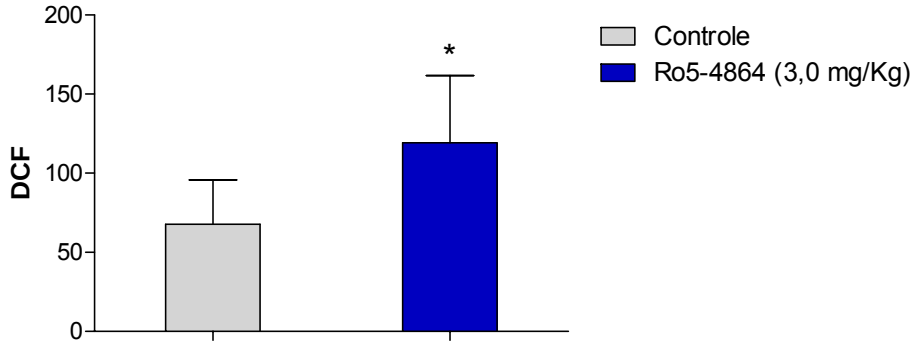

Figura 9 - Efeitos da administração de Ro5-4864 (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre a produção de EROs por células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x10^6 células/animal). Os dados representam a média ± desvio padrão, *p<0,05 em relação ao grupo controle (teste "t" de Student)

5.7 EXPERIMENTO 7 - AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM CLONAZEPAM (AGONISTA DE $GABA_A$) SOBRE O CRESCIMENTO E O CICLO CELULAR DO TAE

Foram utilizados 16 camundongos divididos ao acaso em 2 grupos: controle e clonazepam. Os animais do grupo experimental receberam 3,0mg/Kg/dia de clonazepam, e aqueles do grupo controle receberam 0,1ml/10g/dia de solução controle (solução tween 5% diluído em NaCl 0,9%). Os animais foram tratados por via oral, uma vez ao dia, durante 7 dias.

Animais de todos os grupos receberam 5,0 x 10^6 células do TAE no primeiro dia de tratamento (item 4.4.1) e foram avaliados após 7 dias da inoculação. Foi coletado o fluido ascítico dos camundongos para avaliação do crescimento tumoral conforme descrito no item 4.4.2 e do ciclo celular descrito nos itens 4.7.1 e 4.7.2.

Resultados – Crescimento Tumoral

A tabela 11 mostra e a figura 10 ilustra os efeitos do tratamento com clonazepam (3,0mg/kg) ou solução controle do clonazepam, durante 7 dias, via oral sobre o crescimento do tumor ascítico de camundongos inoculados com 5,0 x 10^6 células do tumor ascítico de Ehrlich por animal.

A análise estatística mostrou que há diferença significante entre os dados obtidos após os tratamentos com clonazepam (3,0mg/kg) ou solução controle deste ($p<0,05$) no relativo ao parâmetro número de células tumorais/ml (teste “t” de Student). Não foram encontradas diferenças significantes para os parâmetros volume e número de células tumorais totais ($p>0,05$, teste “t” de Student).

Tabela 11 - Efeitos da administração de clonazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre o volume, número de células tumorais/ml e número células tumorais totais da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal)

Grupos (1)	Controle	Clonazepam
Volume (ml)	2,13 ± 0,78	1,86 ± 0,67
Número de células tumorais/ml (x 10^6)	187,71 ± 35,23	246,33 ± 55,12*
Número de células tumorais totais (x 10^6)	389,30 ± 134,45	401,97 ± 147,74

(1) os dados representam a média ± desvio padrão
* estatisticamente diferente do controle para p<0,05 (teste "t" de Student)

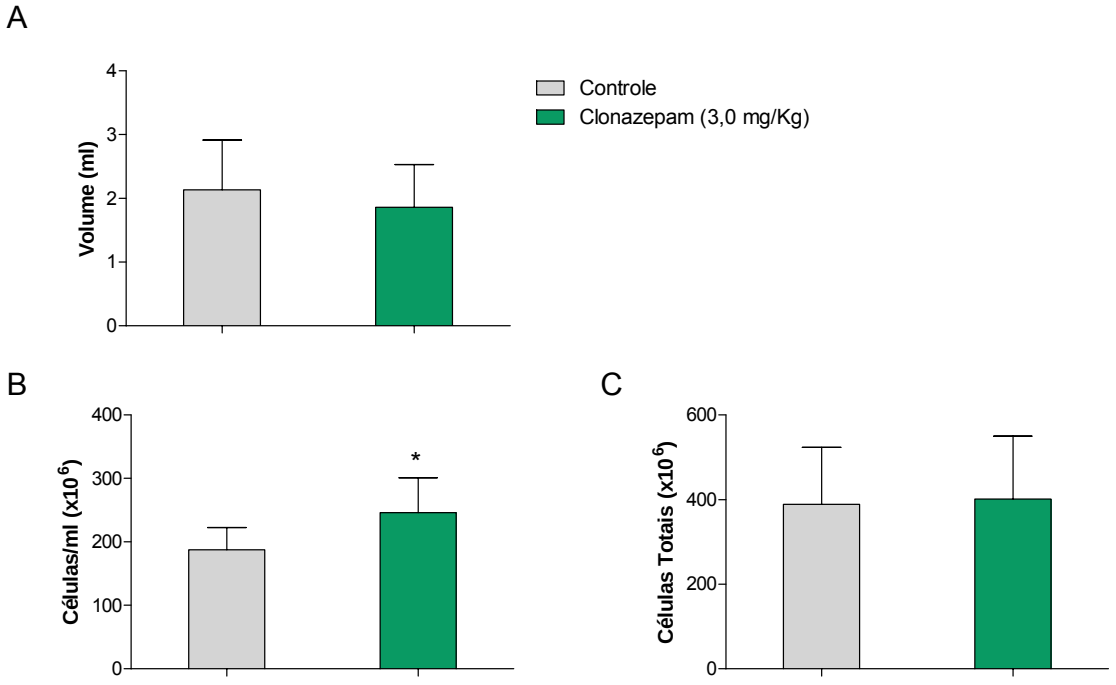

Figura 10 - Efeitos da administração de clonazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre o volume (A), número de células tumorais/ml (B) e número de células tumorais totais (C) da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal). Os dados representam a média ± desvio padrão, * p<0,05 em relação ao grupo controle (teste "t" de Student)

Resultados – Ciclo Celular

A tabela 12 mostra os efeitos do tratamento com clonazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle do clonazepam, durante 7 dias, via oral sobre as fases do ciclo (fase G0-G1, S ou G2-M) de células da ascite de camundongos inoculados com 5,0 x 10^6 células do tumor ascítico de Ehrlich por animal.

A análise estatística mostrou que não há diferenças significantes entre os dados obtidos após os tratamentos com clonazepam (3,0mg/kg) ou com a solução controle deste para a porcentagem de células em fase G0-G1, fase S e fase G2-M ($p>0,05$, teste "t" de Student).

Tabela 12 - Efeitos da administração de clonazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre as fases do ciclo (fase G0-G1, S ou G2-M) de células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal)

Grupos(1)	**Controle**	**Clonazepam**
Fase G0-G1 (%)	41,60 ± 4,99	41,83 ± 2,63
Fase S (%)	40,97 ± 4,44	41,56 ± 3,26
Fase G2-M (%)	19,90 ± 4,87	17,04 ± 3,36

(1) os dados representam a média ± desvio padrão
$p>0,05$ (teste "t" de Student)

5.8 EXPERIMENTO 8 - AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM CLONAZEPAM (AGONISTA DE $GABA_A$) SOBRE A APOPTOSE DE CÉLULAS TUMORAIS

Foram utilizados 16 camundongos divididos ao acaso em 2 grupos: controle e clonazepam. Os animais do grupo experimental receberam 3,0mg/Kg/dia de clonazepam, e aqueles do grupo controle receberam 0,1ml/10g/dia de solução controle do clonazepam (solução tween 5% diluído em NaCl 0,9%). Os animais foram tratados por via oral, uma vez ao dia, durante 7 dias.

Animais de todos os grupos receberam 5,0 x 10^6 células do TAE no primeiro dia de tratamento (item 4.4.1) e foram avaliados após 7 dias da inoculação. Foi coletado o fluido ascítico dos camundongos para avaliação da apoptose como descrito nos ítens 4.7.1 e 4.7.3.

Resultados

A tabela 13 mostra os efeitos do tratamento com clonazepam (3,0mg/kg) ou solução controle do clonazepam, durante 7 dias, via oral sobre a morte de células (apoptose ou necrose) da ascite de camundongos inoculados com 5,0 x 10^6 células do tumor ascítico de Ehrlich por animal.

A análise estatística mostrou que não há diferenças significantes entre os dados obtidos após os tratamentos com clonazepam (3,0mg/kg) ou com a solução controle deste para a porcentagem de células em necrose ou apoptose ($p>0,05$, teste “t” de Student).

Tabela 13 - Efeitos da administração de clonazepam (3,0mg/kg) ou solução controle deste sobre a porcentagem de apoptose ou de necrose de células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal)

Grupos[(1)]	Controle	Clonazepam
Necrose	5,49 ± 3,75	7,33 ± 2,92
Apoptose	21,28 ± 3,76	18,62 ± 4,87

(1) os dados representam a média ± desvio padrão
p>0,05 (teste "t" de Student)

5.9 EXPERIMENTO 9 - AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM CLONAZEPAM (AGONISTA DE $GABA_A$) SOBRE A PRODUÇÃO DE EROS POR CÉLULAS DO TAE

Foram utilizados 16 camundongos divididos ao acaso em 2 grupos: controle e clonazepam. Os animais do grupo experimental receberam 3,0mg/Kg/dia de clonazepam, e aqueles do grupo controle receberam 0,1ml/10g/dia de solução controle do clonazepam (solução tween 5% diluído em NaCl 0,9%). Os animais foram tratados por via oral, uma vez ao dia, durante 7 dias.

Animais de todos os grupos receberam 5,0 x 10^6 células do TAE no primeiro dia de tratamento (item 4.4.1) e foram avaliados após 7 dias da inoculação. Foi coletado o fluido ascítico dos camundongos para avaliação da produção de EROs como descrito nos ítens 4.7.1 e 4.7.4.

Resultados

A tabela 14 mostra os efeitos do tratamento com clonazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle, durante 7 dias, via oral sobre a produção de EROs por células do tumor ascítico de camundongos inoculados com 5,0 x 10^6 células do tumor ascítico de Ehrlich por animal.

A análise estatística mostrou que não há diferenças significantes entre os dados obtidos após os tratamentos com clonazepam (3,0mg/kg) ou com a solução controle deste para a produção de EROs por células tumorais analisadas ($p>0.05$; teste "t" de Student).

Tabela 14 - Efeitos da administração de clonazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre a produção de EROs por células da ascite de camundongos induzida pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal)

Grupos[(1)]	Controle	Clonazepam
EROs (intensidade de fluorescência)	366,42± 131,89	267,20 ± 79,71

(1) os dados representam a média ± desvio padrão
p>0,05 (teste "t" de Student)

5.10 EXPERIMENTO 10 - AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM DIAZEPAM SOBRE A EXPRESSÃO DE TSPO EM CÉLULAS DO TAE AVALIADAS POR MEIO DA TÉCNICA DE *WESTERN BLOT* E CITOMETRIA DE FLUXO

Foram utilizados 16 camundongos divididos ao acaso em 2 grupos: controle e diazepam. Os animais do grupo experimental receberam 3,0mg/Kg/dia de diazepam, e aqueles do grupo controle receberam 0,1ml/10g/dia de solução controle do diazepam (propilenoglicol 20% diluído em ringer simples). Os animais foram tratados por via oral, uma vez ao dia, durante 7 dias.

Animais de todos os grupos receberam 5,0 x 10^6 células do TAE no primeiro dia de tratamento (item 4.4.1) e foram avaliados após 7 dias da inoculação. Foi coletado o fluido ascítico dos camundongos para quantificação da TSPO como descrito por *western blot* no item 4.8 e por citometria de fluxo nos ítens 4.7.1 e 4.7.5.

Resultados – *Western Blot*

A figura 11A ilustra imagens das bandas imunoreativas para TSPO de células de tumor de Ehrlich, assim como da adrenal e testículo utilizados com controles positivos. A figura 11B ilustra imagens das bandas imunoreativas para TSPO e GAPDH de células de tumor de Ehrlich de animais do grupo controle e diazepam, utilizadas nas análises densitométricas da razão TSPO/GAPDH.

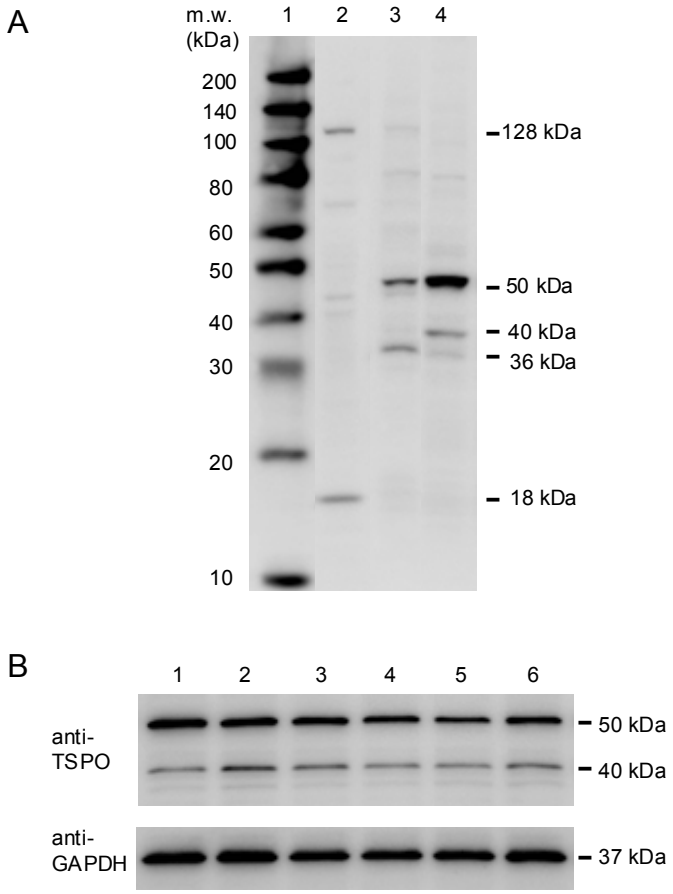

Figura 11 - *Western blot* ilustrando bandas imunoreativas para TSPO e GAPDH. (A) Controle de peso molecular (coluna 1) e bandas imunoreativas para TSPO de extratos de proteína de adrenal (coluna 2), testículo (coluna 3) e tumor de Ehrlich (coluna 4). (B) Bandas imunoreativas para TSPO e GAPDH de extratos de proteína de células do tumor de Ehrlich do grupo controle (colunas 1-3) e do grupo tratado com diazepam (colunas 4-6)

A tabela 15 mostra os efeitos do tratamento com diazepam (3,0mg/kg) ou com a solução controle deste, durante 7 dias, via oral sobre a quantidade de bandas imunoreativas para TSPO (analisados pela razão TSPO:GAPDH) presentes nas células do TAE quando avaliados por *western blot*. Os camundongos foram inoculados com 5,0 x 10^6 células do TAE por animal.

A análise estatística mostrou que não há diferença significante entre os dados obtidos após os tratamentos com diazepam (3,0mg/kg) ou com a solução controle deste no relativo à quantidade de TSPO nos tamanhos aproximados de 40kDa e 50 kDa ($p>0,05$, teste t de Student).

Tabela 15 - Efeitos da administração de diazepam 3,0mg/kg ou da solução controle deste sobre a quantidade de TSPO (razão TSPO/GAPDH) detectado por *western blot* em células tumorais de ascite induzida em camundongos pela inoculação com tumor de Ehrlich ($5,0 \times 10^6$ células/animal)

Grupos [(1)]	**Controle**	**Diazepam**
TSPO/GAPDH - 40kDa	0,533 ± 0,232	0,527 ± 0,324
TSPO/GAPDH - 50kDa	0,858 ± 0,143	0,895 ± 0,108

(1) os dados representam a média ± desvio padrão
$p>0,05$ (teste "t" de Student)

Resultados – Citometria de Fluxo

A figura 12A ilustra um citograma FSC (tamanho) x SSC (complexidade interna) das células do tumor ascítico de Ehrlich e também ilustra a região R1 correspondente às células do TAE analisadas para este experimento. A figura 12B ilustra um histograma de intensidade de fluorescência para FL-1, observamos a sobreposição da fluorescência de células incubadas apenas com o anticorpo secundário conjugado a FITC e de células incubadas com o anticorpo primário anti-TSPO e também o anticorpo secundário conjugado a FITC.

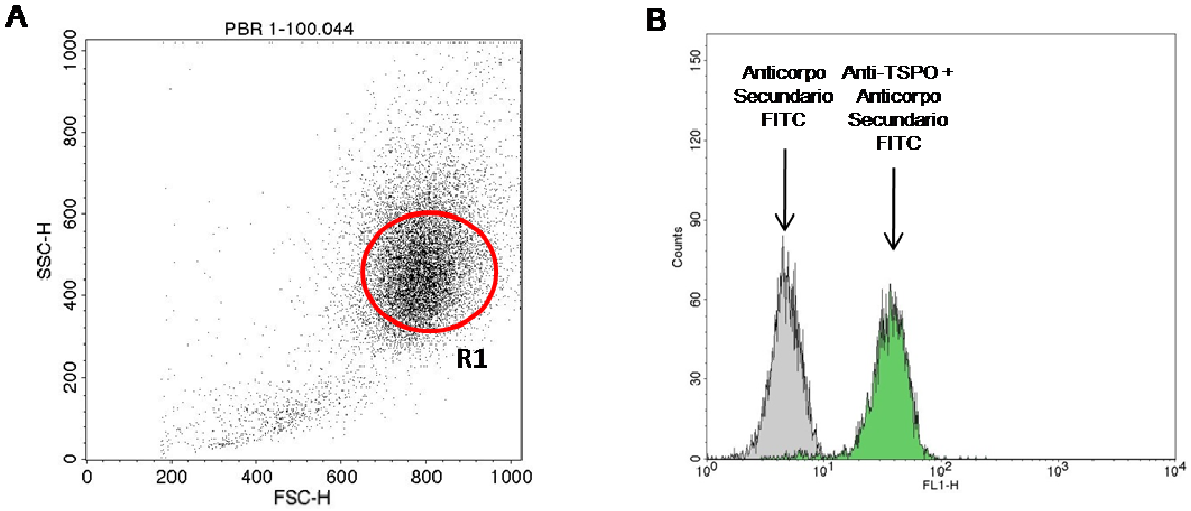

Figura 12 - *Dot Plot* e Histograma representativos de células do tumor ascítico de Ehrlich, respectivamente. (A) População R1 analisada e equivalente às células tumorais. (B) Histograma de sobreposição da fluorescência das células incubadas apenas com o anticorpo secundário conjugado a FITC (cinza) e outro de células incubadas com o anticorpo primário anti-TSPO e também o anticorpo secundário conjugado a FITC (verde)

A tabela 16 mostra os efeitos do tratamento com diazepam (3,0mg/kg) ou com a solução controle deste, durante 7 dias, via oral sobre a porcentagem de células positivas para TSPO e a quantidade de TSPO presentes nas células do TAE quando avaliados por citometria de fluxo. Os camundongos foram inoculados com 5,0 x 10^6 células do TAE por animal.

A análise estatística mostrou que não há diferenças significantes entre os dados obtidos após os tratamentos com diazepam (3,0mg/kg) ou com a solução controle deste no relativo à porcentagem de células positivas para TSPO e da quantidade de TSPO presentes nas células do TAE ($p>0,05$, teste t de Student).

Tabela 16 - Efeitos da administração de diazepam (3,0mg/kg) ou da solução controle deste sobre a porcentagem de células positivas e quantidade de TSPO presente nas células da ascite induzida em camundongos pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal)

Grupos[(1)]	Controle	Diazepam
% de células positivas	99,27 ± 1,45	99,91 ± 0,13
Quantidade de TSPO/célula	45,85 ± 1,22	49,48 ± 11,94

(1) os dados representam a média ± desvio padrão
p>0,05 (teste "t" de Student)

5.11 EXPERIMENTO 11 - AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM DIAZEPAM SOBRE OS VALORES DE KD E BMAX POR PK11195 EM CÉLULAS DO TAE AVALIADOS PELO ENSAIO DE *BINDING*

Foram utilizados 12 camundongos divididos ao acaso em 2 grupos: controle e diazepam. Os animais do grupo experimental receberam 3,0mg/Kg/dia de diazepam, e aqueles do grupo controle receberam 0,1ml/10g/dia de solução controle do diazepam (propilenoglicol 20% diluído em ringer simples). Os animais foram tratados por via oral, uma vez ao dia, durante 7 dias.

Animais de todos os grupos receberam 5,0 x 10^6 células do TAE no primeiro dia de tratamento (item 4.4.1) e foram avaliados após 7 dias da inoculação. Foi coletado o fluido ascítico dos camundongos para avaliação do *binding* de PK11195 por células do tumor de Ehrlich como descrito nos item 4.9 células MDA-MB-231 e MA-10 foram utilizadas como controles positivos (item 4.5).

Resultados

A figura 13 ilustra a utilização das células tumorais MDA-MB-231 e MA-10 como controles positivos do ensaio de *binding* de PK11195 por células do tumor de Ehrlich.

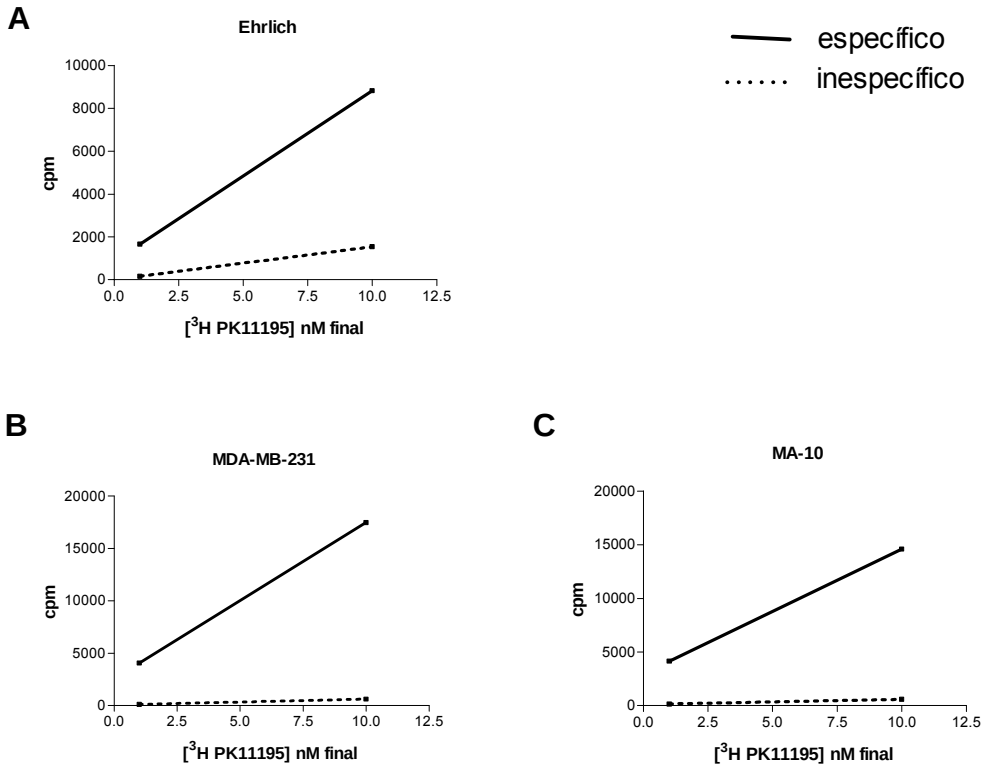

Figura 13 - Gráficos representativos do *binding* específico e inespecífico de (A) células do tumor de Ehrlich (objeto de estudo) (B) células MDA-MB-231 e (C) células MA-10 (utilizadas como controle positivo) incubadas com duas diferentes concentrações de [^{3}H] PK11195 (1nM e 10nM)

A figura 14A ilustra uma curva não linear (curva de Scatchard) dos valores de *binding* total, específico e não específico utilizada para a determinação dos valores de Kd e Bmax do ensaio de *binding* por [^{3}H]PK11195. Observamos na figura 14B representação dos valores de *binding* específico por meio de uma curva linear e também a interpolação da mesma no eixo X.

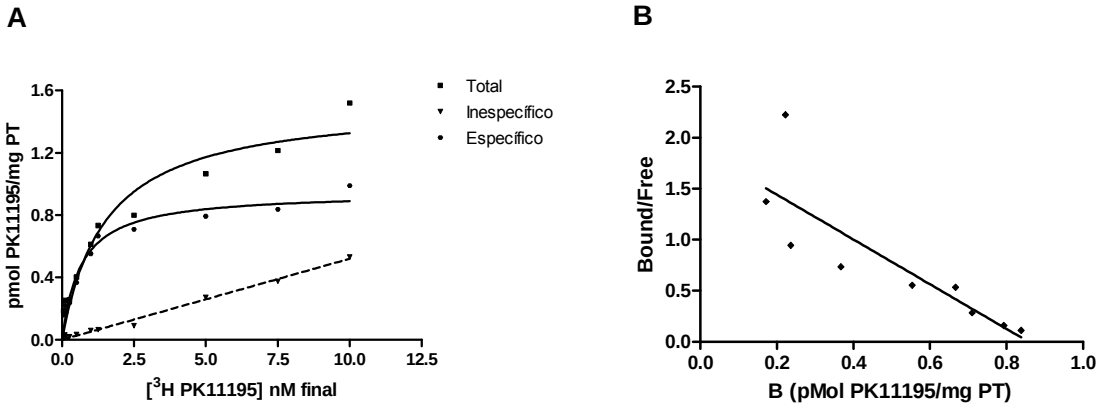

Figura 14 - Gráficos representativos utilizados para a determinação de Kd e Bmax do ensaio de *binding* de [^{3}H] PK11195 por células do tumor de Ehrlich. (A) Curva não linear com os valores de *binding* total, específico e inespecífico. (B) Representação linear dos valores de *binding* específico

A tabela 17 mostra os efeitos do tratamento com diazepam (3,0mg/kg) ou com a solução controle deste, durante 7 dias, via oral sobre os valores de Kd (constante de afinidade) e Bmax (quantidade de sítios de ligação) de PK11195 presentes nas células do TAE quando avaliados pelo ensaio de *binding*. Os camundongos foram inoculados com 5,0 x 10^6 células do TAE por animal.

A análise estatística mostrou que não há diferenças significantes entre os dados obtidos após os tratamentos com diazepam (3,0mg/kg) ou com a solução controle deste no relativo aos valores de Kd e Bmax das células do TAE ($p>0,05$, teste t de Student).

Tabela 17 - Efeitos da administração de diazepam 3,0mg/kg ou da solução controle deste sobre a Kd (constante de afinidade) e Bmax (quantidade de sítios de ligação) de PK11195 presentes nas células da ascite induzida em camundongos pela inoculação com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal)

Grupo(1)	**Controle**	**Diazepam**
Kd (nM)	5,19± 1,45	5,91± 3,09
Bmax (pmol/mg proteína)	3,56± 0,70	3,66 ±1,10

(1) os dados representam a média ± desvio padrão
$p>0,05$ (teste t de Student)

5.12 EXPERIMENTO 12 - AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO *IN VIVO* COM DIAZEPAM SOBRE A DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS EM ÓRGÃOS INTRACAVITÁRIOS DE ANIMAIS PORTADORES DO TAE POR MEIO DE ANÁLISE HISTOLÓGICA

Foram utilizados 10 camundongos divididos ao acaso em 2 grupos: controle e diazepam. Os animais do grupo experimental receberam 3,0mg/Kg/dia de diazepam, e aqueles do grupo controle receberam 0,1ml/10g/dia de solução controle do diazepam (propilenoglicol 20% diluído em ringer simples). Os animais foram tratados por via oral, uma vez ao dia, durante 7 dias.

Animais de todos os grupos receberam 5,0 x 10^6 células do TAE no primeiro dia de tratamento (item 4.4.1) e foram avaliados após 7 dias da inoculação. Os órgãos (pulmão, baço, linfonodo, timo, figado e rim) foram coletados para análise microscópica como descrito no item 4.11.

Resultados

A distribuição comparativa de células tumorais em órgãos como pulmão, linfonodo e baço não foi diferente entre os grupos controle e diazepam. Observou-se ausência de células tumorais em fígado, rim e timo. Entretanto, encontrou-se o seguinte padrão histológico de distribuição de células do tumor de Ehrlich: em pulmão observou-se presença de células tumorais livres em alvéolo, microtrombos capilares e focos hemorrágicos com presença de polimorfonucleares; em baço observou-se presença de células aderidas sobre a superfície capsular e focos de infiltração subcapsular em parênquima; em linfonodo observou-se presença de células tumorais invadindo o hilo e seios. A figura 15 ilustra algumas dessas observações.

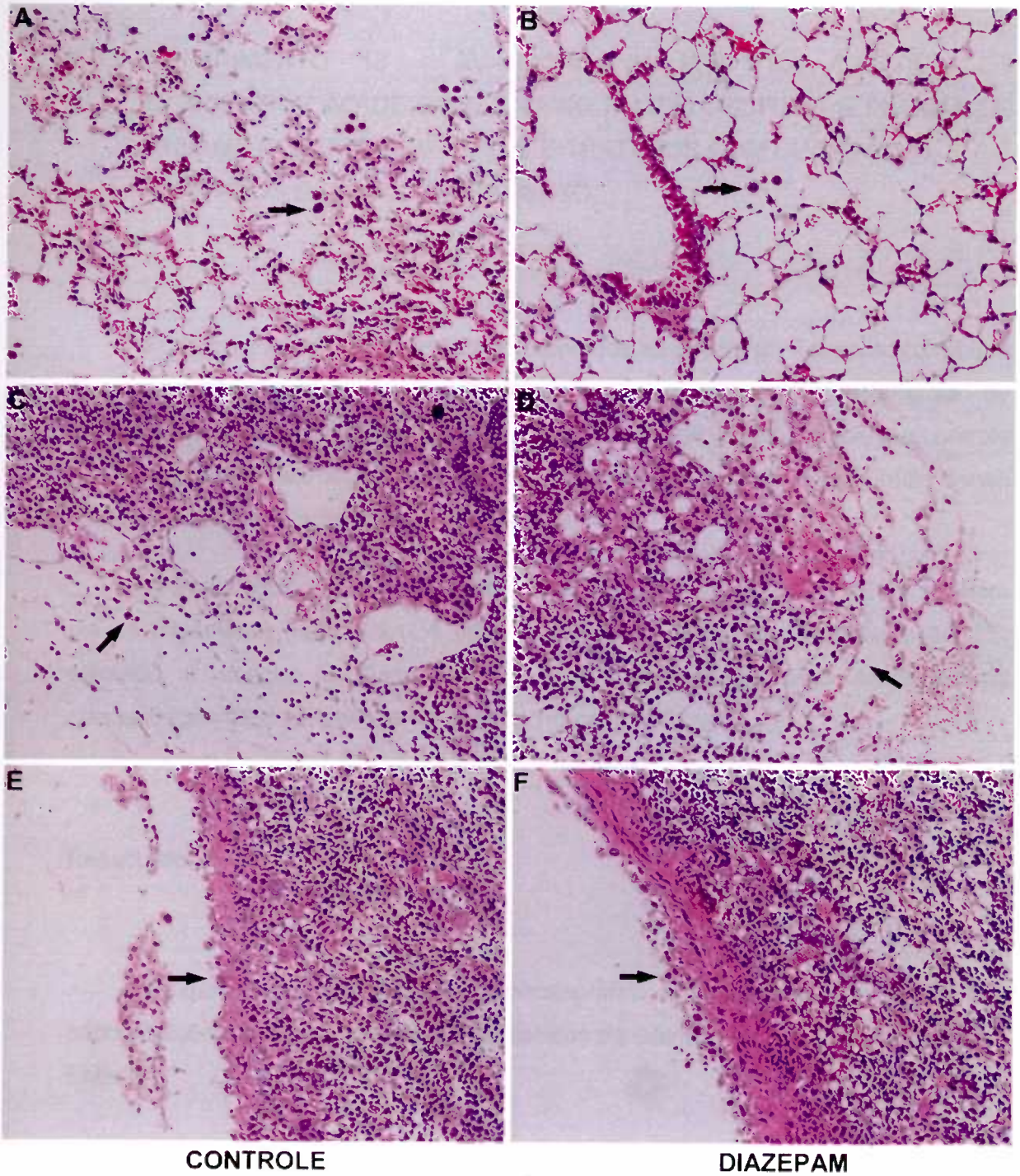

Figura 15 - Fotomicrografia de pulmão, linfonodo pancreático-duodenal e baço de de camundongos inoculados com tumor de Ehrlich (5,0 x 10^6 células/animal): (A e B) Pulmão com células do tumor de Ehrlich livres em espaco alveolar (seta); (C e D) Linfonodo pancreático-duodenal com invasão de células tumorais atraves do hilo (seta); (E e F) Baço com células tumorais na superfície capsular (seta). Coloração Hematoxilina-Eosina, Aumento de 20x

5.13 EXPERIMENTO 13 - AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA CINÉTICA DA CONCENTRAÇÃO DE DIAZEPAM NO FLUIDO ASCÍTICO E PLASMA DE ANIMAIS PORTADORES DO TAE E TRATADOS COM DIAZEPAM (0, 1, 6 E 24HS APÓS O ÚLTIMO TRATAMENTO)

Foram utilizados 40 camundongos divididos ao acaso em 2 grupos: controle e diazepam. Os animais do grupo experimental receberam 3,0mg/Kg/dia de diazepam, e aqueles do grupo controle receberam 0,1ml/10g/dia de solução controle do diazepam (propilenoglicol 20% diluído em ringer simples). Os animais foram tratados por via oral, uma vez ao dia, durante 7 dias.

Animais de todos os grupos receberam 5,0 x 10^6 células do TAE no primeiro dia de tratamento (item 4.4.1) e foram avaliados após 7 dias da inoculação. Foi coletado o sangue e fluido ascítico dos camundongos para avaliação da concentração de diazepam como descrito no item 4.10.

Resultados

A figura 16 ilustra um perfil cromatográfico representativo da análise das concentrações de diazepam no fluido ascítico de animais portadores do tumor de Ehrlich.

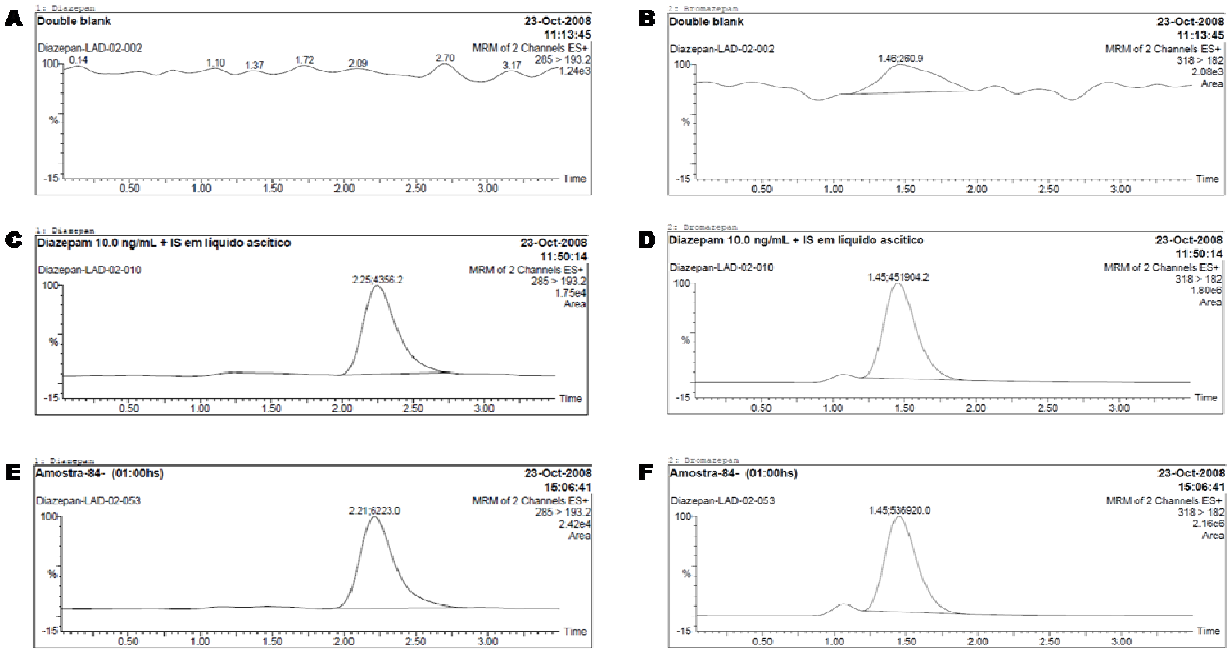

Figura 16 - Perfil cromatográfico da análise das concentrações de diazepam no fluido ascítico de animais portadores de tumor de Ehrlich: (A e B) Amostra de fluido ascítico de animais do grupo controle, (C e D) Amostra de fluido ascítico com concentração de 10ng/ml de diazepam utilizada na curva padrão, (E e F) Amostra de fluido ascítico de animais do grupo diazepam e coletada 1h após o último tratamento. Os perfis A, C e E mostram a detecção de diazepam nos tempos de retenção entre 2,1 e 2,3 e os perfis B, D e F mostram a detecção do padrão interno bromazepam nos tempos de retenção entre 1,4 e 1,6

A tabela 18 mostra e a figura 17 ilustra as concentrações de diazepam encontradas no plasma e fluido ascítico de animais portadores do tumor de Ehrlich, 0, 1, 6 e 24 hs após a última administração de diazepam (3,0mg/kg/dia, via oral, 7 dias).

Tabela 18 - Concentrações de diazepam mensuradas no plasma e fluido ascítico após a administração de 3,0mg/kg/dia, via oral, durante 7 dias, em camundongos portadores do tumor de Ehrlich

Amostras [(1)]	**Diazepam (ng/ml)**			
	0	**1h**	**6h**	**24h**
Plasma	7,47 ± 4,39	10,34 ± 4,36	23,87 ± 13,00	n.d.
Fluido	5,67 ± 3,30	15,41 ± 5,14	4,24 ± 1,98	n.d.

(1) os dados representam a média ± desvio padrão
n.d. = não detectável

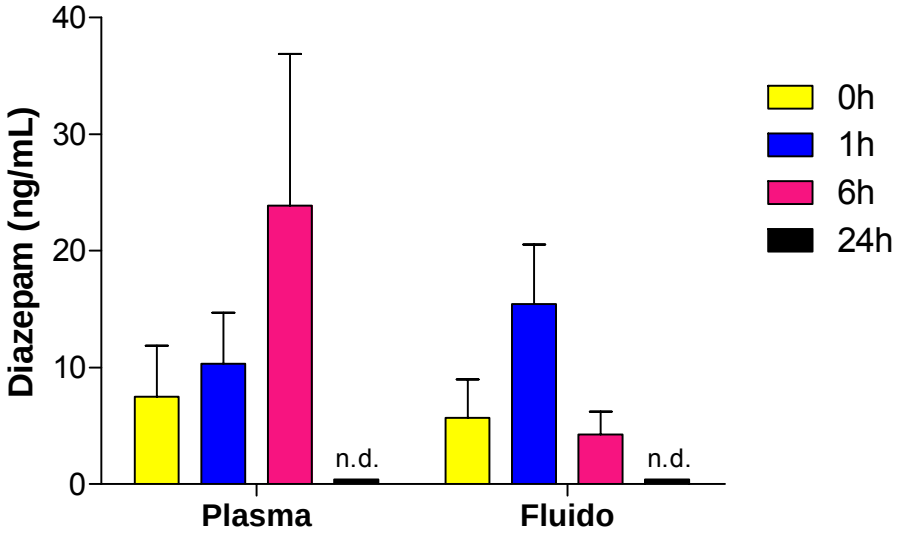

Figura 17 - Concentrações de diazepam mensuradas no plasma e fluido ascítico após a administração de 3,0mg/kg/dia, via oral, durante 7 dias, em camundongos portadores do tumor de Ehrlich. As amostras foram coletadas nos tempos 0h, 1h, 6h e 24h após a última administração do diazepam. (n.d. = não detectável)

5.14 EXPERIMENTO 14 - DETERMINAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO DE *Tspo* EM CÉLULAS DO TUMOR DE EHRLICH E COMPARÁ-LO COM A SEQUÊNCIA NORMAL DE CAMUNDONGO

Células do TAE foram assepticamente coletadas de um camundongo portador do tumor ascítico de Ehrlich inoculado há aproximadamente 7 dias. Procedeu-se à extração de DNA destas células e ao ensaio de PCR para *Tspo* (item 4.6.1). Os produtos obtidos no ensaio de PCR foram clonados em *E. Coli* e o sequenciamento foi realizado como descrito nos 4.6.2 e 4.6.3, respectivamente.

Resultados

A figura 18A ilustra um cromatograma de qualidade do sequenciamento e também, em maiores detalhes, a figura 18B ilustra as bases de DNA sequenciadas (A=adenina, C=citosina, G=guanina, T=timina) e suas respectivas posições.

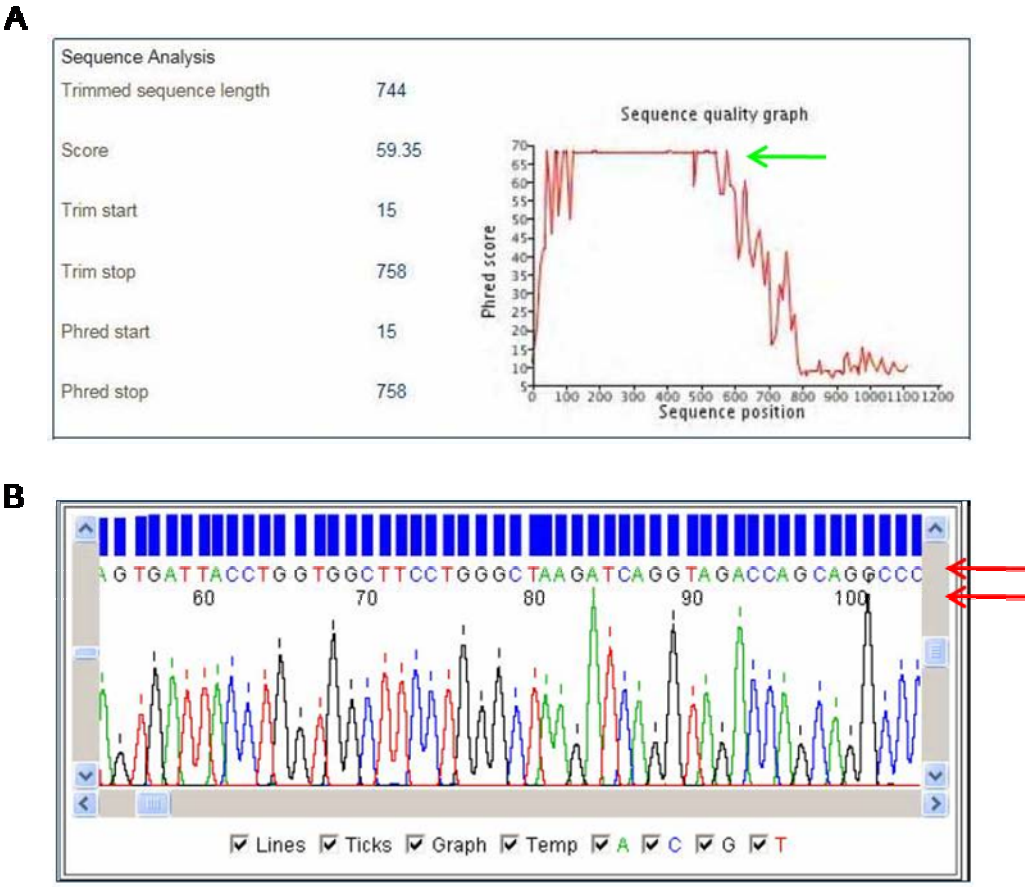

Figura 18 - Cromatograma do sequenciamento de *Tspo*. (A) Gráfico de qualidade de sequenciamento. As amostras apresentaram um alto *score* de qualidade de sequenciamento da região de interesse como indicado pela seta (aproximadamente entre a posição 150 e 550). (B) Quadro ilustrando em detalhes os nucleotídeos sequenciados e ilustrados com diferentes cores (A=adenina, C=citosina, G=guanina, T=timina), assim como sua posição como indicados pelas setas. Os picos detectados encontram-se espaçados, agudos e altos, parâmetros indicativos de acurácia da técnica

A figura 19 ilustra o alinhamento da sequência de nucleotídeos de *Tspo* obtida de células do tumor de Ehrlich com a sequência de nucleotídeos de *Tspo* descrita para camundongos. A dedução dos aminoácidos também foi realizada para ambas sequências.

```
Posição        1                                       11
Normal Tspo    ATG CCT GAA TCC TGG GTG CCT GCC GTG GGC - CTC ACT CTG GTG CCC AGC CTG GGG GGC TTC -
Ehrlich Tspo   ATG CCT GAA TCC TGG GTG CCT GCC GTG GGC - CTC ACT CTG GTG CCC AGC CTG GGG GGC TTC -
Normal Tspo     M   P   E   S   W   V   P   A   V   G   -   L   T   L   V   P   S   L   G   G   F -
Ehrlich Tspo    M   P   E   S   W   V   P   A   V   G   -   L   T   L   V   P   S   L   G   G   F -

Posição        21                                      31
Normal Tspo    ATG GGA GCC TAC TTT GTA CGT GGC GAG GGC - CTC CGG TGG TAT GCT AGC TTG CAG AAA CCC -
Ehrlich Tspo   ATG GGA GCC TAC TTT GTA CGT GGC GAG GGC - CTC CGG TGG TAT GCT AGC TTG CAG AAA CCC -
Normal Tspo     M   G   A   Y   F   V   R   G   E   G   -   L   R   W   Y   A   S   L   Q   K   P -
Ehrlich Tspo    M   G   A   Y   F   V   R   G   E   G   -   L   R   W   Y   A   S   L   Q   K   P -

Posição        41                                      51                  &
Normal Tspo    TCT TGG CAT CCG CCT CGC TGG ACA CTG GCT - CCC ATC TGG GCA ACA CTG TAT TCA GCC ATG -
Ehrlich Tspo   TCT TGG CAT CCG CCT CGC TGG ACA CTG GCT - CCC ATC TGG GGC ACA CTG TAT TCA GCC ATG -
Normal Tspo     S   W   H   P   P   R   W   T   L   A   -   P   I   W   A   T   L   Y   S   A   M -
Ehrlich Tspo    S   W   H   P   P   R   W   T   L   A   -   P   I   W   G   T   L   Y   S   A   M -

Posição        61                                      71
Normal Tspo    GGG TAT GGC TCC TAC ATA GTC TGG AAA GAG - CTG GGA GGT TTC ACA GAG GAC GCT ATG GTT -
Ehrlich Tspo   GGG TAT GGC TCC TAC ATA GTC TGG AAA GAG - CTG GGA GGT TTC ACA GAG GAC GCT ATG GTT -
Normal Tspo     G   Y   G   S   Y   I   V   W   K   E   -   L   G   G   F   T   E   D   A   M   V -
Ehrlich Tspo    G   Y   G   S   Y   I   V   W   K   E   -   L   G   G   F   T   E   D   A   M   V -

Posição        81                                      91
Normal Tspo    CCC TTG GGT CTC TAC ACT GGT CAG CTG GCT - CTG AAC TGG GCG TGG CCC CCC ATC TTC TTT -
Ehrlich Tspo   CCC TTG GGT CTC TAC ACT GGT CAG CTG GCT - CTG AAC TGG GCG TGG CCC CCC ATC TTC TTT -
Normal Tspo     P   L   G   L   Y   T   G   Q   L   A   -   L   N   W   A   W   P   P   I   F   F -
Ehrlich Tspo    P   L   G   L   Y   T   G   Q   L   A   -   L   N   W   A   W   P   P   I   F   F -

Posição        101                                     111
Normal Tspo    GGT GCC CGG CAG ATG GGC TGG GCC TTG GCC - GAT CTT CTG CTT GTC AGT GGG GTG GCG ACT -
Ehrlich Tspo   GGT GCC CGG CAG ATG GGC TGG GCC TTG GCC - GAT CTT CTG CTT GTC AGT GGG GTG GCG ACT -
Normal Tspo     G   A   R   Q   M   G   W   A   L   A   -   D   L   L   L   V   S   G   V   A   T -
Ehrlich Tspo    G   A   R   Q   M   G   W   A   L   A   -   D   L   L   L   V   S   G   V   A   T -

Posição        121                                     131  #
Normal Tspo    GCC ACA ACC CTG GCT TGG CAC CGA GTG AGC - CCG CCC GCT GCC CGC TTG CTG TAC CCT TAC -
Ehrlich Tspo   GCC ACA ACC CTG GCT TGG CAC CGA GTG AGC - CCG CCG GCT GCC CGC TTG CTG TAC CCT TAC -
Normal Tspo     A   T   T   L   A   W   H   R   V   S   -   P   P   A   A   R   L   L   Y   P   Y -
Ehrlich Tspo    A   T   T   L   A   W   H   R   V   S   -   P   P   A   A   R   L   L   Y   P   Y -

Posição        141                                     151
Normal Tspo    CTG GCC TGG CTG GCT TTT GCC ACC GTG CTC - AAC TAC TAT GTA TGG CGT GAT AAC TCT GGC -
Ehrlich Tspo   CTG GCC TGG CTG GCT TTT GCC ACC GTG CTC - AAC TAC TAT GTA TGG CGT GAT AAC TCT GGC -
Normal Tspo     L   A   W   L   A   F   A   T   V   L   -   N   Y   Y   V   W   R   D   N   S   G -
Ehrlich Tspo    L   A   W   L   A   F   A   T   V   L   -   N   Y   Y   V   W   R   D   N   S   G -

Posição        161                                &
Normal Tspo    CGG CGA GGG GGC TCC CGG CTG GCA GAG TGA
Ehrlich Tspo   CGG CGA GGG GGC TCC CGG CTG CCA GAG TGA
Normal Tspo     R   R   G   G   S   R   L   A   E
Ehrlich Tspo    R   R   G   G   S   R   L   P   E
```

Nucleotídeos:
A = adenina, C = citosina, G = guanina, T = timina
Aminoácidos:
A = alanina; C = cisteína; D = aspartato; E = glutamato; F = fenilalanina; G = glicina; H = histidina;
I = isoleucina; K = lisina; L = leucina; M = metionina; N = asparagina; O = pirolisina; P = prolina;
Q = glutamina; R = arginina; S = serina; T = treonina; U = selenocisteína; V = valina; W = triptofano; Y = tirosina

Figura 19 - Sequência parcial de nucleotídeos de *Tspo* de células do tumor de Ehrlich e de *Tspo* de células normais. Observa-se o alinhamento das sequências de nucleotídeos de *Tspo* das células do tumor de Ehrlich com a sequência de *Tspo* já publicada para camundongo. A dedução dos aminoácidos revelou que somente duas dessas mutações alteram a sequência dos aminoácidos (& - alanina 54 por glicina e alanina 168 por prolina) enquanto a outra mutação permanece silenciosa (# - prolina 132)

5.15 EXPERIMENTO 15 - DETECÇÃO DE RECEPTORES DE ESTRÓGENO EM CÉLULAS DO TAE POR MEIO DA TÉCNICA DE *WESTERN BLOT*

Células do TAE foram assepticamente coletadas de um camundongo portador do tumor ascítico de Ehrlich inoculado há aproximadamente 7 dias. Procedeu-se a extração e quantificação de proteínas das células tumorais (item 4.8.1 e 4.8.2). A detecção de receptor de estrógeno β (ERβ) foi realizada pela técnica de *western blot*, utilizando-se anti-ERβ diluído a 1:1000 conforme descrito em detalhes nos itens 4.8.3 e 4.8.4.

Resultados

A figura 20 ilustra imagens adquiridas para análise das bandas imunoreativas para o ERβ. As células do tumor de Ehrlich apresentaram bandas imunoreativas para ERβ nos tamanhos aproximados de 50kDa e 80 kDa, já descrito como um importante marcador prognóstico para células de tumores de mama.

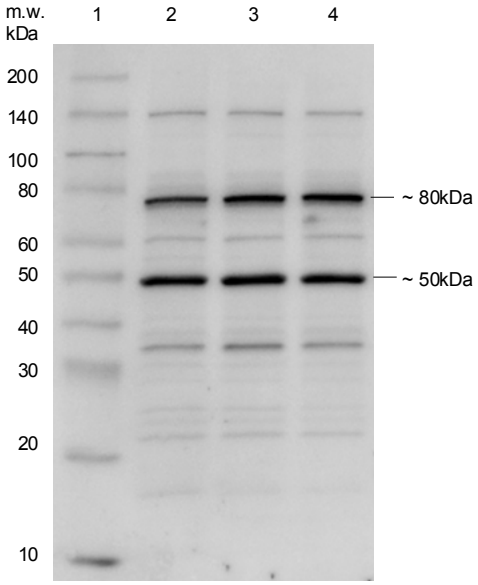

Figura 20 - *Western blot* ilustrando bandas imunoreativas para receptor de estrógeno β (ERβ). Controle de peso molecular (coluna 1) e bandas imunoreativas para ERβ (~ 50kDa e ~80kDa) de extratos de proteína de células do tumor de Ehrlich (coluna 2 - 4)

6 DISCUSSÃO

Os presentes resultados mostraram que o tratamento *in vivo* com diazepam na dose de 3,0mg/kg, administrado por via oral, durante 7 dias: 1) aumentou o crescimento do TAE, como observado através do maior volume ascítico do tumor e do número de células tumorais totais, não interferindo com a concentração de células tumorais no fluido ascítico; 2) não interferiu com a porcentagem de células em fase G0-G1, mas diminuiu a porcentagem de células em fase S e aumentou a porcentagem de células em G2-M do ciclo; 3) aumentou a porcentagem de células em apoptose; 4) aumentou a produção de EROs pelas células tumorais.

Neste mesmo sentido, o tratamento *in vivo* com Ro5-4864 na dose de 3,0mg/kg, administrado por via oral, durante 7 dias: 5) aumentou o crescimento do TAE, como observado através do maior volume ascítico do tumor e do número de células tumorais totais, não interferindo com a concentração de células tumorais no fluido ascítico; 6) não interferiu com a porcentagem de células em fase G0-G1, mas aumentou a porcentagem de células em fase S e diminuiu a porcentagem de células em G2-M do ciclo; 7) não interferiu com a porcentagem de células em apoptose; 8) aumentou a produção de EROs pelas células tumorais.

Por outro lado, o tratamento *in vivo* com clonazepam na dose de 3,0mg/kg, por via oral e durante 7 dias: 9) aumentou o número de células tumorais/ml do fluido ascítico, mas não interferiu com o volume e o número de células tumorais totais (indicando que o crescimento do tumor foi igual para os dois grupos analisados); 10) não interferiu com a porcentagem de células em fase G0-G1, S e G2-M do ciclo; 11) não interferiu com a porcentagem de células em apoptose; 12) não interferiu com a produção de EROs pelas células tumorais.

Além disso este mesmo tratamento *in vivo* com diazepam não modificou a distribuição de células tumorais nos órgãos avaliados e a expressão de TSPO nas células do tumor de Ehrlich (*western blot* e citometria de fluxo) ou os valores de Kd e Bmax de PK11195 nas células do tumor de Ehrlich (ensaio de *binding*). Entretanto, detectou-se nestas células uma alta porcentagem de células positivas para TSPO,

uma elevada afinidade por PK11195 e a presença de polímeros de TSPO nos tamanhos de 40kDa e 50 kDa.

O tratamento com diazepam na dose de 3,0 mg/kg, via oral, por 7 dias resultou em níveis quantificáveis deste fármaco no plasma e fluido ascítico dos animais portadores do tumor de Ehrlich, sendo estes valores observados bastante próximos aos da afinidade (Kd) do PK11195 por células do tumor de Ehrlich.

Por último, o sequenciamento parcial da TSPO presente nas células tumorais revelou 3 mutações nos nucleotídeos, sendo 1 delas silenciosa; observou-se ainda que as células do tumor de Ehrlich utilizadas neste estudo expressam Receptor de Estrógeno, um importante marcador do prognóstico de neoplasias de mama.

Já foi previamente demonstrado, em nossos laboratórios, que o tratamento com diazepam (na dose de 3,0mg/Kg, administrado por via oral, durante 7 dias) induz um aumento do crescimento do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos, como evidenciado pelo maior volume e maior número de células tumorais obtidas do líquido ascítico dos mesmos (SAKAI et al., 2006a). Este mesmo efeito não foi observado quando foram empregadas doses menores de diazepam como de 0,6mg/Kg e de 1,0mg/Kg (SAKAI et al., 2006a), caracterizando-se uma NOEL (*No Observed Effect Dose Level*) de 1,0 mg/kg para o diazepam neste processo. Desta forma, os resultados agora relatados e referentes à dose de 3,0mg/Kg de diazepam reforçam e complementam nossos dados anteriores, deixando evidente que esta dose deste benzodiazepínico aumenta o crescimento tumoral. Nesse sentido, observamos que o aumento de volume do fluido ascítico foi diretamente proporcional ao aumento de número de células tumorais totais, portanto, é plausível inferir, como já realizado por outros, que o maior número destas células seja a causa do maior volume de fluido (FASTAIA; DUMONT, 1976; PALERMO-NETO et al., 2003; MORGULIS et al., 2004; PALERMO-NETO et al., 2008).

Observamos também que o padrão de distibuição de células tumorais em órgãos como pulmão, linfonodo e baço foi similar entre os grupos diazepam e controle. Este fato sugere que embora o tratamento com diazepam aumente o crescimento tumoral, o mesmo não interfere com a disseminação das células do tumor de Ehrlich. Neste contexto, sabe-se que o mecanismo de disseminação de células do tumor de Ehrlich em camundongos ocorre por via linfática (DAGLI, 1989).

De maneira complementar a estes resultados realizou-se uma análise das fases do ciclo celular com base no conteúdo de DNA do tumor de Ehrlich (Fase G0-G1 – repouso/ gap 1, Fase S – síntese de DNA e Fase G2-M – gap 2/ pré-mitose) (NUNEZ, 2001). Desta forma, observamos que as células tumorais dos animais tratados *in vivo* com diazepam apresentaram uma menor porcentagem de células em fase S e uma maior porcentagem daquelas em fase G2-M. É possível, portanto, que o maior número de células, observadas no microscópio, provenientes dos animais tratados com diazepam seja um reflexo da maior porcentagem de células em fase G2-M (células em fase gap 2/ pré-mitose) como agora observado por citometria de fluxo. Observou-se também que a porcentagem de células em fase S encontrava-se diminuída, esse fato poderia estar diretamente relacionado ao aumento de células em fase G2-M.

Neste contexto, sabe-se que o controle do ciclo celular é realizado principalmente por proteínas denominadas CDK (*cyclin dependent kinases*) responsáveis pelo controle dos chamados *checkpoints* (NISHITANI; LYGEROU, 2002; 2004). Este controle garante, por exemplo, que a fase G2-M apenas se inicie após o término completo da fase S (NISHITANI; LYGEROU, 2002; 2004). Assim, é possível que em nossos experimentos tenha ocorrido uma desregulação no sistema de CDK, das células do tumor de Ehrlich, o que teria facilitado a passagem de células da fase S para a G2-M.

Os processos de proliferação e morte celular, embora sejam opostos, encontram-se intimamente conectados; sendo que algumas proteínas reguladoras e vias de sinalização do ciclo celular podem influenciar tanto a divisão quanto a apoptose celular (VERMEULEN et al., 2003; MADDIKA et al., 2007). Neste sentido as células tumorais dos animais tratados *in vivo* com diazepam apresentaram maior porcentagem de apoptose, mas não foram encontradas diferenças para células em necrose. Os dados agora obtidos, apontam para os dois fatos, i.e, para um aumento da proliferação e um aumento da morte celular após o tratamento com o diazepam. Entretanto, deve ser notado que os dados referentes ao crescimento tumoral também mostram um aumento do número total de células do tumor de Ehrlich após a administração de diazepam, o que indica que as mesmas apresentam maiores índices de proliferação do que de morte celular.

Alguns estudos prévios mostraram que a administração *in vivo* de diazepam (1,7 a 2,5 mg/kg) em ratos aumentou o crescimento de tumores transplantáveis, como o tumor de mama R3230 (KARMALI et al., 1979) e o tumor de Walker 256 no rim (KARMALI et al., 1980). Posteriormente, Diwan e colaboradores mostraram em modelo de hepatocarcinogênese que a exposição prolongada ao diazepam e ao oxazepam (mas não ao clonazepam) aumentava o número e a malignidade de lesões neoplásicas no fígado, o que levou estes autores a sugerir que estes benzodiazepínicos seriam substâncias promotoras de tumores em camundongos (DIWAN et al., 1986; DIWAN et al., 1989). Um estudo posterior sugeriu que o mecanismo de hepatocarcinogênese destes benzodiazepínicos seria decorrente de uma indução de diferentes subtipos de citocromo P450 hepática (PARKINSON et al., 2006). Nossos dados concordam com os acima citados a partir de outros modelos experimentais, pois mostram que os benzodiazepínicos apresentam importantes e notáveis efeitos *in vivo* sobre o desenvolvimento de algumas doenças e, em especial, sobre as neoplasias.

Apesar da escassez de estudos sobre os efeitos dos benzodiazepínicos sobre o crescimento tumoral, este assunto tem despertado, com alguma frequência, interesse de algumas agências de pesquisa. Neste sentido, destaca-se pesquisa e monografia publicadas pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer na França (IARC) sobre avaliação de riscos de carcinógenos em humanos. Em 1996 esta agência publicou uma monografia sobre diversos fármacos, dentre eles os benzodiazepínicos, não relatando evidências de carcinogenicidade para o diazepam em humanos ou animais. Outro importante programa de pesquisa, o Programa Nacional de Toxicologia (NTP) nos Estados Unidos, realizou diversos estudos sobre o benzodiazepínico oxazepam encontrando evidências claras de carcinogenicidade por ele induzidas em camundongos (1993). Ressalta-se que uma publicação recente aponta que apenas 8 dos 41 benzodiazepínicos e análogos comercializados apresentaram todos os dados necessários para este tipo de avaliação de acordo com as atuais regras para testes farmacêuticos de genotoxicidade e carcinogenicidade (BRAMBILLA et al., 2007). Neste sentido, os estudos que avaliam os efeitos *in vivo* dos benzodiazepínicos sobre o crescimento, a proliferação e a morte celular são escassos, e além disso, pouco se sabe sobre o mecanismo pelo qual estes efeitos ocorrem.

Desta forma, o Receptor Periférico para Benzodiazepínico (PBR) ou Proteína Translocadora (TSPO) tem sido encontrado e descrito em diversos tipos de tumores, sendo um possível alvo para efeitos de benzodiazepínicos e drogas ligantes com afinidade por esta proteína. Da mesma forma que o tratamento com diazepam *in vivo*, o Ro5-4864 (ligante de TSPO) quando administrado na dose de 3,0mg/kg, por via oral, por 7 dias também induziu um maior crescimento do tumor ascítico de Ehrlich e um aumento da porcentagem de células tumorais em fases associadas a proliferação (fase G2-M); entretanto, este tratamento não modificou de forma significante os índices de morte celular. Por outro lado, em relação ao tratamento com clonazepam *in vivo,* embora tenha sido encontrada uma diferença estatística para o número de células tumorais/ml (concentração de células do fluido ascítico), este fato não pode ser interpretado como decorrente de um maior crescimento do tumor já que o volume e o número de células tumorais totais permaneceram iguais após os tratamentos com clonazepam. Também foi observada uma ausência de efeitos significantes sobre ciclo e morte celular após este tratamento. Desta forma, quer nos parecer, que os efeitos do diazepam sobre o crescimento tumoral e ciclo celular sejam decorrentes de seus efeitos, diretos e exclusivos em TSPO e não sobre os receptores GABA.

Diversos resultados descritos na literatura e obtidos a partir de experimentos *in vitro* mostram que ligantes de TSPO podem induzir a proliferação ou morte de células tumorais. Inicialmente estes resultados foram considerados controversos, mas atualmente é possível compreender que os mesmos encontram-se condicionados à utilização de diferentes concentrações de ligantes. Neste sentido, é importante ressaltar que foi descrito um aumento da proliferação de células tumorais após o tratamento *in vitro* com ligantes de TSPO. Mais especificamente, este fato já foi observado para células de tumor de mama BT-20 (BEINLICH et al., 2000) e MDA-231 (HARDWICK, M. et al., 1999) e para células de hepatocarcinoma T1 (CORSI et al., 2005; CORSI et al., 2008) expostas *in vitro* a pequenas concentrações (nanomolares) dos ligantes Ro5-4864 e PK11195. Por outro lado, o tratamento de células tumorais com elevadas concentrações (micromolares) dos igantes de TSPO reduziram a proliferação ou aumentaram a morte celular de fibrosarcomas (KLETSAS et al., 2004), células de tumor colon-retal HCT116

(MAASER et al., 2004), células de esôfago KYSE-140 e OE-33 (SUTTER et al., 2004) e tumor hepático (SUTTER et al., 2005).

Importante ressaltar que já havíamos encontrado em nossos laboratórios um aumento da proliferação das células tumorais como evidenciado pelo aumento da porcentagem de células em fase S-G2-M do tumor de Ehrlich após tratamento *in vitro* com concentrações nanomolares de diazepam ou Ro5-4864 (SAKAI et al., 2006b). No presente trabalho de tese foi possível ampliar esta constatação visto que observamos idêntico efeito em células tumorais expostas *in vivo*, sugerindo esta observação ser este efeito dependente da TSPO. Neste sentido, a TSPO surge como um importante alvo dos efeitos *in vitro* e *in vivo* do diazepam assim como outras drogas que tenham afinidade por esta proteína. De fato, outros trabalhos tem atribuído que alguns dos efeitos do diazepam ocorram via TSPO, não somente efeitos sobre a proliferação de células tumorais (como os observados no presente trabalho), mas também efeitos sobre a resposta inflamatória aguda em camundongos e ratos (TORRES et al., 1999; TORRES et al., 2000; LAZZARINI et al., 2001; LAZZARINI et al., 2006); atividade de macrófagos (ZAVALA et al., 1990; MASSOCO, C.; PALERMO-NETO, 2003); processos neurodegenerativos (WILMS et al., 2003; SARNOWSKA et al., 2009) e síntese de esteróides (PAPADOPOULOS et al., 1997; FALCHI et al., 2007).

Observamos em nossos trabalhos um aumento da produção de EROs em células do tumor de Ehrlich dos animais tratados com diazepam. Demonstramos também que esse aumento da produção de EROs foi observado após o tratamento com Ro5-4864, porém não ocorreu após o tratamento com o clonazepam, sugerindo, portanto, que seja mediado pela TSPO. Recentemente, foi demonstrado que o tratamento *in vivo* com diazepam (3,0 mg/kg) induz aumento da proliferação e da atividade oxidativa de hepatócitos. Mais que isso, o pré-tratamento com anti-oxidantes como a Vitamina C e a Melatonina induziu uma redução desses efeitos (EL-SOKKARY, 2008). Outros autores mostraram que o tratamento *in vitro* com PK11195 utilizando concentrações micromolares induziu citotoxicidade de células de leucemia HL60 (mas não as de linfoma SUDHL4), fato este positivamente correlacionado com a quantidade de EROs produzidas pelas mesmas (FENNELL et al., 2001).

Acredita-se que as funções dos EROs sejam decorrentes de seus níveis intracelulares. De fato, níveis mais baixos de EROs atuam como segundos mensageiros regulando a sinalização intracelular e a proliferação de células normais. No entanto, níveis elevados dos mesmos tem sido encontrados em células tumorais e isso decorre em ativação constante de fatores de transcrição que causam e/ou alteram a progressão tumoral. Especificamente, causam aumento da proliferação, da sobrevivência celular, das taxas de mutação, do dano ao DNA e promovem transformação oncogênica (BENHAR et al., 2002; BEHREND et al., 2003).

Entretanto, sabe-se que o estresse oxidativo depende do balanço entre a produção de espécies reativas com capacidade oxidantes e anti-oxidantes. Os mecanismos pelos quais o *status* oxidativo celular induz a morte ou proliferação celular encontram- se em investigação; porém, sabe-se que esta resposta depende do tipo celular e da concentração de EROs assim como do envolvimento de vias intracelulares específicas (STORZ, 2005; MATES et al., 2008). Portanto, é possivel sugerir que os níveis aumentados de EROs produzidos por células do tumor de Ehrlich após o tratamento com diazepam ou Ro5-4864 agora encontrados em nossos experimentos participem de vias de sinalização intracelulares que induzem morte ou proliferação de células do tumor de Ehrlich.

Neste sentido, os efeitos *in vivo* do diazepam sobre o crescimento do tumor de Ehrlich parecem ser dependentes de TSPO e também da quantidade de EROs produzida pelas células tumorais. Dados publicados anteriormente mostraram serem os ligantes de TSPO capazes de aumentar a proliferação de células do tumor de Ehrlich após tratamento *in vitro*. Além disso, mostramos pela técnica de imunocitoquímica que células do tumor de Ehrlich expressam TSPO, que se encontra localizada na região nuclear desta célula tumoral. Entretanto, pouco se conhece sobre outras características das TSPO presentes nas células do tumor de Ehrlich. Atualmente sabe-se que a localização nuclear ou citoplasmatica, a quantidade expressa, a afinidade pelo ligante PK11195, a presenca de polímeros de TSPO são características bastante variáveis dentre as células tumorais e muitas vezes determinam sua responsividade aos ligantes assim como seu potencial proliferativo e seu fenótipo maligno (BEINLICH et al., 1999; HARDWICK, M. et al.,

1999; BEINLICH et al., 2000; BROWN et al., 2000; SANGER et al., 2000; HARDWICK, M. et al., 2001; DELAVOIE et al., 2003; WEISINGER et al., 2004; CORSI et al., 2005; MUKHOPADHYAY et al., 2006; CORSI et al., 2008).

Investigando a expressão de TSPO, nós encontramos ausência de diferenças entre as células de tumor de Ehrlich de camundongos controle e tratados *in vivo* com diazepam de acordo com os dados obtidos nos ensaios de *western blot*, citometria de fluxo e *binding* de PK11195. Estes resultados indicam que apesar de serem os efeitos do diazepam sobre o aumento do crescimento do tumor de Ehrlich dependentes da TSPO, este mesmo tratamento não modificou a expressão desta proteína.

O aumento da expressão de TSPO tem sido associado com a patogênese do câncer; neste sentido, diversos relatos da literatura apontam para uma correlação positiva entre a quantidade de TSPO e o grau de malignidade em células tumorais de mama e de adenocarcinoma de cólon em humanos (MAASER et al., 2002; HAN et al., 2003; GALIEGUE et al., 2004; MAASER et al., 2005). Além disso, as células de tumor hepático com maior expressão de TSPO na região nuclear/perinuclear apresentam menor tempo para duplicação e tem sua proliferação aumentada em resposta a ligantes de TSPO (CORSI et al., 2005), as células de tumor de mama MDA-231 cujos subtipos expressam altos níveis de TSPO também apresentam maior tumorigenicidade *in vivo* (HARDWICK, M. et al., 2001). Em nossos experimentos os animais tratados com diazepam apresentaram um aumento do crescimento tumoral e da porcentagem de células em fases proliferativas, porém não se encontraram diferenças quanto à expressão de TSPO de células tumorais de animais tratados com diazepam ou daquelas do grupo controle. Desta forma, podemos inferir a partir de nossos experimentos que o tratamento com diazepam tenha sido incapaz de modificar as células do tumor de Ehrlich em relação à expressão de TSPO e, possivelmente, ao seu grau de malignidade.

Encontramos em nossos experimentos uma alta porcentagem de células do tumor de Ehrlich com marcação positiva para TSPO. Mostrou-se, especificamente, por meio da técnica de citometria de fluxo que aproximadamente 100% das células tumorais de Ehrlich expressavam TSPO. Estudos prévios realizados com outros tipos de tumor também indicaram presença de alta positividade para TSPO quando

comparados com células normais; outros trabalhos mostraram existência de uma correlação positiva entre a expressão de TSPO e o fenótipo maligno de células tumorais (DELAVOIE et al., 2003; HAN et al., 2003; GALIEGUE et al., 2004; CORSI et al., 2005; MAASER et al., 2005; VLODAVSKY; SOUSTIEL, 2007).

Por meio da técnica de *western blot*, foram observadas bandas imunoreativas para TSPO nos tamanhos aproximados de 18 kDa e 128kDa na adrenal, de 36 kDa e 50kDa no testículo e de 40 kDa e 50kDa nas células do tumor de Ehrlich *in vivo*. O tamanho de uma unidade funcional de TSPO é de 18kDa; assim os tamanhos maiores, encontrados em nossos experimentos, podem ser interpretados como sendo referentes a polímeros desta proteína. Sabe-se que a ligação entre os polímeros de TSPO ocorre em decorrência da formação de di-tirosinas; neste sentido polímeros de 2 a 3 subunidades (e eventualmente de um número até superior de subunidades) foram evidenciados com freqüência maior em células tumorais, especificamente em células de tumor de mama MDA-231 humanas (DELAVOIE et al., 2003), linfomas do tipo T Jurkat humanos (COSTA et al., 2006) e tumores de mama induzidos por carcinógeno DMBA em ratos (MUKHOPADHYAY et al., 2006). Estes achados concordam com as presentes observações que os extendem para o tumor de Ehrlich.

Porém, há que ressaltar que algumas células de tumor de mama da linhagem MCF-7, BT-474 e T47-D apresentam alta porcentagem de positividade para TSPO e isto não obrigatoriamente significa que as mesmas apresentem alta afinidade pelos ligantes de TSPO*;* de fato, estas linhagens de células tumorais apresentam baixa afinidade pelos ligantes Ro5-4864 ou PK11195 (BEINLICH et al., 1999; 2000). Neste mesmo sentido, embora tenham sido detectados polímeros de TSPO nos tamanhos de 18kDa e 36kDa em células de linfomas do tipo T Jurkat humanos, a afinidade destas células pelos ligantes e bastante baixa (Kd PK11195 = 2,2μM e Kd Ro5-4864 = 1,77μM). Ou seja, a expressão de TSPO e a presenca de polímeros nas células tumorais não tem correlação com a afinidade das mesmas pelos ligantes PK11195 ou Ro5-4864. Desta forma, à semelhanca das células tumorais acima descritas, embora as células do tumor de Ehrlich apresentem alta expressão de TSPO e presença de polímeros, não é possível inferir por estes dados se as mesmas possuem baixa ou alta afinidade pelos ligantes em TSPO. Mesmo assim,

nossos estudos de *binding* mostraram que as células do tumor de Ehrlich apresentaram uma elevada afinidade por PK11195 (Kd = 5,19nM).

Já foram descritas na literatura que células do tumor de mama apresentam alta afinidade por PK11195 ou Ro5-4864 em outras espécies; destacam-se, portanto, as células de tumor de mama da linhagem MDA-MB-231 (Kd = 7,8nM) e da linhagem BT-20 (Kd = 8,5nM) em humanos e as células de tumor de mama induzido por carcinógeno DMBA em ratos (Kd = 5,93nM) (HARDWICK, M. et al., 1999; BEINLICH et al., 2000; MUKHOPADHYAY et al., 2006). Por outro lado, células de tumor de mama humanas da linhagem MCF-7, T47-D e BT-474 apresentaram valores de afinidade não detectáveis por meio de ensaios de *binding* (HARDWICK, M. et al., 1999; BEINLICH et al., 2000).

A clonagem e o sequenciamento de TSPO têm sido descrita em humanos, camundongos, suínos e bovinos (PAROLA et al., 1991; LIN et al., 1993; HARDWICK, M. et al., 1999; LIU et al., 2003; COSTA et al., 2006; ZHANG et al., 2006). Tanto na TSPO encontrada em células de tumor de mama humanas MDA-231 e MCF-7, como também em células de linfoma humanas Jurkat foram encontradas duas mutações pontuais nos mesmos aminoácidos (147 e 162), quando comparadas com as seqüências normais humanas (HARDWICK, M. et al., 1999; COSTA et al., 2006). Em nossos experimentos comparamos o sequenciamento parcial de TSPO para as células de tumor de Ehrlich com a sequência normal descrita para TSPO de camundongos. As sequências de nucleotídeos para TSPO encontradas nas células do tumor de Ehrlich mostraram três mutações pontuais, resultando na substituição de dois aminoácidos, os 54 e 168. De fato, células do tumor de Ehrlich foram descritas como um adenocarcinoma mamário agressivo transplantável em camundongos (HARTVEIT, 1965); nossos dados mostraram que essas mutações nos aminoácidos também podem ser encontradas em células de tumor em camundongos, onde elas poderiam participar de um relevante papel na patogênese do câncer. Entretanto, ainda não está estabelecido se essas mutações causam modificação significante quer na estrutura quer na função da TSPO.

Além disso, avaliamos também em nossos trabalhos a presença de receptores para estrógeno em células do tumor de Ehrlich; encontramos marcação

positiva para os mesmos. Importante lembrar que a presença ou não destes receptores é de extrema importância para a classificação, estudo e prognóstico das neoplasias de mama humanas (BEHRENS et al., 2007; SPEIRS, 2008) e que estudos que determinam a presença dos mesmos em células do tumor de Ehrlich apontam para resultados opostos dependendo do laboratório, e possivelmente, dos subtipos deste tumor (AYDINER et al., 1997; OZCAN ARICAN; OZALPAN, 2007).

Em trabalho anterior, mostramos que células do tumor de Ehrlich apresentavam TSPO na região nuclear e, também, que o tratamento com diazepam (em baixas concentrações - 100nM a 600nM) aumentava a proliferação de células do tumor de Ehrlich *in vitro* (SAKAI et al., 2006b). Os resultados *in vivo*, relacionados aos níveis de diazepam, mostraram que a concentração máxima (Cmax) de diazepam quantificada foi de 23,87ng/ml no plasma e de 15,41ng/ml no fluido ascítico induzido pelo tumor, i.e., 83,83nM e 54,12nM, respectivamente. Se tomarmos os resultados de concentração de diazepam e os analisados em relação ao valor de Kd estimado para o PK11195 (5,19nM) obtemos fortes evidências de que, como previamente observado *in vitro*, os efeitos *in vivo* do diazepam agora obtidos sobre o crescimento do tumor possam ser decorrentes de uma ação direta desta droga (presente no fluido ascítico) na TSPO presente nas células do tumor de Ehrlich que se desenvolveu na cavidade peritoneal dos animais.

Tomados em seu conjunto, os presentes resultados sugerem que os efeitos do diazepam *in vivo* sobre o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich sejam decorrentes de ações específicas nos sítios de ligação TSPO presentes nas células tumorais. Também mostramos alta porcentagem de expressão de TSPO em células do tumor de Ehrlich em camundongos; que apresentaram polímeros nos tamanhos de 40 e 50kDa e mutações no sequenciamento parcial dos nucleotídeos. Acreditamos que estes achados *in vivo* possam oferecer novos horizontes para uma melhor compreensão das relações entre os ligantes de TSPO e a proliferação de células tumorais. Neste sentido, quer nos parecer que seja relevante apontar para o fato de que os efeitos de ligantes de TSPO sobre a proliferação e morte de células tumorais são fortemente dependentes do tipo de ligante, da linhagem celular e dos níveis de TSPO nas células tumorais. Portanto, acreditamos que alguma possível

extrapolação dos presentes achados biológicos para outros tumores e/ou espécies animais deva ser realizada com cautela.

De qualquer forma, embora não tenham sido encontradas evidências epidemiológicas que correlacionem o uso de benzodiazepínicos e a incidência de tumores em humanos (ROSENBERG et al., 1995; HALAPY et al., 2006) vale lembrar que os benzodiazepínicos são amplamente utilizados pelas suas propriedades ansiolíticas e sedativas em pacientes portadores ou não de neoplasias (STIEFEL et al., 1999; SRIVASTAVA; WALSH, 2003) o que aponta para a necessidade de cuidado quando deste uso, que jamais deveria ser feito sem a devida prescrição médica. De fato, em nossos experimentos utilizamos uma dose de 3,0 mg/Kg, por via oral (uma dose de diazepam considerada ansiolítica) para camundongos (GRIEBEL et al., 2000; HAGENBUCH et al., 2006). Além disso, as concentrações plasmáticas agora quantificadas em camundongos encontram-se próximas dos valores determinados no plasma de humanos após o uso oral de doses (5 a 10mg) também consideradas como ansiolíticas (ATTA-POLITOU et al., 1999; ROUINI et al., 2008).

7 CONCLUSÕES

7.1 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

O tratamento *in vivo* com diazepam (3,0 mg/kg, via oral, por 7 dias):

a. Aumentou o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich e a porcentagem de células em fase G2-M;
b. Aumentou a porcentagem de células tumorais positivas para anexina e PI;
c. Aumentou a produção de EROs por células tumorais.

O tratamento *in vivo* com Ro5-4864 (3,0 mg/kg, via oral, por 7 dias):

d. Aumentou o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich e a porcentagem de células em fase S;
e. Não modificou a porcentagem de morte celular;
f. Aumentou a produção de EROs por células tumorais.

O tratamento *in vivo* com clonazepam (3,0 mg/kg, via oral, por 7 dias):

g. Não modificou quer o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich quer o ciclo celular;
h. Não modificou a porcentagem de morte celular;
i. Não modificou a produção de EROs por células tumorais.

O tratamento *in vivo* com diazepam (3,0 mg/kg, via oral, por 7 dias):

j. Não modificou a expressão de TSPO nas células do tumor de Ehrlich (*western blot* e citometria de fluxo), entretanto detectou-se a presença de polímeros e alta porcentagem de células tumorais positivas para TSPO.

k. Não modificou os valores de Kd e Bmax de PK11195 nas células do tumor de Ehrlich (*binding*), entretanto detectou-se nestas células uma alta afinidade de PK11195 por TSPO.

l. Não modificou a distribuição de células tumorais em órgãos intracavitários de animais portadores do TAE.

m. Resultou na presença de níveis quantificáveis do fármaco no plasma e no fluido ascítico de animais portadores do tumor de Ehrlich.

Finalmente,

n. O sequenciamento parcial da *Tspo* presente nas células tumorais revelou 3 mutações nos nucleotídeos, sendo 1 delas silenciosa.

o. As células do tumor de Ehrlich utilizadas neste estudo expressam Receptor de Estrógeno.

7.2 CONCLUSÃO GERAL

Tomados em seu conjunto, estes achados mostram que as ações *in vivo* do diazepam sobre o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich ocorrem não somente de maneira dependente da TSPO, mas também de maneira direta sobre as células do tumor de Ehrlich. O tratamento com diazepam aumentou o número de células com maior potencial proliferativo e a produção de EROs, entretanto este aumento não apresentou correlação com alteração nos níveis de TSPO (que foram similares). Demonstrou-se que estas células tumorais são um possível alvo para efeitos de benzodiazepínicos e drogas ligantes de TSPO e, finalmente, sugere-se que o padrão farmacológico e bioquímico de expressão de TSPO nas células do tumor de Ehrlich indiquem um papel dos mesmos na patogênese do cancer.

REFERÊNCIAS

ADER, R.; COHEN, N. Behaviorally conditioned immunosuppression. **Psychosomatic Medicine**, v. 37, n. 4, p. 333-340, 1975.

ADER, R.; COHEN, N. Behaviorally conditioned immunosuppression and murine systemic lupus erythematosus. **Science**, v. 215, n. 4539, p. 1534-1536, 1982.

ALHO, H.; VARGA, V.; KRUEGER, K. E. Expression of mitochondrial benzodiazepine receptor and its putative endogenous ligand diazepam binding inhibitor in cultured primary astrocytes and C-6 cells: relation to cell growth. **Cell Growth and Differentiation**, v. 5, n. 9, p. 1005-1014, 1994.

ALVES, G. J.; VISMARI, L.; FLORIO, J. C.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a sick cage mate: Effects on noradrenaline turnover and neutrophil activity. **Neuroscience Research**, v. 56, n. 2, p. 172-179, 2006.

ALVES, G. J.; VISMARI, L.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a sick cage mate: effects on ascitic form of Ehrlich tumor growth and macrophage activity. **Neuroimmunomodulation**, v. 14, n. 6, p. 297-303, 2007.

ANHOLT, R. R.; DE SOUZA, E. B.; OSTER-GRANITE, M. L.; SNYDER, S. H. Peripheral-type benzodiazepine receptors: autoradiographic localization in whole-body sections of neonatal rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 233, n. 2, p. 517-526, 1985.

ANHOLT, R. R.; PEDERSEN, P. L.; DE SOUZA, E. B.; SNYDER, S. H. The peripheral-type benzodiazepine receptor. Localization to the mitochondrial outer membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 2, p. 576-583, 1986.

ATTA-POLITOU, J.; PARISSI-POULOU, M.; DONA, A.; KOUTSELINIS, A. A modified simple and rapid reversed phase liquid chromatographic method for quantification of diazepam and nordiazepam in plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 20, n. 1-2, p. 389-396, 1999.

AYDINER, A.; RIDVANOGULLARI, M.; ANIL, D.; TOPUZ, E.; NURTEN, R.; DISCI, R. Combined effects of epirubicin and tamoxifen on the cell-cycle phases in estrogen-receptor-negative Ehrlich ascites tumor cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 123, n. 2, p. 113-117, 1997.

AZPIROZ, A.; DE MIGUEL, Z.; FANO, E.; VEGAS, O. Relations between different coping strategies for social stress, tumor development and neuroendocrine and immune activity in male mice. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 22, n. 5, p. 690-698, 2008.

BARTROP, R. W.; LUCKHURST, E.; LAZARUS, L.; KILOH, L. G.; PENNY, R. Depressed lymphocyte function after bereavement. **Lancet**, v. 1, n. 8016, p. 834-836, 1977.

BASSO, A. S.; PINTO, F. A.; RUSSO, M.; BRITTO, L. R.; DE SA-ROCHA, L. C.; PALERMO NETO, J. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **Journal of Neuroimmunology**, v. 140, n. 1-2, p. 69-77, 2003.

BEHREND, L.; HENDERSON, G.; ZWACKA, R. M. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, n. Pt 6, p. 1441-1444, 2003.

BEHRENS, D.; GILL, J. H.; FICHTNER, I. Loss of tumourigenicity of stably ERbeta-transfected MCF-7 breast cancer cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 274, n. 1-2, p. 19-29, 2007.

BEINLICH, A.; STROHMEIER, R.; KAUFMANN, M.; KUHL, H. Relation of cell proliferation to expression of peripheral benzodiazepine receptors in human breast cancer cell lines. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, n. 3, p. 397-402, 2000.

BEINLICH, A.; STROHMEIER, R.; KAUFMANN, M.; KUHL, H. Specific binding of benzodiazepines to human breast cancer cell lines. **Life Sciences**, v. 65, n. 20, p. 2099-2108, 1999.

BENAVIDES, J.; GUILLOUX, F.; ALLAM, D. E.; UZAN, A.; MIZOULE, J.; RENAULT, C.; DUBROEUCQ, M. C.; GUEREMY, C.; LE FUR, G. Opposite effects of an agonist, RO5-4864, and an antagonist, PK 11195, of the peripheral type benzodiazepine binding sites on audiogenic seizures in DBA/2J mice. **Life Sciences**, v. 34, n. 26, p. 2613-2620, 1984.

BENAVIDES, J.; MALGOURIS, C.; IMBAULT, F.; BEGASSAT, F.; UZAN, A.; RENAULT, C.; DUBROEUCQ, M. C.; GUEREMY, C.; LE FUR, G. "Peripheral type" benzodiazepine binding sites in rat adrenals: binding studies with [3H]PK 11195 and autoradiographic localization. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v. 266, n. 1, p. 38-49, 1983.

BENHAR, M.; ENGELBERG, D.; LEVITZKI, A. ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. **EMBO Reports**, v. 3, n. 5, p. 420-425, 2002.

BERKENBOSCH, F.; VAN OERS, J.; DEL REY, A.; TILDERS, F.; BESEDOVSKY, H. Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. **Science**, v. 238, n. 4826, p. 524-526, 1987.

BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; DINARELLO, C. A. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. **Science**, v. 233, n. 4764, p. 652-654, 1986.

BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E. Network of immune-neuroendocrine interactions. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 27, n. 1, p. 1-12, 1977.

BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E.; FELIX, D.; HAAS, H. Hypothalamic changes during the immune response. **European Journal of Immunology**, v. 7, n. 5, p. 323-325, 1977.

BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E.; KELLER, M.; MULLER, J. Changes in blood hormone levels during the immune response. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 150, n. 2, p. 466-470, 1975.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. The cytokine-HPA axis feed-back circuit. **Zeitschrift fur Rheumatologie**, v. 59 Suppl 2, n., p. II/26-30, 2000.

BESSLER, H.; CASPI, B.; GAVISH, M.; REHAVI, M.; HART, J.; WEIZMAN, R. Peripheral-type benzodiazepine receptor ligands modulate human natural killer cell activity. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 19, n. 5, p. 249-254, 1997.

BEURDELEY-THOMAS, A.; MICCOLI, L.; OUDARD, S.; DUTRILLAUX, B.; POUPON, M. F. The peripheral benzodiazepine receptors: a review. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 46, n. 1, p. 45-56, 2000.

BLALOCK, J. E. The immune system as the sixth sense. **Journal of Internal Medicine**, v. 257, n. 2, p. 126-138, 2005.

BLALOCK, J. E. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. **Physiological Reviews**, v. 69, n. 1, p. 1-32, 1989.

BLALOCK, J. E. Shared ligands and receptors as a molecular mechanism for communication between the immune and neuroendocrine systems. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 741, n., p. 292-298, 1994.

BOTTASSO, O.; BAY, M. L.; BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A. Immunoendocrine alterations during human tuberculosis as an integrated view of disease pathology. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 2, p. 68-77, 2009.

BOVOLIN, P.; SCHLICHTING, J.; MIYATA, M.; FERRARESE, C.; GUIDOTTI, A.; ALHO, H. Distribution and characterization of diazepam binding inhibitor (DBI) in peripheral tissues of rat. **Regulatory Peptides**, v. 29, n. 2-3, p. 267-281, 1990.

BRAESTRUP, C.; SQUIRES, R. F. **Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H)diazepam binding**. Publisher, Sep, p.3805-3809(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America).

BRAMBILLA, G.; CARROZZINO, R.; MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of benzodiazepines. **Pharmacological Research**, v. 56, n. 6, p. 443-458, 2007.

BRIBES, E.; BOURRIE, B.; CASELLAS, P. Ligands of the peripheral benzodiazepine receptor have therapeutic effects in pneumopathies in vivo. **Immunology Letters**, v. 88, n. 3, p. 241-247, 2003a.

BRIBES, E.; GALIEGUE, S.; BOURRIE, B.; CASELLAS, P. Involvement of the peripheral benzodiazepine receptor in the development of cutaneous pathology in Mrl/Lpr mice. **Immunology Letters**, v. 85, n. 1, p. 13-18, 2003b.

BROWN, R. C.; DEGENHARDT, B.; KOTOULA, M.; PAPADOPOULOUS, V. Location-dependent role of the human glioma cell peripheral-type benzodiazepine receptor in proliferation and steroid biosynthesis. **Cancer Letters**, v. 156, n. 2, p. 125-132, 2000.

BROWN, R. C.; PAPADOPOULOS, V. Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor in adrenal and brain steroidogenesis. **International Review of Neurobiology**, v. 46, n., p. 117-143, 2001.

BUCHER, J. R.; HASEMAN, J. K.; HERBERT, R. A.; HEJTMANCIK, M.; RYAN, M. J. Toxicity and carcinogenicity studies of oxazepam in the Fischer 344 rat. **Toxicological Sciences**, v. 42, n. 1, p. 1-12, 1998.

BUSTO, U. E.; RUIZ, I.; BUSTO, M.; GACITUA, A. Benzodiazepine use in Chile: impact of availability on use, abuse, and dependence. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 16, n. 5, p. 363-372, 1996.

CAMPISI, J.; HANSEN, M. K.; O'CONNOR, K. A.; BIEDENKAPP, J. C.; WATKINS, L. R.; MAIER, S. F.; FLESHNER, M. Circulating cytokines and endotoxin are not necessary for the activation of the sickness or corticosterone response produced by peripheral E. coli challenge. **Journal of Applied Physiology**, v. 95, n. 5, p. 1873-1882, 2003.

CANAT, X.; CARAYON, P.; BOUABOULA, M.; CAHARD, D.; SHIRE, D.; ROQUE, C.; LE FUR, G.; CASELLAS, P. Distribution profile and properties of peripheral-type benzodiazepine receptors on human hemopoietic cells. **Life Sciences**, v. 52, n. 1, p. 107-118, 1993.

CARAYON, P.; PORTIER, M.; DUSSOSSOY, D.; BORD, A.; PETITPRETRE, G.; CANAT, X.; LE FUR, G.; CASELLAS, P. Involvement of peripheral benzodiazepine receptors in the protection of hematopoietic cells against oxygen radical damage. **Blood**, v. 87, n. 8, p. 3170-3178, 1996.

CARLINI, E. A.; GALDUROZ, J. C. F.; NOTO, A. R.; NAPO, S. A. **I levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 107 maiores cidades do país - 2001.** São Paulo: CEBRID – Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo, 2002.

CARLINI, E. A. **II levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país – 2005.** São Paulo: CEBRID – Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo, 2006.

CASELLAS, P.; GALIEGUE, S.; BASILE, A. S. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. **Neurochemistry International**, v. 40, n. 6, p. 475-486, 2002.

CHELLI, B.; SALVETTI, A.; DA POZZO, E.; RECHICHI, M.; SPINETTI, F.; ROSSI, L.; COSTA, B.; LENA, A.; RAINALDI, G.; SCATENA, F.; VANACORE, R.; GREMIGNI, V.; MARTINI, C. PK 11195 differentially affects cell survival in human wild-type and 18 kDa translocator protein-silenced ADF astrocytoma cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 105, n. 3, p. 712-723, 2008.

CHULUYAN, H. E.; SAPHIER, D.; ROHN, W. M.; DUNN, A. J. Noradrenergic innervation of the hypothalamus participates in adrenocortical responses to interleukin-1. **Neuroendocrinology**, v. 56, n. 1, p. 106-111, 1992.

COHN, D. W.; DE SA-ROCHA, L. C. Differential effects of lipopolysaccharide in the social behavior of dominant and submissive mice. **Physiology and Behavior**, v. 87, n. 5, p. 932-937, 2006.

CORSI, L.; GEMINIANI, E.; AVALLONE, R.; BARALDI, M. Nuclear location-dependent role of peripheral benzodiazepine receptor (PBR) in hepatic tumoral cell lines proliferation. **Life Sciences**, v. 76, n. 22, p. 2523-2533, 2005.

CORSI, L.; GEMINIANI, E.; BARALDI, M. Peripheral benzodiazepine receptor (PBR) new insight in cell proliferation and cell differentiation review. **Curr Clin Pharmacol**, v. 3, n. 1, p. 38-45, 2008.

COSENTINO, M.; FIETTA, A.; CALDIROLI, E.; MARINO, F.; RISPOLI, L.; COMELLI, M.; LECCHINI, S.; FRIGO, G. Assessment of lymphocyte subsets and neutrophil leukocyte function in chronic psychiatric patients on long-term drug therapy. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 20, n. 7, p. 1117-1129, 1996.

COSTA-PINTO, F. A.; BASSO, A. S.; BRITTO, L. R.; MALUCELLI, B. E.; RUSSO, M. Avoidance behavior and neural correlates of allergen exposure in a murine model of asthma. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 19, n. 1, p. 52-60, 2005.

COSTA-PINTO, F. A.; BASSO, A. S.; RUSSO, M. Role of mast cell degranulation in the neural correlates of the immediate allergic reaction in a murine model of asthma. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 21, n. 6, p. 783-790, 2007.

COSTA, B.; SALVETTI, A.; ROSSI, L.; SPINETTI, F.; LENA, A.; CHELLI, B.; RECHICHI, M.; DA POZZO, E.; GREMIGNI, V.; MARTINI, C. Peripheral benzodiazepine receptor: characterization in human T-lymphoma Jurkat cells. **Molecular Pharmacology**, v. 69, n. 1, p. 37-44, 2006.

COUTO-MORAES, R.; PALERMO-NETO, J.; MARKUS, R. P. The immune-pineal axis: stress as a modulator of pineal gland function. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1153, n., p. 193-202, 2009.

DAGLI, M.L.Z. **Disseminação linfática do tumor de Ehrlich:** estudo experimental. 1989. 162f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

DAILLY, E.; HASCOET, M.; COLOMBEL, M. C.; JOLLIET, P.; BOURIN, M. Relationship between cerebral pharmacokinetics and anxiolytic activity of diazepam and its active metabolites after a single intra-peritoneal administration of diazepam in mice. **Human Psychopharmacology**, v. 17, n. 5, p. 239-245, 2002.

DANTZER, R.; BLUTHE, R. M.; GHEUSI, G.; CREMONA, S.; LAYE, S.; PARNET, P.; KELLEY, K. W. Molecular basis of sickness behavior. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 856, n., p. 132-138, 1998.

DE PAULA, V. F.; RIBEIRO, A.; PINHEIRO, M. L.; SAKAI, M.; LACAVA, M. C.; LAPACHINSKE, S. F.; MOREAU, R. L.; PALERMO-NETO, J. Methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy) decreases neutrophil activity and alters leukocyte distribution in bone marrow, spleen and blood. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 3, p. 191-200, 2009.

DE SOUZA, E. B.; ANHOLT, R. R.; MURPHY, K. M.; SNYDER, S. H.; KUHAR, M. J. Peripheral-type benzodiazepine receptors in endocrine organs: autoradiographic localization in rat pituitary, adrenal, and testis. **Endocrinology**, v. 116, n. 2, p. 567-573, 1985.

DEL REY, A.; BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E.; DINARELLO, C. A. Interleukin-1 and glucocorticoid hormones integrate an immunoregulatory feedback circuit. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 496, n., p. 85-90, 1987.

DEL REY, A.; BESEDOVSKY, H. O. The cytokine-HPA axis circuit contributes to prevent or moderate autoimmune processes. **Zeitschrift fur Rheumatologie**, v. 59 Suppl 2, n., p. II/31-35, 2000.

DELAVOIE, F.; LI, H.; HARDWICK, M.; ROBERT, J. C.; GIATZAKIS, C.; PERANZI, G.; YAO, Z. X.; MACCARIO, J.; LACAPERE, J. J.; PAPADOPOULOS, V. In vivo and in vitro peripheral-type benzodiazepine receptor polymerization: functional significance in drug ligand and cholesterol binding. **Biochemistry**, v. 42, n. 15, p. 4506-4519, 2003.

DHABHAR, F. S. Stress-induced augmentation of immune function--the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 16, n. 6, p. 785-798, 2002.

DHABHAR, F. S. Stress, leukocyte trafficking, and the augmentation of skin immune function. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 992, n., p. 205-217, 2003.

DIWAN, B. A.; LUBET, R. A.; NIMS, R. W.; KLAUNIG, J. E.; WEGHORST, C. M.; HENNEMAN, J. R.; WARD, J. M.; RICE, J. M. Lack of promoting effect of clonazepam on the development of N-nitrosodiethylamine-initiated hepatocellular tumors in mice is correlated with its inability to inhibit cell-to-cell communication in mouse hepatocytes. **Carcinogenesis**, v. 10, n. 9, p. 1719-1724, 1989.

DIWAN, B. A.; RICE, J. M.; WARD, J. M. Tumor-promoting activity of benzodiazepine tranquilizers, diazepam and oxazepam, in mouse liver. **Carcinogenesis**, v. 7, n. 5, p. 789-794, 1986.

DOBLE, A. New insights into the mechanism of action of hypnotics. **J Psychopharmacol**, v. 13, n. 4 Suppl 1, p. S11-20, 1999.

DUNN, A. J. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. **Clin Neurosci Res**, v. 6, n. 1-2, p. 52-68, 2006.

DUNN, A. J. Systemic interleukin-1 administration stimulates hypothalamic norepinephrine metabolism parallelling the increased plasma corticosterone. **Life Sciences**, v. 43, n. 5, p. 429-435, 1988.

EL-SOKKARY, G. H. Melatonin and vitamin C administration ameliorate diazepam-induced oxidative stress and cell proliferation in the liver of rats. **Cell Proliferation**, v. 41, n. 1, p. 168-176, 2008.

ENGLER, H.; DAWILS, L.; HOVES, S.; KURTH, S.; STEVENSON, J. R.; SCHAUENSTEIN, K.; STEFANSKI, V. Effects of social stress on blood leukocyte distribution: the role of alpha- and beta-adrenergic mechanisms. **Journal of Neuroimmunology**, v. 156, n. 1-2, p. 153-162, 2004.

FALCHI, A. M.; BATTETTA, B.; SANNA, F.; PILUDU, M.; SOGOS, V.; SERRA, M.; MELIS, M.; PUTZOLU, M.; DIAZ, G. Intracellular cholesterol changes induced by translocator protein (18 kDa) TSPO/PBR ligands. **Neuropharmacology**, v. 53, n. 2, p. 318-329, 2007.

FARGES, R.; JOSEPH-LIAUZUN, E.; SHIRE, D.; CAPUT, D.; LE FUR, G.; LOISON, G.; FERRARA, P. Molecular basis for the different binding properties of benzodiazepines to human and bovine peripheral-type benzodiazepine receptors. **FEBS Letters**, v. 335, n. 3, p. 305-308, 1993.

FASTAIA, J.; DUMONT, A. E. Pathogenesis of ascites in mice with peritoneal carcinomatosis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 56, n. 3, p. 547-550, 1976.

FENNELL, D. A.; CORBO, M.; PALLASKA, A.; COTTER, F. E. Bcl-2 resistant mitochondrial toxicity mediated by the isoquinoline carboxamide PK11195 involves de novo generation of reactive oxygen species. **British Journal of Cancer**, v. 84, n. 10, p. 1397-1404, 2001.

FONSECA, E. S.; MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J. Effects of prenatal stress on stress-induced changes in behavior and macrophage activity of mice. **Physiology and Behavior**, v. 77, n. 2-3, p. 205-215, 2002.

FONSECA, E. S.; SAKAI, M.; CARVALHO-FREITAS, M. I.; PALERMO NETO, J. Naloxone treatment prevents prenatal stress effects on peritoneal macrophage activity in mice offspring. **Neuroendocrinology**, v. 81, n. 5, p. 322-328, 2005.

FRIEDMAN, H.; ABERNETHY, D. R.; GREENBLATT, D. J.; SHADER, R. I. The pharmacokinetics of diazepam and desmethyldiazepam in rat brain and plasma. **Psychopharmacology**, v. 88, n. 3, p. 267-270, 1986.

FRITSCH MONTERO, R.; ROJAS CASTILLO, G.; GAETE OLIVARES, J.; ARAYA BALTRA, R.; GONZALEZ RUBIO, I. Benzodiazepine use in Santiago, Chile. **Actas Espanolas de Psiquiatria**, v. 33, n. 5, p. 286-291, 2005.

GALIEGUE, S.; CASELLAS, P.; KRAMAR, A.; TINEL, N.; SIMONY-LAFONTAINE, J. Immunohistochemical assessment of the peripheral benzodiazepine receptor in breast cancer and its relationship with survival. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 6, p. 2058-2064, 2004.

GARNIER, M.; BOUJRAD, N.; OKE, B. O.; BROWN, A. S.; RIOND, J.; FERRARA, P.; SHOYAB, M.; SUAREZ-QUIAN, C. A.; PAPADOPOULOS, V. Diazepam binding inhibitor is a paracrine/autocrine regulator of Leydig cell proliferation and steroidogenesis: action via peripheral-type benzodiazepine receptor and independent mechanisms. **Endocrinology**, v. 132, n. 1, p. 444-458, 1993.

GARNIER, M.; DIMCHEV, A. B.; BOUJRAD, N.; PRICE, J. M.; MUSTO, N. A.; PAPADOPOULOS, V. In vitro reconstitution of a functional peripheral-type benzodiazepine receptor from mouse Leydig tumor cells. **Molecular Pharmacology**, v. 45, n. 2, p. 201-211, 1994.

GAVISH, M.; BACHMAN, I.; SHOUKRUN, R.; KATZ, Y.; VEENMAN, L.; WEISINGER, G.; WEIZMAN, A. Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. **Pharmacological Reviews**, v. 51, n. 4, p. 629-650, 1999.

GAVISH, M.; KATZ, Y.; BAR-AMI, S.; WEIZMAN, R. Biochemical, physiological, and pathological aspects of the peripheral benzodiazepine receptor. **Journal of Neurochemistry**, v. 58, n. 5, p. 1589-1601, 1992.

GODBOUT, J. P.; MOREAU, M.; LESTAGE, J.; CHEN, J.; SPARKMAN, N. L.; J, O. C.; CASTANON, N.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R.; JOHNSON, R. W. Aging exacerbates depressive-like behavior in mice in response to activation of the

peripheral innate immune system. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 10, p. 2341-2351, 2008.

GRAY, P. W.; GLAISTER, D.; SEEBURG, P. H.; GUIDOTTI, A.; COSTA, E. Cloning and expression of cDNA for human diazepam binding inhibitor, a natural ligand of an allosteric regulatory site of the gamma-aminobutyric acid type A receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 19, p. 7547-7551, 1986.

GRIEBEL, G.; BELZUNG, C.; PERRAULT, G.; SANGER, D. J. Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. **Psychopharmacology**, v. 148, n. 2, p. 164-170, 2000.

GUIDOTTI, A.; FORCHETTI, C. M.; CORDA, M. G.; KONKEL, D.; BENNETT, C. D.; COSTA, E. Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 11, p. 3531-3535, 1983.

HAGENBUCH, N.; FELDON, J.; YEE, B. K. Use of the elevated plus-maze test with opaque or transparent walls in the detection of mouse strain differences and the anxiolytic effects of diazepam. **Behavioural Pharmacology**, v. 17, n. 1, p. 31-41, 2006.

HALAPY, E.; KREIGER, N.; COTTERCHIO, M.; SLOAN, M. Benzodiazepines and risk for breast cancer. **Annals of Epidemiology**, v. 16, n. 8, p. 632-636, 2006.

HAN, Z.; SLACK, R. S.; LI, W.; PAPADOPOULOS, V. Expression of peripheral benzodiazepine receptor (PBR) in human tumors: relationship to breast, colorectal, and prostate tumor progression. **Journal of Receptor and Signal Transduction Research**, v. 23, n. 2-3, p. 225-238, 2003.

HARDWICK, M.; CAVALLI, L. R.; BARLOW, K. D.; HADDAD, B. R.; PAPADOPOULOS, V. Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) gene amplification in MDA-MB-231 aggressive breast cancer cells. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 139, n. 1, p. 48-51, 2002.

HARDWICK, M.; FERTIKH, D.; CULTY, M.; LI, H.; VIDIC, B.; PAPADOPOULOS, V. Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in human breast cancer: correlation of breast cancer cell aggressive phenotype with PBR expression, nuclear localization, and PBR-mediated cell proliferation and nuclear transport of cholesterol. **Cancer Research**, v. 59, n. 4, p. 831-842, 1999.

HARDWICK, M.; RONE, J.; HAN, Z.; HADDAD, B.; PAPADOPOULOS, V. Peripheral-type benzodiazepine receptor levels correlate with the ability of human breast cancer MDA-MB-231 cell line to grow in SCID mice. **International Journal of Cancer**, v. 94, n. 3, p. 322-327, 2001.

HARDWICK, M. J.; CHEN, M. K.; BAIDOO, K.; POMPER, M. G.; GUILARTE, T. R. In vivo imaging of peripheral benzodiazepine receptors in mouse lungs: a biomarker of inflammation. **Molecular Imaging**, v. 4, n. 4, p. 432-438, 2005.

HART, K. E. Association of type A behavior and its components to ways of coping with stress. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 32, n. 2, p. 213-219, 1988.

HARTVEIT, F. The immediate cause of death in mice with Ehrlich's ascites carcinoma. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, v. 65, n. 3, p. 359-365, 1965.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 117, n. 1, p. 53-58, 1989.

HAUET, T.; HAN, Z.; WANG, Y.; HAMEURY, F.; JAYLE, C.; GIBELIN, H.; GOUJON, J. M.; EUGENE, M.; PAPADOPOULOS, V. Modulation of peripheral-type benzodiazepine receptor levels in a reperfusion injury pig kidney-graft model. **Transplantation**, v. 74, n. 11, p. 1507-1515, 2002.

HERBERTH, G.; WEBER, A.; RODER, S.; ELVERS, H. D.; KRAMER, U.; SCHINS, R. P.; DIEZ, U.; BORTE, M.; HEINRICH, J.; SCHAFER, T.; HERBARTH, O.; LEHMANN, I. Relation between stressful life events, neuropeptides and cytokines: results from the LISA birth cohort study. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 19, n. 8, p. 722-729, 2008.

HORROBIN, D. F.; TROSKO, J. E. The possible effect of diazepam on cancer development and growth. **Medical Hypotheses**, v. 7, n. 1, p. 115-125, 1981.

JOVANOVA-NESIC, K.; NIKOLIC, V.; JANKOVIC, B. D. Locus ceruleus and immunity. II. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis and hypersensitivity skin reactions in rats with lesioned locus ceruleus. **International Journal of Neuroscience**, v. 68, n. 3-4, p. 289-294, 1993.

KABIERSCH, A.; DEL REY, A.; HONEGGER, C. G.; BESEDOVSKY, H. O. Interleukin-1 induces changes in norepinephrine metabolism in the rat brain. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 2, n. 3, p. 267-274, 1988.

KAMALI, F. Determination of plasma diazepam and desmethyldiazepam by solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 11, n. 7, p. 625-627, 1993.

KARMALI, R. A.; VOLKMAN, A.; MUSE, P.; LOUIS, T. M. The influence of diazepam administration in rats bearing the R3230AC mammary carcinoma. **Prostaglandins and Medicine**, v. 3, n. 3, p. 193-198, 1979.

KARMALI, R. A.; VOLKMAN, A.; SPIVEY, W.; MUSE, P.; LOUIS, T. M. Intrarenal growth of the Walker 256 tumour and renal vein concentrations of PGE2, PGF 2 alpha, and TXB2: effects of diazepam. **Prostaglandins and Medicine**, v. 4, n. 4, p. 239-246, 1980.

KELLEY, K. W.; BLUTHE, R. M.; DANTZER, R.; ZHOU, J. H.; SHEN, W. H.; JOHNSON, R. W.; BROUSSARD, S. R. Cytokine-induced sickness behavior. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 17 Suppl 1, n., p. S112-118, 2003.

KIM, D. H.; LEE, J. T.; LEE, I. K.; HA, J. H. Comparative anticancer effects of flavonoids and diazepam in cultured cancer cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 2, p. 255-259, 2008.

KINOSHITA, D.; COHN, D. W.; COSTA-PINTO, F. A.; DE SA-ROCHA, L. C. Behavioral effects of LPS in adult, middle-aged and aged mice. **Physiology and Behavior**, v. 96, n. 2, p. 328-332, 2009.

KLETSAS, D.; LI, W.; HAN, Z.; PAPADOPOULOS, V. Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) and PBR drug ligands in fibroblast and fibrosarcoma cell proliferation: role of ERK, c-Jun and ligand-activated PBR-independent pathways. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, n. 10, p. 1927-1932, 2004.

KONSMAN, J. P.; PARNET, P.; DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. **Trends in Neurosciences**, v. 25, n. 3, p. 154-159, 2002.

KRUEGER, K. E.; PAPADOPOULOS, V. Peripheral-type benzodiazepine receptors mediate translocation of cholesterol from outer to inner mitochondrial membranes in adrenocortical cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 25, p. 15015-15022, 1990.

LANDAU, M.; WEIZMAN, A.; ZOREF-SHANI, E.; BEERY, E.; WASSEMAN, L.; LANDAU, O.; GAVISH, M.; BRENNER, S.; NORDENBERG, J. Antiproliferative and

differentiating effects of benzodiazepine receptor ligands on B16 melanoma cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, n. 8, p. 1029-1034, 1998.

LAZZARINI, R.; MAIORKA, P. C.; LIU, J.; PAPADOPOULOS, V.; PALERMO-NETO, J. Diazepam effects on carrageenan-induced inflammatory paw edema in rats: role of nitric oxide. **Life Sciences**, v. 78, n. 26, p. 3027-3034, 2006.

LAZZARINI, R.; MALUCELLI, B. E.; MUSCARA, M. N.; DE NUCCI, G.; PALERMO-NETO, J. Reduction of inflammation in rats by diazepam: tolerance development. **Life Sciences**, v. 72, n. 21, p. 2361-2368, 2003.

LAZZARINI, R.; MALUCELLI, B. E.; PALERMO-NETO, J. Reduction of acute inflammation in rats by diazepam: role of peripheral benzodiazepine receptors and corticosterone. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 23, n. 2, p. 253-265, 2001.

LE FUR, G.; GUILLOUX, F.; RUFAT, P.; BENAVIDES, J.; UZAN, A.; RENAULT, C.; DUBROEUCQ, M. C.; GUEREMY, C. Peripheral benzodiazepine binding sites: effect of PK 11195, 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-(1-methylpropyl)-3 isoquinolinecarboxamide. II. In vivo studies. **Life Sciences**, v. 32, n. 16, p. 1849-1856, 1983a.

LE FUR, G.; PERRIER, M. L.; VAUCHER, N.; IMBAULT, F.; FLAMIER, A.; BENAVIDES, J.; UZAN, A.; RENAULT, C.; DUBROEUCQ, M. C.; GUEREMY, C. Peripheral benzodiazepine binding sites: effect of PK 11195, 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide. I. In vitro studies. **Life Sciences**, v. 32, n. 16, p. 1839-1847, 1983b.

LE FUR, G.; VAUCHER, N.; PERRIER, M. L.; FLAMIER, A.; BENAVIDES, J.; RENAULT, C.; DUBROEUCQ, M. C.; GUEREMY, C.; UZAN, A. Differentiation between two ligands for peripheral benzodiazepine binding sites, [3H]RO5-4864 and [3H]PK 11195, by thermodynamic studies. **Life Sciences**, v. 33, n. 5, p. 449-457, 1983c.

LENFANT, M.; ZAVALA, F.; HAUMONT, J.; POTIER, P. [Presence of a peripheral type benzodiazepine binding site on the macrophage; its possible role in immunomodulation]. **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences. Serie III, Sciences de la Vie**, v. 300, n. 8, p. 309-314, 1985.

LEVITE, M. Neurotransmitters activate T-cells and elicit crucial functions via neurotransmitter receptors. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 8, n. 4, p. 460-471, 2008.

LI, W.; HARDWICK, M. J.; ROSENTHAL, D.; CULTY, M.; PAPADOPOULOS, V. Peripheral-type benzodiazepine receptor overexpression and knockdown in human breast cancer cells indicate its prominent role in tumor cell proliferation. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, n. 4, p. 491-503, 2007.

LIGEIRO DE OLIVEIRA, A. P.; LAZZARINI, R.; CAVRIANI, G.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; TAVARES DE LIMA, W.; PALERMO-NETO, J. Effects of single or repeated amphetamine treatment and withdrawal on lung allergic inflammation in rats. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 9, p. 1164-1171, 2008.

LIN, D.; CHANG, Y. J.; STRAUSS, J. F., 3RD; MILLER, W. L. The human peripheral benzodiazepine receptor gene: cloning and characterization of alternative splicing in normal tissues and in a patient with congenital lipoid adrenal hyperplasia. **Genomics**, v. 18, n. 3, p. 643-650, 1993.

LIU, J.; MATYAKHINA, L.; HAN, Z.; SANDRINI, F.; BEI, T.; STRATAKIS, C. A.; PAPADOPOULOS, V. Molecular cloning, chromosomal localization of human peripheral-type benzodiazepine receptor and PKA regulatory subunit type 1A (PRKAR1A)-associated protein PAP7, and studies in PRKAR1A mutant cells and tissues. **FASEB Journal**, v. 17, n. 9, p. 1189-1191, 2003.

LORA, J.; ALONSO, F. J.; SEGURA, J. A.; LOBO, C.; MARQUEZ, J.; MATES, J. M. Antisense glutaminase inhibition decreases glutathione antioxidant capacity and increases apoptosis in Ehrlich ascitic tumour cells. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 21, p. 4298-4306, 2004.

LUKSIENE, Z.; LABEIKYTE, D.; JUODKA, B.; MOAN, J. Mechanism of radiosensitization by porphyrins. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 25, n. 1-2, p. 293-306, 2006.

MAASER, K.; GRABOWSKI, P.; OEZDEM, Y.; KRAHN, A.; HEINE, B.; STEIN, H.; BUHR, H.; ZEITZ, M.; SCHERUBL, H. Up-regulation of the peripheral benzodiazepine receptor during human colorectal carcinogenesis and tumor spread. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 5, p. 1751-1756, 2005.

MAASER, K.; GRABOWSKI, P.; SUTTER, A. P.; HOPFNER, M.; FOSS, H. D.; STEIN, H.; BERGER, G.; GAVISH, M.; ZEITZ, M.; SCHERUBL, H. Overexpression of the peripheral benzodiazepine receptor is a relevant prognostic factor in stage III colorectal cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 10, p. 3205-3209, 2002.

MAASER, K.; SUTTER, A. P.; KRAHN, A.; HOPFNER, M.; GRABOWSKI, P.; SCHERUBL, H. Cell cycle-related signaling pathways modulated by peripheral benzodiazepine receptor ligands in colorectal cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 324, n. 2, p. 878-886, 2004.

MADDIKA, S.; ANDE, S. R.; PANIGRAHI, S.; PARANJOTHY, T.; WEGLARCZYK, K.; ZUSE, A.; ESHRAGHI, M.; MANDA, K. D.; WIECHEC, E.; LOS, M. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. **Drug Resistance Updates**, v. 10, n. 1-2, p. 13-29, 2007.

MAIER, S. F.; GOEHLER, L. E.; FLESHNER, M.; WATKINS, L. R. The role of the vagus nerve in cytokine-to-brain communication. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 840, n., p. 289-300, 1998.

MARSHALL, G. D., JR.; AGARWAL, S. K. Stress, immune regulation, and immunity: applications for asthma. **Allergy and Asthma Proceedings**, v. 21, n. 4, p. 241-246, 2000.

MASSOCO, C.; PALERMO-NETO, J. Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 95, n. 1-2, p. 11-19, 2003.

MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J. Diazepam effects of peritoneal macrophage activity and corticosterone serum levels in Balb/C mice. **Life Sciences**, v. 65, n. 20, p. 2157-2165, 1999.

MATES, J. M.; SEGURA, J. A.; ALONSO, F. J.; MARQUEZ, J. Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. **Archives of Toxicology**, v. 82, n. 5, p. 273-299, 2008.

MATSUZAKI, P.; HARAGUCHI, M.; AKISUE, G.; OLORIS, S. C.; NAGAMINE, M. K.; DA SILVA, T. C.; SAKAI, M.; DE SOUZA MONTEIRO FONSECA, E.; PALERMO-NETO, J.; GORNIAK, S. L.; DAGLI, M. L. Antineoplastic effects of butanolic residue of Pfaffia paniculata. **Cancer Letters**, v. 238, n. 1, p. 85-89, 2006.

MCENERY, M. W.; SNOWMAN, A. M.; TRIFILETTI, R. R.; SNYDER, S. H. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 8, p. 3170-3174, 1992.

MCEWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 3, p. 873-904, 2007.

MECHAN, A. O.; MORAN, P. M.; ELLIOTT, M.; YOUNG, A. J.; JOSEPH, M. H.; GREEN, R. A comparison between Dark Agouti and Sprague-Dawley rats in their behaviour on the elevated plus-maze, open-field apparatus and activity meters, and their response to diazepam. **Psychopharmacology**, v. 159, n. 2, p. 188-195, 2002.

MORGULIS, M. S.; STANKEVICIUS, D.; SA-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a sick cage mate: consequences on behavior and on ehrlich tumor growth. **Neuroimmunomodulation**, v. 11, n. 1, p. 49-57, 2004.

MUKHOPADHYAY, S.; MUKHERJEE, S.; DAS, S. K. Increased expression of peripheral benzodiazepine receptor (PBR) in dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors in rats. **Glycoconjugate Journal**, v. 23, n. 3-4, p. 199-207, 2006.

NANCE, D. M.; SANDERS, V. M. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). **Brain, Behavior and Immunity**, v. 21, n. 6, p. 736-745, 2007.

NIKOLIC, V.; JOVANOVA-NESIC, K.; JANKOVIC, B. D. Locus ceruleus and immunity. I. Suppression of plaque-forming cell response and antibody production in rats with lesioned locus ceruleus. **International Journal of Neuroscience**, v. 68, n. 3-4, p. 283-287, 1993.

NISHITANI, H.; LYGEROU, Z. Control of DNA replication licensing in a cell cycle. **Genes to Cells**, v. 7, n. 6, p. 523-534, 2002.

NISHITANI, H.; LYGEROU, Z. DNA replication licensing. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, n., p. 2115-2132, 2004.

NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Oxazepam (CAS No. 604-75-1) in F344/N Rats (Feed Studies). **National Toxicology Program technical report series**, v. 468, n., p. 1-189, 1998.

NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Oxazepam (CAS No. 604-75-1) in Swiss-Webster and B6C3F1 Mice (Feed Studies). **National Toxicology Program technical report series**, v. 443, n., p. 1-321, 1993.

NUDMAMUD, S.; SIRIPURKPONG, P.; CHINDADUANGRATANA, C.; HARNYUTTANAKORN, P.; LOTRAKUL, P.; LAARBBOONSARP, W.; SRIKIATKHACHORN, A.; KOTCHABHAKDI, N.; CASALOTTI, S. O. Stress, anxiety and peripheral benzodiazepine receptor mRNA levels in human lymphocytes. **Life Sciences**, v. 67, n. 18, p. 2221-2231, 2000.

NUNEZ, R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 3, n. 3, p. 67-70, 2001.

O'BEIRNE, G. B.; WOODS, M. J.; WILLIAMS, D. C. Two subcellular locations for peripheral-type benzodiazepine acceptors in rat liver. **European Journal of Biochemistry**, v. 188, n. 1, p. 131-138, 1990.

OLSON, J. M.; CILIAX, B. J.; MANCINI, W. R.; YOUNG, A. B. Presence of peripheral-type benzodiazepine binding sites on human erythrocyte membranes. **European Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 1-2, p. 47-53, 1988.

OZCAN ARICAN, G.; OZALPAN, A. Evaluation of the effect of paclitaxel, epirubicin and tamoxifen by cell kinetics parameters in estrogen-receptor-positive ehrlich ascites tumor (eat) cells growing in vitro. **Acta Biologica Hungarica**, v. 58, n. 1, p. 49-59, 2007.

PALERMO-NETO, J.; DE OLIVEIRA MASSOCO, C.; ROBESPIERRE DE SOUZA, W. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 17, n. 1, p. 43-54, 2003.

PALERMO-NETO, J.; FONSECA, E. S.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; CORREIA, C. S.; SAKAI, M. Effects of individual housing on behavior and resistance to Ehrlich tumor growth in mice. **Physiology and Behavior**, v., n., p., 2008.

PAPADOPOULOS, V. Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. **Endocrine Reviews**, v. 14, n. 2, p. 222-240, 1993.

PAPADOPOULOS, V. Peripheral benzodiazepine receptor: structure and function in health and disease. **Annales Pharmaceutiques Francaises**, v. 61, n. 1, p. 30-50, 2003.

PAPADOPOULOS, V.; AMRI, H.; BOUJRAD, N.; CASCIO, C.; CULTY, M.; GARNIER, M.; HARDWICK, M.; LI, H.; VIDIC, B.; BROWN, A. S.; REVERSA, J. L.; BERNASSAU, J. M.; DRIEU, K. Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. **Steroids**, v. 62, n. 1, p. 21-28, 1997.

PAPADOPOULOS, V.; BARALDI, M.; GUILARTE, T. R.; KNUDSEN, T. B.; LACAPERE, J. J.; LINDEMANN, P.; NORENBERG, M. D.; NUTT, D.; WEIZMAN, A.; ZHANG, M. R.; GAVISH, M. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 8, p. 402-409, 2006a.

PAPADOPOULOS, V.; LECANU, L.; BROWN, R. C.; HAN, Z.; YAO, Z. X. Peripheral-type benzodiazepine receptor in neurosteroid biosynthesis, neuropathology and neurological disorders. **Neuroscience**, v. 138, n. 3, p. 749-756, 2006b.

PAPADOPOULOS, V.; MUKHIN, A. G.; COSTA, E.; KRUEGER, K. E. The peripheral-type benzodiazepine receptor is functionally linked to Leydig cell steroidogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 7, p. 3772-3779, 1990.

PARKINSON, A.; LEONARD, N.; DRAPER, A.; OGILVIE, B. W. On the mechanism of hepatocarcinogenesis of benzodiazepines: evidence that diazepam and oxazepam are CYP2B inducers in rats, and both CYP2B and CYP4A inducers in mice. **Drug Metabolism Reviews**, v. 38, n. 1-2, p. 235-259, 2006.

PARNET, P.; KELLEY, K. W.; BLUTHE, R. M.; DANTZER, R. Expression and regulation of interleukin-1 receptors in the brain. Role in cytokines-induced sickness behavior. **Journal of Neuroimmunology**, v. 125, n. 1-2, p. 5-14, 2002.

PAROLA, A. L.; STUMP, D. G.; PEPPERL, D. J.; KRUEGER, K. E.; REGAN, J. W.; LAIRD, H. E., 2ND. Cloning and expression of a pharmacologically unique bovine peripheral-type benzodiazepine receptor isoquinoline binding protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 21, p. 14082-14087, 1991.

PELICANO, H.; CARNEY, D.; HUANG, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 2, p. 97-110, 2004.

PORTELA CDE, P.; TIBERIO IDE, F.; LEICK-MALDONADO, E. A.; MARTINS, M. A.; PALERMO-NETO, J. Effects of diazepam and stress on lung inflammatory response in OVA-sensitized rats. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 282, n. 6, p. L1289-1295, 2002.

QUEIROZ JDE, S.; TORELLO, C. O.; PALERMO-NETO, J.; VALADARES, M. C.; QUEIROZ, M. L. Hematopoietic response of rats exposed to the impact of an acute psychophysiological stressor on responsiveness to an in vivo challenge with Listeria monocytogenes: modulation by Chlorella vulgaris prophylactic treatment. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 22, n. 7, p. 1056-1065, 2008.

RAMSEIER, H.; LICHTENSTEIGER, W.; SCHLUMPF, M. In vitro inhibition of cellular immune responses by benzodiazepines and PK 11195. Effects on mitogen- and alloantigen-driven lymphocyte proliferation and on IL-1, IL-2 synthesis and IL-2 receptor expression. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 15, n. 5, p. 557-582, 1993.

RIGHI, D. A.; PINHEIRO, S. R.; GUERRA, J. L.; PALERMO-NETO, J. Effects of diazepam on Mycobacterium bovis-induced infection in hamsters. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 9, p. 1145-1153, 1999.

ROCCA, P.; BELLONE, G.; BENNA, P.; BERGAMASCO, B.; RAVIZZA, L.; FERRERO, P. Peripheral-type benzodiazepine receptors and diazepam binding inhibitor-like immunoreactivity distribution in human peripheral blood mononuclear cells. **Immunopharmacology**, v. 25, n. 2, p. 163-178, 1993.

ROCHARD, P.; GALIEGUE, S.; TINEL, N.; PELERAUX, A.; BORD, A.; JBILO, O.; CASELLAS, P. Expression of the peripheral benzodiazepine receptor triggers thymocyte differentiation. **Gene Expression**, v. 12, n. 1, p. 13-27, 2004.

RODGERS, R. J.; LEE, C.; SHEPHERD, J. K. Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. **Psychopharmacology**, v. 106, n. 1, p. 102-110, 1992.

ROGGERO, E.; PEREZ, A. R.; BOTTASSO, O. A.; BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Neuroendocrine-immunology of experimental Chagas' disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1153, n., p. 264-271, 2009.

ROSENBERG, L.; PALMER, J. R.; ZAUBER, A. G.; WARSHAUER, M. E.; STROM, B. L.; HARLAP, S.; SHAPIRO, S. Relation of benzodiazepine use to the risk of selected cancers: breast, large bowel, malignant melanoma, lung, endometrium, ovary, non-Hodgkin's lymphoma, testis, Hodgkin's disease, thyroid, and liver. **American Journal of Epidemiology**, v. 141, n. 12, p. 1153-1160, 1995.

ROUINI, M. R.; ARDAKANI, Y. H.; MOGHADDAM, K. A.; SOLATANI, F. An improved HPLC method for rapid quantitation of diazepam and its major metabolites in human plasma. **Talanta**, v. 75, n. 3, p. 671-676, 2008.

RUIZ, I.; OFFERMANNS, J.; LANCTOT, K. L.; BUSTO, U. Comparative study on benzodiazepine use in Canada and Chile. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 2, p. 124-129, 1993.

SA-ROCHA, V. M.; SA-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Variations in behavior, innate immunity and host resistance to B16F10 melanoma growth in mice that present social stable hierarchical ranks. **Physiology and Behavior**, v. 88, n. 1-2, p. 108-115, 2006.

SAKAI, M.; FONSECA, E. S.; DAGLI, M. L.; PALERMO-NETO, J. Diazepam effects on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. **Life Sciences**, v. 78, n. 16, p. 1777-1783, 2006a.

SAKAI, M.; FONSECA, E. S.; OLORIS, S. C.; MATSUZAKI, P.; OTAKE, A. H.; LEITE, K. R.; MASSOCO, C. O.; DAGLI, M. L.; PALERMO-NETO, J. Effects of

peripheral-type benzodiazepine receptor ligands on Ehrlich tumor cell proliferation. **European Journal of Pharmacology**, v. 550, n. 1-3, p. 8-14, 2006b.

SALICRU, A. N.; SAMS, C. F.; MARSHALL, G. D. Cooperative effects of corticosteroids and catecholamines upon immune deviation of the type-1/type-2 cytokine balance in favor of type-2 expression in human peripheral blood mononuclear cells. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 21, n. 7, p. 913-920, 2007.

SANGER, N.; STROHMEIER, R.; KAUFMANN, M.; KUHL, H. Cell cycle-related expression and ligand binding of peripheral benzodiazepine receptor in human breast cancer cell lines. **European Journal of Cancer**, v. 36, n. 16, p. 2157-2163, 2000.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 1, p. 55-89, 2000.

SARNOWSKA, A.; BERESEWICZ, M.; ZABLOCKA, B.; DOMANSKA-JANIK, K. Diazepam neuroprotection in excitotoxic and oxidative stress involves a mitochondrial mechanism additional to the GABAAR and hypothermic effects. **Neurochemistry International**, v. 55, n. 1-3, p. 164-173, 2009.

SCHLUMPF, M.; LICHTENSTEIGER, W.; VAN LOVEREN, H. Impaired host resistance to Trichinella spiralis as a consequence of prenatal treatment of rats with diazepam. **Toxicology**, v. 94, n. 1-3, p. 223-230, 1994.

SCHLUMPF, M.; PARMAR, R.; RAMSEIER, H. R.; LICHTENSTEIGER, W. Prenatal benzodiazepine immunosuppression: possible involvement of peripheral benzodiazepine site. **Developmental Pharmacology and Therapeutics**, v. 15, n. 3-4, p. 178-185, 1990.

SCHLUMPF, M.; RAMSEIER, H.; LICHTENSTEIGER, W. Prenatal diazepam induced persisting depression of cellular immune responses. **Life Sciences**, v. 44, n. 7, p. 493-501, 1989.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. **Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 10, n. 2, p. 230-231, 1998.

SERRA, M.; PISU, M. G.; FLORIS, I.; FLORIS, S.; CANNAS, E.; MOSSA, A.; TRAPANI, G.; LATROFA, A.; PURDY, R. H.; BIGGIO, G. Social isolation increases the response of peripheral benzodiazepine receptors in the rat. **Neurochemistry International**, v. 45, n. 1, p. 141-148, 2004.

SHOUKRUN, R.; VEENMAN, L.; SHANDALOV, Y.; LESCHINER, S.; SPANIER, I.; KARRY, R.; KATZ, Y.; WEISINGER, G.; WEIZMAN, A.; GAVISH, M. The 18-kDa translocator protein, formerly known as the peripheral-type benzodiazepine receptor, confers proapoptotic and antineoplastic effects in a human colorectal cancer cell line. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 18, n. 11, p. 977-988, 2008.

SMITH, A. J.; SKETRIS, I.; COOKE, C.; GARDNER, D.; KISELY, S.; TETT, S. E. A comparison of benzodiazepine and related drug use in Nova Scotia and Australia. **Canadian Journal of Psychiatry**, v. 53, n. 8, p. 545-552, 2008.

SNYDER, S. H.; VERMA, A.; TRIFILETTI, R. R. The peripheral-type benzodiazepine receptor: a protein of mitochondrial outer membranes utilizing porphyrins as endogenous ligands. **FASEB Journal**, v. 1, n. 4, p. 282-288, 1987.

SPEIRS, V. The evolving role of oestrogen receptor beta in clinical breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 10, n. 5, p. 111, 2008.

SRIVASTAVA, M.; WALSH, D. Diazepam as an adjuvant analgesic to morphine for pain due to skeletal muscle spasm. **Supportive Care in Cancer**, v. 11, n. 1, p. 66-69, 2003.

STANKEVICIUS, D.; RODRIGUES-COSTA, E. C.; CAMILO FLORIO, J.; PALERMO-NETO, J. Neuroendocrine, behavioral and macrophage activity changes induced by picrotoxin effects in mice. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 2, p. 300-308, 2008.

STIEFEL, F.; BERNEY, A.; MAZZOCATO, C. Psychopharmacology in supportive care in cancer: a review for the clinician. I. Benzodiazepines. **Supportive Care in Cancer**, v. 7, n. 6, p. 379-385, 1999.

STOEBNER, P. E.; CARAYON, P.; PENARIER, G.; FRECHIN, N.; BARNEON, G.; CASELLAS, P.; CANO, J. P.; MEYNADIER, J.; MEUNIER, L. The expression of peripheral benzodiazepine receptors in human skin: the relationship with epidermal cell differentiation. **British Journal of Dermatology**, v. 140, n. 6, p. 1010-1016, 1999.

STORZ, P. Reactive oxygen species in tumor progression. **Frontiers in Bioscience**, v. 10, n., p. 1881-1896, 2005.

SUTTER, A. P.; MAASER, K.; GERST, B.; KRAHN, A.; ZEITZ, M.; SCHERUBL, H. Enhancement of peripheral benzodiazepine receptor ligand-induced apoptosis and cell cycle arrest of esophageal cancer cells by simultaneous inhibition of MAPK/ERK kinase. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, n. 9, p. 1701-1710, 2004.

SUTTER, A. P.; MAASER, K.; HOPFNER, M.; HUETHER, A.; SCHUPPAN, D.; SCHERUBL, H. Cell cycle arrest and apoptosis induction in hepatocellular carcinoma cells by HMG-CoA reductase inhibitors. Synergistic antiproliferative action with ligands of the peripheral benzodiazepine receptor. **Journal of Hepatology**, v. 43, n. 5, p. 808-816, 2005.

TAKETANI, S.; KOHNO, H.; FURUKAWA, T.; TOKUNAGA, R. Involvement of peripheral-type benzodiazepine receptors in the intracellular transport of heme and porphyrins. **J Biochem**, v. 117, n. 4, p. 875-880, 1995.

TAKETANI, S.; KOHNO, H.; OKUDA, M.; FURUKAWA, T.; TOKUNAGA, R. Induction of peripheral-type benzodiazepine receptors during differentiation of mouse erythroleukemia cells. A possible involvement of these receptors in heme biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 10, p. 7527-7531, 1994.

TOMIYOSHI, M. Y.; SAKAI, M.; BALEEIRO, R. B.; STANKEVICIUS, D.; MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J.; BARBUTO, J. A. Cohabitation with a B16F10 melanoma-bearer cage mate influences behavior and dendritic cell phenotype in mice. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 23, n. 4, p. 558-567, 2009.

TORRES, S. R.; FRODE, T. S.; NARDI, G. M.; VITA, N.; REEB, R.; FERRARA, P.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; FARGES, R. C. Anti-inflammatory effects of peripheral benzodiazepine receptor ligands in two mouse models of inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 408, n. 2, p. 199-211, 2000.

TORRES, S. R.; NARDI, G. M.; FERRARA, P.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; FARGES, R. C. Potential role of peripheral benzodiazepine receptors in inflammatory responses. **European Journal of Pharmacology**, v. 385, n. 2-3, p. R1-2, 1999.

TOYOKUNI, S.; OKAMOTO, K.; YODOI, J.; HIAI, H. Persistent oxidative stress in cancer. **FEBS Letters**, v. 358, n. 1, p. 1-3, 1995.

UGAZ, E. M.; PINHEIRO, S. R.; GUERRA, J. L.; PALERMO-NETO, J. Effects of prenatal diazepam treatment on Mycobacterium bovis-induced infection in hamsters. **Immunopharmacology**, v. 41, n. 3, p. 209-217, 1999.

VEENMAN, L.; LEVIN, E.; WEISINGER, G.; LESCHINER, S.; SPANIER, I.; SNYDER, S. H.; WEIZMAN, A.; GAVISH, M. Peripheral-type benzodiazepine receptor density and in vitro tumorigenicity of glioma cell lines. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 4, p. 689-698, 2004.

VEENMAN, L.; PAPADOPOULOS, V.; GAVISH, M. Channel-like functions of the 18-kDa translocator protein (TSPO): regulation of apoptosis and steroidogenesis as part of the host-defense response. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 23, p. 2385-2405, 2007.

VEGAS, O.; FANO, E.; BRAIN, P. F.; ALONSO, A.; AZPIROZ, A. Social stress, coping strategies and tumor development in male mice: behavioral, neuroendocrine and immunological implications. **Psychoneuroendocrinology**, v. 31, n. 1, p. 69-79, 2006.

VENTURINI, I.; ZENEROLI, M. L.; CORSI, L.; AVALLONE, R.; FARINA, F.; ALHO, H.; BARALDI, C.; FERRARESE, C.; PECORA, N.; FRIGO, M.; ARDIZZONE, G.; ARRIGO, A.; PELLICCI, R.; BARALDI, M. Up-regulation of peripheral benzodiazepine receptor system in hepatocellular carcinoma. **Life Sciences**, v. 63, n. 14, p. 1269-1280, 1998.

VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z. N.; VAN BOCKSTAELE, D. R. Cell cycle and apoptosis. **Cell Proliferation**, v. 36, n. 3, p. 165-175, 2003.

VLODAVSKY, E.; SOUSTIEL, J. F. Immunohistochemical expression of peripheral benzodiazepine receptors in human astrocytomas and its correlation with grade of malignancy, proliferation, apoptosis and survival. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 81, n. 1, p. 1-7, 2007.

WEISINGER, G.; KELLY-HERSHKOVITZ, E.; VEENMAN, L.; SPANIER, I.; LESCHINER, S.; GAVISH, M. Peripheral benzodiazepine receptor antisense knockout increases tumorigenicity of MA-10 Leydig cells in vivo and in vitro. **Biochemistry**, v. 43, n. 38, p. 12315-12321, 2004.

WEIZMAN, R.; GAVISH, M. Molecular cellular and behavioral aspects of peripheral-type benzodiazepine receptors. **Clinical Neuropharmacology**, v. 16, n. 5, p. 401-417, 1993.

WHO: WORLD HEALTH ORGANIZATION. Some pharmaceutical drugs. In: IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS WICH MET IN LYON, 1996, Lyon, 1996. (IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; 66).

WILMS, H.; CLAASEN, J.; ROHL, C.; SIEVERS, J.; DEUSCHL, G.; LUCIUS, R. Involvement of benzodiazepine receptors in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases: evidence from activated microglial cells in vitro. **Neurobiology of Disease**, v. 14, n. 3, p. 417-424, 2003.

WU, W.; YAMAURA, T.; MURAKAMI, K.; MURATA, J.; MATSUMOTO, K.; WATANABE, H.; SAIKI, I. Social isolation stress enhanced liver metastasis of murine colon 26-L5 carcinoma cells by suppressing immune responses in mice. **Life Sciences**, v. 66, n. 19, p. 1827-1838, 2000.

ZANDSTRA, S. M.; FURER, J. W.; VAN DE LISDONK, E. H.; VAN'T, H. M.; BOR, J. H.; VAN WEEL, C.; ZITMAN, F. G. Different study criteria affect the prevalence of benzodiazepine use. **Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology**, v. 37, n. 3, p. 139-144, 2002.

ZAVALA, F. Benzodiazepines, anxiety and immunity. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 75, n. 3, p. 199-216, 1997.

ZAVALA, F.; TAUPIN, V.; DESCAMPS-LATSCHA, B. In vivo treatment with benzodiazepines inhibits murine phagocyte oxidative metabolism and production of interleukin 1, tumor necrosis factor and interleukin-6. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 255, n. 2, p. 442-450, 1990.

ZHANG, K.; DEMEURE, O.; BELLIARD, A.; GOUJON, J. M.; FAVREAU, F.; DESURMONT, T.; MAUCO, G.; BARRIERE, M.; CARRETIER, M.; MILAN, D.; PAPADOPOULOS, V.; HAUET, T. Cloning, sequencing, and chromosomal localization of pig peripheral benzodiazepine receptor: three different forms produced by alternative splicing. **Mammalian Genome**, v. 17, n. 10, p. 1050-1062, 2006.