GEANE ANTIQUES LOURENÇO

**Efeitos do tratamento agudo e prolongado com haloperidol
e da retirada abrupta deste tratamento, sobre a atividade
de macrófagos peritoneais de ratos machos e fêmeas**

São Paulo
2004

GEANE ANTIQUES LOURENÇO

**Efeitos do tratamento agudo e prolongado com haloperidol
e da retirada abrupta deste tratamento, sobre a atividade
de macrófagos peritoneais de ratos machos e fêmeas**

Tese apresentada para obtenção do
título de Doutor, junto à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profa. Dra. Valquiria A. Coronado Dorce

Co-orientador:

Prof. Dr. João Palermo Neto

São Paulo
2004

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 1443 FMVZ	<p> Lourenço, Geane Antiques Efeitos do tratamento agudo e prolongado com haloperidol e da retirada abrupta deste tratamento, sobre a atividade de macrófagos peritoneais de ratos machos e fêmeas / Geane Antiques Lourenço. – São Paulo : G. A. Lourenço, 2004. 88 f. : il.</p> <p> Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2004.</p> <p> Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada. Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.</p> <p> Orientador: Profa. Dra. Valquiria A. Coronado Dorce. Co-orientador: Prof. Dr. João Palermo Neto.</p> <p> 1. Neuroimunomodulação. 2. Prolactina. 3. Corticosterona. 4. Dimorfismo sexual. 5. Haloperidol. 6. Macrófagos. I. Título.</p>
-----------------	--

ERRATA

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
8	1	5	São Paulo, 2004.	São Paulo, 2004 88 f.
9	1	5	São Paulo, 2004.	São Paulo, 2004 88 f.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos do tratamento agudo e prolongado com haloperidol e da retirada abrupta deste tratamento sobre a atividade de macrófagos peritoneais de ratos.", Protocolo nº 101/2002, 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 pela referida Comissão, em sessão de 05/06/2002.

(We certify that the Research "Effects of acute and long term treatment with haloperidol, on their withdrawal, on peritoneal macrophage activity in rats" protocol number 101/2002, 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 in 06/05/2002 meeting.

São Paulo, 05 de junho de 2002

Prof.ª Dr.ª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: LOURENÇO, Geane Antiques

Título: Efeitos do tratamento agudo e prolongado com haloperidol e da retirada abrupta deste tratamento sobre a atividade de macrófagos peritoneais de ratos machos e fêmeas

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico esta tese

Ao meu companheiro Edson Junior
pelo incentivo, por acreditar em mim
e principalmente pelo seu amor

À minha filha Isabela
pela imensa alegria que você
trouxe á minha vida

AGRADECIMENTOS

- ✓ À Prof^a. Dr^a. Valquiria Abrão Coronado Dorce pela orientação, pelo apoio em todos os momentos difíceis, pelo constante incentivo, pelo carinho, por todos os ensinamentos, por acreditar em mim, pelas brigas que comprou por minha causa, enfim, obrigada por tudo.
- ✓ Ao Prof. Dr. João Palermo Neto pela orientação deste trabalho, pela oportunidade de participar do Grupo de Neuroimunomodulação, pela paciência e pelo incentivo.
- ✓ À Prof^a. Dr^a. Ana Leonor Abrahão Nencioni pelo apoio e incentivo constantes, pela ajuda nos experimentos, pelo carinho e principalmente pela amizade sincera.
- ✓ Ao Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira e a Érika Gufe do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP pelo auxílio técnico nas dosagens hormonais.
- ✓ Ao Prof. Dr. Francisco A. Pino do Instituto de Economia Agrícola do Estado de São Paulo pelas sugestões relevantes na análise estatística.
- ✓ Ao Ricardinho, do Laboratório de Toxicologia e Farmacologia Aplicada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP pelo auxílio nas técnicas de atividade de macrófagos.
- ✓ À Cristina Massoco e a Eva pelos ensinamentos, pelo auxílio técnico e pela paciência com minhas limitações.
- ✓ À Vanessa Teixeira e a Rúbia pelo auxílio nos experimentos.
- ✓ Ao pessoal de apoio do Instituto Butantan, Zelma, Cleonice, Binha, Wanda, Joana, Wilson e Valério pelo verdadeiro apoio e carinho.
- ✓ Aos pesquisadores do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan pelo apoio e carinho.
- ✓ À Vanessa Teixeira e Karen pelos momentos de alegria, pela amizade e pelo incentivo.
- ✓ À Valquiria, Ana Leonor, Vanessa Teixeira, Karen e Rúbia pela ajuda com os tratamentos prolongados.
- ✓ À Valquiria e Ana Leonor pela ajuda pessoal, por estarem sempre por perto nos momentos mais difíceis da minha vida, e principalmente por me aceitarem de volta sem críticas ou ressentimento.
- ✓ À todos do Grupo de Neuroimunomodulação pelos momentos compartilhados.

- ✓ Aos amigos do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, Aline, Karin, Thalma, Ana Letícia, Cíntia, Andréa, Priscila, Juliana, Renata, Silvia, etc, obrigada pelo carinho e amizade.
- ✓ À Silvia Aparecida Sochiarelli pelas palavras de conforto, pela ajuda com a burocracia, e por estar sempre disposta a me ajudar.
- ✓ À Prof^a. Dr^a. Catarina Teixeira por permitir a realização de parte deste trabalho nas dependências do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan.
- ✓ Ao curso de pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da FMVZ_USP pela oportunidade de desenvolver este trabalho.
- ✓ À FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto.
- ✓ Ao CNPq pela bolsa concedida.

RESUMO

LOURENÇO, G.A. **Efeitos do tratamento agudo e prolongado com haloperidol e da retirada abrupta deste tratamento, sobre a atividade de macrófagos peritoneais de ratos machos e fêmeas.** [Effects of acute, long-term and abrupt withdrawal of long-term haloperidol treatment of the peritone macrophage activity in males and females rats] São Paulo, 2004 88 f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

Haloperidol é um antagonista de receptor D2 de dopamina freqüentemente utilizado na clínica para tratamento de pacientes esquizofrênicos. Haloperidol aumenta a liberação de prolactina pela glândula pituitária anterior, e a prolactina é um fator capaz de modular a atividade do sistema imune. Grupos de seis ratos machos e fêmeas receberam tratamento agudo de 2mg/kg de haloperidol (E1), tratamento prolongado com haloperidol (E2) (2mg/kg/dia por 21 dias); retirada abrupta do tratamento prolongado com haloperidol (E3), ou ainda tratamento agudo com 6mg/kg de haloperidol (E4). Os animais controle receberam tratamento similar com veículo de diluição (grupos C1, C2 e C3 respectivamente). Neste trabalho, o tratamento prolongado com haloperidol (E2) aumentou a atividade de macrófagos, aumentando o espraçamento, a fagocitose e a liberação de NO em ratos machos e fêmeas. O tratamento agudo com 2mg/kg de haloperidol (E1) não foi capaz de alterar a atividade de macrófagos, porém a dose de 6mg/kg (E4) aumentou o espraçamento e a fagocitose. Os tratamentos agudo (E1) e prolongado (E2) com haloperidol aumentaram os níveis plasmáticos de corticosterona e de prolactina tanto em machos quanto em fêmeas. Os macrófagos de ratos machos e fêmeas apresentam os mesmos padrões de alterações após os tratamentos com haloperidol, exceto para produção de H₂O₂ que foi maior apenas para as fêmeas dos grupos C3 e E3. Discutiu-se de que maneira o haloperidol induz ativação de macrófagos, se por uma forma indireta através do aumento nos níveis de prolactina, ou alternativamente, sendo esta ativação uma consequência da ação direta do haloperidol sobre os receptores de dopamina dos macrófagos.

Palavras chave: Haloperidol. Macrófagos. Neuroimunomodulação. Prolactina. Corticosterona. Dimorfismo Sexual.

ABSTRACT

LOURENÇO, G.A. **Effects of acute, long-term and abrupt withdrawal of long-term haloperidol treatment of the peritone macrophage activity in males and females rats** [Efeitos do tratamento agudo e prolongado com haloperidol e da retirada abrupta deste tratamento, sobre a atividade de macrófagos peritoneais de ratos machos e fêmeas] São Paulo, 2004 88 f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

Haloperidol is a receptor D2 antagonist frequently used in the treatment of schizophrenic patients. Haloperidol increased prolactin release from anterior pituitary gland, and prolactin modulates immune system activity. Groups of six male and female rats received acute 2mg/kg haloperidol treatment (E1), long-term (E2) haloperidol treatment (2mg/kg/day for 21 days); abrupt withdrawal of long-term (E3) haloperidol treatment, or acute 6mg/kg haloperidol treatment (E4). Control rats were treated similarly, but with vehicle (groups C1, C2 and C3 respectively). In this work long-term haloperidol treatment (E2) increased macrophage spreading, phagocytosis and NO release in male and female rats. Acute 2mg/kg haloperidol treatment (E1) didn't change macrophage activity, however, the 6mg/kg dose (E4) increased macrophage spreading and phagocytosis. Corticosterone and prolactin serum levels were increased after acute (E1) and long-term (E2) haloperidol treatments in male and female rats. Macrophage of male and female rats presented the same pattern of alterations after acute and long-term haloperidol treatments, except for production of H₂O₂ that was larger just for the females of the groups C3 and E3. Haloperidol-induced macrophage activation was discussed in the light of a possible indirect effect through prolactin increments in rats, or, alternatively, as a consequence of a direct action of macrophage dopamine receptor.

Key words: Haloperidol. Macrophages. Neuroimmunomodulation. Prolactin. Corticosterone. Sexual Dimorphism.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1. Sobre Neuroimunomodulação.....	14
2.2. Catecolaminas e Sistema Imune.....	16
2.3. Patologias que Envolvem Alterações Dopaminérgicas e SI.....	18
2.4. Haloperidol e Imunidade.....	19
2.5. Prolactina e Sistema Imune.....	20
2.6. Glicocorticóides e Sistema Imune.....	22
2.7. Interação Glicocorticóides/Prolactina e SI.....	23
2.8. Macrófagos.....	25
2.9. Hormônios Sexuais e Sistema Imune.....	28
3. OBJETIVOS.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Animais Experimentais.....	32
4.2 Drogas e Reagentes.....	32
4.3 Procedimento para Obtenção de Células da Cavidade Peritoneal.....	34
4.3.1 Ativação das células peritoneais pelo BCG.....	34
4.3.2 Coleta das células da cavidade peritoneal.....	34
4.3.3 Quantificação e teste de viabilidade das células peritoneais.....	35
4.4 Procedimento para Avaliação do Espriamento e da Fagocitose Realizada por Macrófagos Peritoneais.....	35
4.4.1 Avaliação do espraio de macrófagos estimulados com BCG.....	35

4.4.2 Avaliação da fagocitose realizada por macrófagos estimulados com BCG.....	36
4.5 Determinação da Liberação de Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂).....	37
4.6 Determinação da Produção de Óxido Nítrico (NO).....	37
4.7 Dosagens Hormonais.....	38
4.8 Tratamentos.....	38
4.8.1 Tratamento agudo.....	39
4.8.2 Tratamento prolongado.....	39
4.8.3 Suspensão abrupta do tratamento prolongado.....	39
4.8.4 Denominação dos grupos.....	40
4.9 Delineamento Experimental.....	41
4.9.1. EXPERIMENTO 1: Estudo dos Efeitos Decorrentes do Tratamento Agudo com Haloperidol (2,0mg/kg) em Ratos Machos e Fêmeas Sobre a Atividade de Macrófagos Peritoneais Ativados.....	41
4.9.2. EXPERIMENTO 2: Estudo dos Efeitos Decorrentes do Tratamento Prolongado com Haloperidol (2,0mg/kg) em Ratos Machos e Fêmeas Sobre a Atividade de Macrófagos Peritoneais Ativados.....	41
4.9.3. EXPERIMENTO 3: Estudo dos Efeitos Decorrentes da Retirada Abrupta (Abstinência) do Tratamento Prolongado com Haloperidol (2,0mg/kg) em Ratos Machos e Fêmeas Sobre a Atividade de Macrófagos Peritoneais Ativados.....	42
4.9.4. EXPERIMENTO 4: Estudo dos Efeitos Decorrentes do Tratamento Agudo com Haloperidol (6,0mg/kg) em Ratos Machos e Fêmeas Sobre a Atividade de Macrófagos Peritoneais Ativados.....	42
4.9.5. EXPERIMENTO 5: Estudo dos Efeitos Decorrentes do Tratamento Agudo com Haloperidol em Ratos Machos e Fêmeas Sobre os Níveis Plasmáticos de Corticosterona e de Prolactina.....	42
4.9.6. EXPERIMENTO 6: Estudo dos Efeitos Decorrentes do Tratamento Prolongado com Haloperidol em Ratos Machos e Fêmeas Sobre os Níveis Plasmáticos de Corticosterona e de Prolactina.....	43
4.9.7. EXPERIMENTO 7: Estudo dos Efeitos Decorrentes da Retirada Abrupta (Abstinência) do Tratamento Prolongado com Haloperidol em Ratos Machos e Fêmeas Sobre os Níveis Plasmáticos de Corticosterona e de Prolactina.....	43
4.10. Análise Estatística.....	44

5. RESULTADOS.....	45
5.1. Estudo dos Efeitos Decorrentes do Tratamento Agudo com Haloperidol (2,0mg/kg) em Ratos Machos e Fêmeas Sobre a Atividade de Macrófagos Peritoneais Ativados.....	45
5.2. Estudo dos Efeitos Decorrentes do Tratamento Prolongado com Haloperidol (2,0mg/kg/dia por 21 dias) em Ratos Machos e Fêmeas Sobre a Atividade de Macrófagos Peritoneais Ativados.....	46
5.3. Estudo dos Efeitos Decorrentes da Retirada Abrupta do Tratamento Prolongado (Abstinência) com Haloperidol (2,0mg/kg/dia por 21 dias) em Ratos Machos e Fêmeas Sobre a Atividade de Macrófagos Peritoneais Ativados.....	46
5.4. Estudo dos Efeitos Decorrentes do Tratamento Agudo com Haloperidol (6,0mg/kg) em Ratos Machos e Fêmeas Sobre a Atividade de Macrófagos Peritoneais Ativados.....	47
5.5. Estudo dos Efeitos Decorrentes do Tratamento Agudo com Haloperidol em Ratos Machos e Fêmeas Sobre os Níveis Plasmáticos de Corticosterona e Prolactina.....	48
5.6. Estudo dos Efeitos Decorrentes do Tratamento Prolongado com Haloperidol (2mg/kg/dia por 21 dias) em Ratos Machos e Fêmeas Sobre os Níveis Plasmáticos de Corticosterona e Prolactina.....	49
5.7. Estudo dos Efeitos Decorrentes da Retirada Abrupta do Tratamento Prolongado (Abstinência) com Haloperidol (2mg/kg/dia por 21 dias) em Ratos Machos e Fêmeas Sobre os Níveis Plasmáticos de Corticosterona e de Prolactina.....	49
 6. DISCUSSÃO.....	 61
7. CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

1. INTRODUÇÃO

Evidências consideráveis têm demonstrado que o sistema imune e neuroendócrino interagem através de moléculas efetoras e de receptores comuns (BLALOCK *et al.*, 1994; KRUGER, 1996). Produtos do sistema nervoso central e neuroendócrino, como neurotransmissores e hormônios, podem afetar muitos aspectos do sistema imune, incluindo-se aqui a atividade imune, a diferenciação e a proliferação de linfócitos, e o desenvolvimento e a manutenção dos tecidos linfóides. Similarmente, citocinas podem agir diretamente no sistema nervoso central (SNC) alterando a atividade neuroendócrina. De fato, essa interação é tão extensa que a disfunção em um destes sistemas acarretará paralelamente disfunção no outro. Observou-se que o bloqueio dos dopaminoceptores tipo D₂ interfere com a atividade de macrófagos, aumentando a fagocitose e a produção de óxido nítrico, (KLEEB *et al.*, 1999). A alta produção de prolactina, decorrente deste bloqueio, também interfere com o sistema imune, contribuindo para sua ativação (DEGIORGI, ALTAMORE, 1992). Hormônios sexuais e glicocorticóides podem modular também os efeitos deste bloqueio na atividade do sistema imune; neste sentido, é possível que existam diferenças entre machos e fêmeas, quanto à ativação do sistema imune.

Desta maneira, estudamos os efeitos decorrentes do tratamento agudo e prolongado com haloperidol, bem como da remoção abrupta deste neuroléptico após uso prolongado, sobre a atividade de macrófagos peritoneais de ratos macho e fêmea. Como este tratamento interfere com o sistema endócrino, foram mensurados os níveis plasmáticos de prolactina e corticosterona, visando melhor entendimento das manifestações neuroimunes promovidas pelo haloperidol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sobre Neuroimunomodulação

O sistema imune (SI) não tem apenas a função de determinar o que é próprio do indivíduo e o que é estranho a este, como também detecta e protege o organismo contra danos. Por esta visão, o SI não trabalha sozinho, mas recebe comunicações positivas e negativas de diversos tecidos conectados a ele (BOREL, HIESTAND, 1999). Estudos recentes apontam uma interação bem marcante entre SNC e SI, que é modulada por vários eventos de transdução de sinais que envolvem citocinas, neurotransmissores, neuroesteróides, neuropeptídeos, nucleotídeos cíclicos, cálcio e proteínas quinases (CHAMBERS, SCHAUENSTEIN, 1999). Estas moléculas medeiam a comunicação entre os três sistemas (nervoso, imune e endócrino), para manter a homeostase ou alterar uma resposta.

Neuroimunologia ou psiconeuroimunologia é uma área de pesquisa relativamente nova que visa definir as complexas e recíprocas comunicações e interações existentes entre os sistemas nervoso e imune. Tais constatações científicas, embora relativamente recentes, são de conhecimento antigo. De fato, há muito tempo tem sido observado que indivíduos portadores de desordens psiquiátricas e neurológicas têm resposta imune irregular trazendo, desta maneira, um suporte clínico para a noção da influência neural no sistema imune.

Estudos têm indicado que fatores controlados pelo SNC, como hormônios (STYPULA *et al.*, 1996; ELENKOV, CHROUSOS, 2002), neurotransmissores (BASU, DASGUPTA, 2000; BERGQUIST *et al.*, 1998), endorfinas (GILMAN *et al.*, 1982; MURBURG

et al., 1986; 1993), vias nervosas autonômicas (BASEDOVSKY *et al.*, 1979; 1986) e até medicamentos de ação central como os benzodiazepínicos (MASSOCO, PALERMONETO, 1999; RIGHI *et al.*, 1999; DOMINGUES-JR *et al.*, 2000) e os neurolépticos (FRUSSA-FILHO *et al.*, 1991; 1992; KLEEB *et al.*, 1999) modificam, através de papéis relevantes, porém pouco definidos, a rede imunoregulatória. Tanto linfócitos quanto células associadas (macrófagos, micróglia e células epiteliais) comunicam-se com componentes dos sistemas nervoso central e periférico, respondendo a substâncias como acetilcolina, neuropeptídeos, adrenalina, noradrenalina, serotonina, histamina e dopamina (JANKOVIÉ, 1989).

Produtos tipicamente pertencentes ao SI como timosinas, linfocinas e certas proteínas do sistema complemento, enviam informações do compartimento imune para o SNC (HADDAD *et al.*, 2002). Receptores tipo 1 de interleucina –1 (IL-1), estão presentes em diversas regiões cerebrais como hipocampo, plexo coróide, mesencéfalo e núcleos da rafe, e em menor quantidade no núcleo anterodorsal do tálamo, nas células de Purkinje, córtex cerebelar e eminência média, evidenciando a participação desta interleucina como um neurotransmissor/neuromodulador (CUNNINGHAM *et al.*, 1992; QUAN *et al.*, 1998). Várias outras interleucinas (IL) como IL-2 (HILLHOUSE, 1994), IL-3/IL-6 (WEBER *et al.*, 1997), IL-4/IL-5/IL-10 (VERHOEF *et al.*, 1999), IL-12 (FRANCHIMONT *et al.*, 2000) e IL-18 (BOROVIKOVA *et al.*, 2000), agem de maneira importante modulando diversos processos no SNC, incluindo modulação sobre síntese e liberação de hormônios e neurotransmissores.

Podemos notar que existe uma interação bidirecional na comunicação entre os sistemas nervoso, imune e endócrino, onde a disfunção de um leva ao comprometimento do outro, e mais ainda, para que cada um destes sistemas atue

de maneira homeostásica no indivíduo, é necessário à participação dos outros dois na modulação de suas funções.

2.2 Catecolaminas e SI

A dopamina pertence ao grupo de neurotransmissores denominados catecolaminas, constituindo cerca de 80% do conteúdo deste grupo no cérebro (VALLONE *et al.*, 2000). Dopaminoceptores pertencem à classe de receptores com 7 domínios transmembranais acoplados a proteína G. Cinco receptores distintos de dopamina foram isolados tendo sido caracterizados e subdivididos em duas famílias, receptores tipo D₁ e receptores tipo D₂, com base em aspectos bioquímicos e em suas propriedades farmacológicas. A subfamília D₁ compreende os receptores D₁ e D₅, e a subfamília D₂ inclui os receptores D₂, D₃ e D₄ (PALERMO-NETO, 1997).

Projeções oriundas de áreas cerebrais que sintetizam dopamina constituem quatro vias principais: nigroestriatal, mesolímbica, mesocortical e tuberoinfundibular (GLENTHØJ, 1995). Projeções que constituem a via nigroestriatal se iniciam em neurônios da substância negra compacta no mesencéfalo, que inervam o estriado dorsal (caudato-putamen). A via nigroestriatal está envolvida com o controle dos movimentos e com a neurodegeneração da doença de Parkinson, caracterizada por tremores, rigidez e acinesia (GERFEN, 1992). A via mesocortical origina-se na área tegmental ventral do mesencéfalo e inerva diferentes regiões do córtex frontal, o estriado ventral (núcleo accumbens), o tubérculo olfatório e partes do sistema límbico, e está implicada em influenciar o comportamento motivado (KOOB, BLOOM, 1988) e alguns aspectos do aprendizado e memória (GLENTHØJ, 1995).

Tuberoinfundibular é uma via com início em células dos núcleos paraventricular e arqueado do hipotálamo. Projeções desta via alcançam a eminência média no hipotálamo e libera dopamina no espaço perivascular do plexo capilar do sistema hipotálamo-porta-hipofisário. Após esta liberação, a dopamina é transportada para a pituitária anterior onde age sobre o lactotrófos inibindo a liberação de prolactina (VALLONE *et al.*, 2000).

De uma maneira geral, as catecolaminas agem como mediadoras de homeostase agindo sobre outros sistemas, além do sistema nervoso. Vários estudos indicam a função da adrenalina e noradrenalina sobre o SI, e mais recentemente surgiram informações sobre a função regulatória da dopamina, tanto periférica como central, sobre o SI (BASU, DASGUPTA, 2000). A importância funcional da dopamina sobre o SI é reforçada pela presença de receptores, de um sistema de transporte de dopamina (BASU *et al.*, 1993) e pela síntese de monoaminas em leucócitos (BERGQUIST *et al.*, 1994).

As catecolaminas estão presentes também no núcleo de células imunocompetentes, indicando interação com algum receptor intranuclear (por exemplo, receptor de esteróide), ou participação no processo de transcrição destas células (MARINO *et al.*, 1999; BERGQUIST *et al.*, 1998). Em relação à função das catecolaminas sobre células imunes, estas podem disparar o processo de apoptose e inibir a função imune de linfócitos (JOSEFSSON *et al.*, 1996; BERGQUIST *et al.*, 1998).

2.3 Patologias que Envolvem Alteração Dopaminérgica e SI

As duas patologias clássicas envolvendo os sistemas dopaminérgicos são doença de Parkinson e esquizofrenia. A degeneração dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais causa a doença de Parkinson, que resulta em hipoatividade dopaminérgica central (TEMLETT, 1996). É interessante notar que pacientes com doença de Parkinson apresentam significativa redução da resposta proliferativa de linfócitos a agentes mitógenos, apresentando ainda uma diminuição da produção de anticorpos. A produção de linfócitos-T CD₄₊, encontra-se diminuída no sangue destes pacientes, além de se observar atividade reduzida de células “natural killer” (NK) (FISZER *et al.*, 1991; BOKOR *et al.*, 1992).

Esquizofrenia é uma das mais comuns e talvez a mais desafiante desordem mental, para a qual não estão estabelecidas formas definitivas de tratamento. Ela se compõe de manifestações clínicas heterogêneas que envolvem: sintomas psicóticos positivos, como alucinações e confusão mental e sintomas psicóticos negativos, como perda de afeto, pobreza de fala, perda de direção e menos freqüentemente, sintomas de catatonia e outros distúrbios do movimento (BUSATTO, KERWIN, 1997). A “hipótese da dopamina” postula que os sintomas positivos da esquizofrenia estejam relacionados com o aumento dos níveis de atividade dopaminérgica no cérebro. Essa teoria é apoiada por evidências farmacológicas indiretas, que correlacionam a eficácia clínica de antagonistas dopaminérgicos, como o haloperidol, com a habilidade da anfetamina e de outros agonistas dopaminérgicos em induzirem psicoses (REYNOLDS, 1983). A “hipótese da dopamina” prediz um envolvimento crítico dos gânglios basais na neuroquímica da esquizofrenia, e estas estruturas possuem alta concentração de dopamina e de receptores D₂ (BUSATTO, KERWIN,

1997). A disfunção imune em pacientes esquizofrênicos é contraditória, alguns autores indicam uma estimulação imune em esquizofrênicos como aumento do número de linfócitos-T CD₄₊ (MULLER *et al.*, 1993), aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 (MAES *et al.*, 1995) e aumento sérico de IL-18 (TANAKA *et al.*, 2000). Contudo, em outros estudos evidencia-se uma diminuição da função imune com indicação de que indivíduos esquizofrênicos são imunossuprimidos (KEREPIC *et al.*, 1987), com deficiência de células-T mediando imunidade e deficiente produção de IL-2 e IL-6 (BASU, DASGUPTA, 2000). Essas divergências provavelmente ocorrem por influência do tratamento a que os pacientes são submetidos, com diferenças entre os neurolépticos utilizados no tratamento bem como da dosagem dos mesmos para cada paciente, tornando-se difícil à coleta de dados homogêneos em experimentos clínicos com esquizofrênicos.

2.4 Haloperidol e Imunidade

O haloperidol é um neuroléptico do grupo das butirofenomas antagonista das vias dopaminérgicas, antagonismo este que se dá por bloqueio de receptor D₂ (BALDESSARINI, 1991). Assim como o estudo em esquizofrênicos, a literatura sobre os efeitos do haloperidol sobre o SI é controversa, provavelmente pelo mesmo motivo de falta de dados homogêneos, principalmente nos experimentos clínicos. Estudos apontam que os neurolépticos típicos, dentre eles o haloperidol, são inibidores da função imune. LEYKIN *et al.* (1997) demonstram que *in vitro*, antipsicóticos típicos inibem a produção de IL-2, IL-4 e interferon- γ (INF- γ) por linfócitos ativados, além de promoverem decréscimo no nível plasmático de IL-6 e de

receptor solúvel de IL-6 (MAES *et al.*, 1997). Em contraste, estudos *in vivo* demonstram não haver supressão do SI após o uso de antipsicóticos típicos (MULLER *et al.*, 1991; SCHATNER *et al.*, 1996) ou ainda indicam aumento de imunidade. FRUSSA-FILHO e colaboradores (1991, 1992), utilizando tratamento prolongado com haloperidol em camundongos, obtiveram um menor número de células neoplásicas presentes no fluido ascítico, tendo caracterizado uma diminuição do desenvolvimento do tumor experimental de Ehrlich. Além disso, o tratamento com haloperidol aumentou a produção de NO e a porcentagem de espraio de macrófagos peritoneais em camundongos inoculados com a forma ascítica do tumor experimental de Ehrlich (KLEEB *et al.*, 1999). O bloqueio dopaminérgico exercido pelo haloperidol acarreta um aumento nos níveis de prolactina. A prolactina é um hormônio que está envolvido com aumento da resposta imunológica, podendo ser esta a justificativa para o aumento de imunidade desencadeado pelo haloperidol.

2.5 Prolactina e SI

Prolactina é um hormônio secretado pela hipófise anterior que elicia a lactação em mamíferos, porém este hormônio está presente em todos os vertebrados, inclusive nos não mamíferos como aves, répteis, peixes e anfíbios. Em ambos, mamíferos e não mamíferos a prolactina é um hormônio muito versátil, estando envolvida em diversas funções fisiológicas (COOKE, 1995). Essas distintas e diversas ações da prolactina podem ser agrupadas em sete categorias: 1) balanço de iônico e hídrico, 2) crescimento e morfogênese, 3) metabolismo, 4) comportamento, 5) imunoregulação, 6) efeitos sobre a pele e ectoderma e 7)

reprodução e lactação (COOKEE *et al.*, 2004). Destes efeitos a imunoregulação ganha destaque pela importância da prolactina para homeostase do SI. Em humanos a prolactina é produzida por timócitos, linfócitos e células mononucleares do sangue (COOKE, 1995). Nas células NK, que aparentemente não produzem prolactina, são necessários níveis fisiológicos de prolactina hipofisária para manter a função basal destas células (MATERA, 1996), mostrando a importância desse hormônio para a homeostase do SI.

O controle do hipotálamo sobre a secreção de prolactina ocorre principalmente pela ação de fatores inibidores da síntese de prolactina (PIF). Dentre estes fatores a dopamina é considerada o principal PIF (COOKEE *et al.*, 2004). O efeito da dopamina sobre a prolactina está vinculado ao receptor D₂ inibindo a liberação de prolactina por diminuir o aporte de cálcio aos lactotrófos, responsáveis pela secreção desse hormônio (KIDOKORO, 1975). A prolactina é secretada pela pituitária em condições fisiológicas e é aumentada no sangue por várias condições dentre elas a amamentação, o estresse físico e emocional e pela hipertermia (COOKEE *et al.*, 2004).

A ação da prolactina sobre o SI se faz através do aumento da imunidade, agindo sobre células imunocompetentes aumentando a atividade destas através da modulação da síntese de citocinas (DEGIORGI, ALTAMORE, 1992). Em ratos hipofisectomizados a administração de prolactina aumenta o peso do timo e do baço; reverte a anemia, leucopenia e trombocipenia; estimula a produção de IgG e IgM (YU-LEE, 2002). O aumento dos níveis de prolactina circulante está envolvido com o aumento de rejeição de órgãos transplantados, além de aumentar a atividade citotóxica das células NK e a ativação de macrófagos, aumentando nestes a produção de ânion superóxido (BOLE-FEYSOT *et al.*, 1998). A ação da prolactina

sobre macrófagos é de ativação produzida via proteína quinase C (PKC) com aumento da produção de óxido nítrico (NO) e IL-1 nessas células (KUMAR *et al.*, 1997). Ainda sobre macrófagos, a prolactina também aumenta a produção de RNA mensageiro (RNAm) para IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), indicando incremento da atividade imunológica (ZHU *et al.*, 1997).

2.6 Glicocorticóides e SI

Os glicocorticóides são membros da família dos hormônios esteróides, sendo que em humanos o cortisol é o produto mais secretado, já em camundongos, ratos e coelhos o principal glicocorticóide secretado é a corticosterona (COOKEE *et al.*, 2004). Análogos sintéticos dos glicocorticóides são utilizados terapeuticamente como antiinflamatórios, porém alguns fatores endógenos interferem com a produção destes hormônios aumentando sua síntese. Dentre estes fatores o estresse físico e emocional são os principais moduladores da produção de glicocorticóides (BONDY, 1985). O estresse pode ser definido como uma reação do organismo a um estímulo que afete o equilíbrio fisiológico, ocorrendo alterações comportamentais, endócrinas e imunológicas. A resposta imunológica promovida pelo estresse envolve ativação do sistema nervoso autônomo (SNA) e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), com conseqüente aumento de catecolaminas e glicocorticóides (BAUER *et al.*, 2000).

A resposta imune é regulada por células apresentadoras de antígenos (APCs), como monócitos, macrófagos, células dendríticas e outras células fagocíticas que são componentes da imunidade inata, e pelos linfócitos T “helper”

(Th) que são componentes da imunidade adquirida (GORDON, 1998). As células da subclasse Th1 secretam IFN- γ , IL-2 e TNF- β , promovendo imunidade celular. Já as células tipo Th2 secretam diferentes grupos de citocinas, principalmente IL-4, IL-10 e IL-13, que promovem a imunidade humoral (FEARON, LOCKSLEY, 1996). Os glicocorticóides promovem um desarranjo no balanço das respostas Th1 e Th2, diminuindo a resposta imune (ELENKOV, CHROUSOS, 1999).

Glicocorticóides agem suprimindo a produção de substâncias pró-inflamatórias, como TNF- α , IFN γ e IL-2 (BEUTLER *et al.*, 1986; ELENKOV, CHROUSOS, 2002). Evidências recentes indicam que os glicocorticóides atuam diretamente sobre seus receptores citoplasmáticos/nucleares em APCs, suprimindo a produção de IL-12 (indutor de resposta Th1), e aumentando a produção de IL-4, que é inibidora da ativação de macrófagos (ELENKOV, CHROUSOS, 2002).

2.8 Interação Glicocorticóides / Prolactina e SI

Além do estresse outros fatores interferem com a liberação de glicocorticóides, prolactina e catecolaminas, como níveis hormonais, diversas patologias (ROBBINS, 1974), vários tipos de drogas (GOEBEL *et al.*, 1992) e exercícios físicos (RINCÓN *et al.*, 2001). Vários estudos têm concluído que atletas são mais suscetíveis a infecções que indivíduos de vida sedentária (FITZERALD, 1988; RINCÓN *et al.*, 2001). Um dos fatores que contribuem para aumento da incidência de infecção em atletas é uma temporária supressão da função imune após exercício intenso, e esse efeito é mediado por hormônios do estresse, principalmente pelo aumento de glicocorticóides (HOFFMAN-GOETZ, PEDERSEN, 1994). Porém, nos meses de maior

treinamento, amostras de células sanguíneas fagocíticas apontam um aumento na capacidade de fagocitose destas células, com marcado aumento do conteúdo de prolactina (ORTEGA, 2003) e catecolaminas no mesmo período, sem contudo, haver alteração nos níveis de glicocorticóides (RINCÓN *et al.*, 2001).

Dentre as drogas capazes de alterar o conteúdo de prolactina e glicocorticóides, está o haloperidol. Como já foi descrito acima, o aumento de prolactina, após tratamento com haloperidol, se dá por bloqueio da inibição de liberação deste hormônio direto nos lactotrófos. A ação do haloperidol sobre a liberação de glicocorticóides é mais complexa. A administração direta de haloperidol em ratos *in vivo*, através de microdiálise das células glomerulosas da adrenal (GOEBEL *et al.*, 1992), ou em cultura destas células *in vitro* (AGUILERA *et al.*, 1984), não é capaz de alterar a síntese e/ou liberação de corticosterona. Porém, a administração sistêmica de haloperidol aumenta tanto o nível de prolactina quanto o de corticosterona circulante (IKEMOTO, GOEDRES, 1998; AHMED *et al.*, 1995). Como a administração de haloperidol não altera o conteúdo de ACTH (BARRET *et al.*, 1987), o estímulo para maior produção de corticosterona segue outra via. Em animais hipofisectomizados, onde se abole a ação da prolactina, a administração de haloperidol não altera os níveis de corticosterona, surgindo então a hipótese de que a prolactina é o fator estimulante da liberação de corticosterona, após o tratamento com haloperidol (GOEBEL *et al.*, 1992).

Apesar de haver liberação tanto de prolactina quanto de glicocorticóides durante o estresse, esses hormônios possuem ações antagônicas sobre o sistema imune. A prolactina estimula a liberação de citocinas proinflamatórias e inibe as citocinas antiinflamatórias aumentando a atividade das células imune (KUMAR *et al.*, 1997). Os glicocorticóides atuam de maneira inversa nesse balanço de substâncias

pro e antiinflamatórias, onde tem sua ação inclinada para a função antiinflamatória das células imunocompetentes, promovendo um decréscimo da atividade imune (ELENKOV, CHROUSOS, 2002).

2.9 Macrófagos

O macrófago é uma das principais células efectoras da imunidade celular, tendo como principal característica a capacidade de fagocitar partículas estranhas, como lipoproteínas plasmáticas ou, até mesmo, células como eritrócitos envelhecidos (WERB, 1983); atua também, na eliminação de microorganismos, de células tumorais, seqüestrando materiais não metabolizáveis e secretando citocinas (SHEVACH, 1984). Neste sentido, algumas das principais funções dos macrófagos ativados no foco inflamatório são: fagocitar e destruir restos celulares, liberar mediadores que agem sobre o próprio macrófago e/ou outras células proporcionando ativação dessas e, também, servir de célula apresentadora de antígenos para linfócitos T (RAPPOLEE, WERB, 1988).

Os macrófagos estão presentes em vários órgãos e tecidos normais, com forma e características diferentes, recebendo nomes distintos conforme o tecido em que são encontrados. O macrófago origina-se na medula óssea, sendo chamado de promonócito, que se diferencia na corrente sanguínea em monócito, célula que apresenta 10 a 15 μm de diâmetro e núcleo em forma de feijão, citoplasma granular, contendo lisossomos, vacúolos fagocitários e filamentos citoesqueléticos. O monócito uma vez na corrente sanguínea, migra para vários tecidos transformando-se em macrófago. Estudos mostraram que a meia-vida do monócito no sangue é de

aproximadamente um dia enquanto que a do macrófago nos tecidos pode atingir vários meses (ROBBINS, 1974).

Iniciadas as respostas específicas do processo inflamatório, mostrou-se que macrófagos ativados, ao entrar em contato com vidro ou substrato plástico emitem, rapidamente, prolongamentos citoplasmáticos que chegam a abranger uma área de até 8 vezes seu tamanho original. A esse fenômeno deu-se o nome de espraiamento (COHN, 1978).

Na transformação de monócitos para macrófagos e na resposta celular a diversos estímulos ocorre produção e liberação de várias substâncias, dentre elas espécies reativas de oxigênio (ERO), resultantes de uma seqüência de reações bioquímicas de alto consumo de oxigênio e conhecidas como “burst respiratório”. As mais conhecidas EROs são o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido, radical hidroxila e o oxigênio “singlet” (BADWEY, KARNOVSKY, 1980; PICK, MIZEL, 1981), as quais são produzidas *in vivo* durante o metabolismo de células aeróbicas e como produto de secreção de fagócitos ativados (ROOT *et al.*, 1975; BADWEY *et al.*, 1983).

Diferentes trabalhos indicam que estas espécies reativas de oxigênio têm participação nos processos de inflamação, morte celular e tecidual, transformação neoplásica, aterosclerose e envelhecimento (LEY, ARFORS, 1982; HAMMOND *et al.*, 1985); neste sentido, a mensuração dos níveis de liberação de peróxido de hidrogênio tem sido considerada como um parâmetro de avaliação da ativação de fagócitos (ROOT *et al.*, 1975; NATHAN, 1977). Em macrófagos não ativados, o sistema da oxidase encontra-se latente e disperso entre o citosol e a membrana celular, não ocorrendo produção das EROs. A produção se dá devido à ativação de uma oxidase

de membrana, a NAD (P)-oxidase, que catalisa a redução do oxigênio molecular na dependência da oxidação de piridina nucleotídeo (MC PHAIL *et al.*, 1985).

Uma outra forma de se avaliar a ativação de macrófagos é através da dosagem de óxido nítrico (NO) produzido pelos mesmos quando ativados. Este NO está envolvido com a destruição de células tumorais (YIM *et al.*, 1993), e parece contribuir com a baixa taxa de desenvolvimento do tumor de Ehrlich (KLEEB *et al.*, 1999). NO é um fator importante no processo inflamatório pois interfere com a expressão de moléculas de adesão, substâncias responsáveis pelo comportamento dos leucócitos (rolar e aderir ao endotélio e migrar) durante esse processo.

Estudos em animais e em seres humanos revelaram que a inoculação de BCG pode ativar vários tipos de células, como linfócitos T e B, macrófagos e células NK (O'DONNELL *et al.*, 1994). A vacina onco-BCG oral, uma suspensão de *Mycobacterium bovis* atenuado, é um dos agentes capazes de induzir à formação de granulomas em várias espécies (HAUDUROY, ROSSET, 1965). Segundo DANNERBERG JR. *et al.* (1972), os macrófagos são as principais células responsáveis pela destruição dos bacilos da tuberculose em mamíferos e, para isto, adentram a lesão em um estado relativamente inativo e ali passam por grande ativação, que se reflete pela sua capacidade de destruir os bacilos e digerir seus componentes, ou seja, os macrófagos altamente ativados são capazes de desenvolver uma imunidade celular não específica.

Tanto linfócitos quanto células associadas (macrófagos, micróglias e células epiteliais) comunicam-se com componentes dos sistemas nervoso central e periférico, respondendo a substâncias como acetilcolina, neuropeptídeos, adrenalina, noradrenalina, serotonina, histamina e dopamina (JANKOVIÉ, 1989). Além de neurotransmissores, os macrófagos são modulados também por uma série de

hormônios, como glicocorticóides (BAUER *et al.*, 2001; ELENKOV, CHROUSOS, 2002; HADDAD *et al.*, 2002), hormônios gonadais (MILLER, HUNT, 1996; CUTOLO *et al.*, 2002), prolactina (KUMAR *et al.*, 1997; CHOU *et al.*, 1998), hormônio do crescimento (GH) (ORTEGA, 2003) e hormônios tireoidianos (KRUGER, 1996). Fatores intrínsecos ao SI, como INF- γ , IL-4, IL-13 e IL-10, agem modulando os processos de diferenciação e ativação de macrófagos, (GORDON *et al.*, 1995), porém, uma gama de outros fatores pode influenciar a ativação de macrófagos em processos fisiopatológicos.

2.10 Hormônios Sexuais e SI

Existem vários indícios de dimorfismo sexual no SI. Machos são genética e fisiologicamente mais suscetíveis a infecções do que fêmeas (KLEIN, 2000). O nível de imunoglobulina M é mais alto em mulheres adultas, e a resposta da imunoglobulina G à vacina de hepatite B é três vezes maior em mulheres que em homens (STRUVE *et al.*, 1992). Contudo, os mesmos mecanismos que reduzem os riscos de infecções em mulheres também as deixam mais suscetíveis a várias doenças autoimunes. A proporção de incidência para lupus eritematoso, diabetes mellitus dependente de insulina e artrite reumatóide, é bem maior em mulheres que em homens (AHMED *et al.*, 1985).

Hormônios sexuais, basicamente androgênios em machos e estrogênios em fêmeas, possuem propriedades imunoregulatórias e são os responsáveis pela diferença imune entre os sexos. Estrogênios geralmente são estimuladores de resposta imune (em concentração fisiológica), enquanto androgênios são supressores naturais (KLEIN, 2000; CUTOLO *et al.*, 2002). Contudo, essas mesmas

substâncias podem produzir respostas antagônicas, ora estimulando, ora suprimindo a resposta imune, dependendo da dose e da condição experimental (MILLER, HUNT, 1996). Células T supressoras podem ser inibidas pela ação do estradiol (PAAVONEN *et al.*, 1981) ou estimuladas pela progesterona (HOLDSTOCK, 1982). A administração de dietilestilbestrol (DES), um similar sintético com ação estrogênica semelhante ao estradiol, é capaz de suprimir a resposta de hipersensibilidade do tipo tardia, determinada pelo BCG, em camundongos fêmeas (KATO *et al.*, 1988). O estradiol induz à redução da produção de leucócitos na medula óssea e de células polimorfonucleares no sangue periférico (JOSEFSSON *et al.*, 1992) além de redução da capacidade quimiotática de neutrófilos na resposta inflamatória aguda (ITO *et al.*, 1995). A administração *in vivo* de estrógeno ou prolactina aumenta em 50-80% a fagocitose de macrófagos peritoneais tanto em camundongos machos quanto em fêmeas (CHEN AND JOHNSON, 1993). Estrógenos estimulam macrófagos a produzirem TNF, IL-1 e IL-6, assim como as células B a produzirem imunoglobulinas, porém, em concentração farmacológica, inibem a produção de IL-4, IL-2 e INF- γ pelas células T (CUTOLO *et al.*, 2002).

Dos efeitos da progesterona sobre o sistema imune, podemos relacionar a estimulação de células T supressoras (HOLDSTOCK *et al.*, 1982), inibição da diferenciação de linfócitos T em células citotóxicas (MANNEL, *et al.*, 1990), impedimento da diferenciação de linfócitos em células T helper-2 (Th2), ou seja, em células capazes de secretar IFN- γ (PICCINI *et al.*, 1995).

A testosterona é capaz de induzir a redução da proliferação de células B do sangue periférico, em culturas estimuladas com mitógeno “pokeweed” (PWM) (STHOEGER *et al.*, 1988) e de timócitos em cultura com concanavalina A (OLSEN *et al.*, 1991). Em cultura de macrófagos sinoviais e monócitos humanos, os androgênios

aumentam a apoptose e inibem a produção de IL-1 e TNF por essas células (CUTOLO *et al.*, 2002).

Em contrapartida, macrófagos também podem influenciar a produção de hormônios sexuais. A exposição *in vitro* de célula granulosa ovariana humana ao TNF- α (um dos principais produtos da secreção de macrófagos), reduz a produção de estrógeno e progesterona (ADASHI *et al.*, 1989). TNF- α reduz também a produção de androgênios por células intersticiais da teca de ratos.(ANDREANI *et al.*, 1991). IL-1, produto da secreção de macrófagos, diminui a produção de progesterona e pode aumentar ou diminuir a produção de testosterona (MILLER, HUNT, 1996).

Com base nos dados clínicos e experimentais descritos na literatura sobre a ação do haloperidol na secreção de hormônios e na função de células imunocompetentes, tivemos o intuito de elucidar alguns parâmetros que regem essa ação do haloperidol no sistema imune. Levando-se em conta as diferenças sexuais, comparamos os resultados de machos e fêmeas, analisando a atividade de macrófagos, bem como a alteração dos níveis de corticosterona e prolactina, que o tratamento com haloperidol foi capaz de produzir.

3. OBJETIVOS

Gerais

Estudar o efeito do bloqueio dopaminérgico com diferentes tratamentos com haloperidol sobre a atividade imune e sobre níveis plasmáticos de prolactina e corticosterona de ratos machos e fêmeas.

Específicos

Estudar em ratos machos e fêmeas os efeitos dos tratamentos agudo e prolongado com haloperidol, e da retirada abrupta deste tratamento prolongado sobre:

A. Atividade de macrófagos peritoneais ativados com Onco-BCG oral, utilizando para tanto os parâmetros:

- 1-** Quantificação de espraiamento
- 2-** Quantificação de fagocitose
- 3-** Produção de peróxido de hidrogênio
- 4-** Produção de óxido nítrico

B. Dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona e prolactina

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar*, machos e fêmeas, de 10 a 12 semanas de idade. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan, e foram mantidos no Biotério do Laboratório de Farmacologia até o dia do experimento. Os animais tiveram comida e água “*ad libitum*”, e ficaram em salas com umidade (65 a 70%) e temperatura ambiente (22°C-26°C) controlada por meio de aparelhos apropriados de ventilação, exaustão e refrigeração, em um ciclo de 12 horas de claro e escuro, com luz ligada às 7 horas. Os animais foram usados de acordo com as normas e procedimentos relativos ao uso de animais da FMVZ da USP, as quais foram baseadas naquelas descritas pelo Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources – National Research Council, EUA.

4.2. Drogas e Reagentes

- Haloperidol (*Haldol®* de Jahnsen Farmaceutica).
- Veículo de diluição do Haloperidol (solução de ácido láctico 0,5%)
- Vacina Onco-BCG Oral (*Instituto Butantan de São Paulo*) – vacina de *Mycobacterium bovis* atenuado da cepa Moreaux, envasada na concentração de 40 mg de bacilo para 5 ml de veículo, e preparada conforme SOERENSEN *et al.*, (1985).
- Zymosan-A (*Sigma®*) – produto à base de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Éter Etílico (*Cinética química®*).
- Panótico (*Laborclin®*)
- Azul de Tripán (*Merck®*) a 0,1%

- Reagente de Griess (*Merck®*)
- H_2O_2 (*Merck®*)
- NaOH (*Sigma®*)
- NaO_2 (*Sigma®*)
- Miristato Acetato de Forbol (PMA) (*Sigma®*)

Soluções:

PBS – Salina Tamponada com Fosfato – solução estoque 10X concentrada:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	(<i>Sigma®</i>)	26,79 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	(<i>Sigma®</i>)	4,14 g
NaCl	(<i>Sigma®</i>)	82,0 g
H_2O ultra pura		1.000 ml

No momento do uso esta solução foi diluída 1:10 em H_2O ultra pura, mantendo-se o pH em torno de 7,2 a 7,4.

PBS Glicosado – Salina Tamponada com Fosfato e Glicose – solução estoque 10X concentrada:

Solução A

NaCl	(<i>Sigma®</i>)	80,0 g
KCl	(<i>Sigma®</i>)	2,0 g
KH_2PO_4	(<i>Sigma®</i>)	2,0 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	(<i>Sigma®</i>)	21,5 g
H_2O ultra pura		800 ml

Solução B

CaCl_2	(<i>Sigma®</i>)	1,3 g
H_2O ultra pura		100,0 ml

Solução C

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	(<i>Sigma®</i>)	2,1 g
H_2O ultra pura		100,0 ml

Solução de glicose (10%)

Glicose	(<i>Sigma®</i>)	10,0 g
H_2O ultra pura		100,0 ml

No momento do uso foram diluídos 8ml da solução A, 1ml da solução B, 1ml da solução C e 1ml da solução de glicose, completando-se o volume para 100ml com água destilada mantendo-se pH em torno de 7,2 a 7,4.

Solução de Glutaraldeído:

Glutaraldeído 25% (<i>Nuclear®</i>)	2,0 ml
PBS	98,0 ml

Solução de Phenol Red

Peroxidase	(<i>Sigma®</i>)	0,1 ml
Sol. de phenol 0,5%	(<i>Sigma®</i>)	0,2 ml
Sol. de glicose 10%	(<i>Sigma®</i>)	0,1 ml
Solução A		0,8 ml
Solução B		0,1 ml
Solução C		0,1 ml
H ₂ O ultra pura		8,6 ml

4.3. Procedimento Para Obtenção de Células da Cavidade Peritoneal

4.3.1 Ativação das Células Peritoneais Pelo BCG

O onco-BCG oral foi inoculado nos animais dos grupos controle (C1, C2, C3) e experimental (E1, E2, E3), intraperitonealmente (i.p.), na concentração de 2,0mg de bacilos/animal, 11 e 3 dias antes da coleta do lavado peritoneal e do sangue.

4.3.2 Coleta de Células da Cavidade Peritoneal

Os animais foram anestesiados por inalação com éter e colocados em decúbito dorsal e o sangue coletado por punção cardíaca; uma excisão foi feita na pele da região abdominal e esta foi tracionada para que o peritônio ficasse exposto. Uma seringa estéril com agulha 30X7mm foi usada para injetar 10ml de PBS na

cavidade abdominal e, após a realização de uma massagem, o lavado resultante foi aspirado e colocado em tubos de polipropileno que foram mantidos em gelo.

4.3.3. Quantificação e Teste de Viabilidade das Células Peritoneais

Do lavado peritoneal foram retirados 10 μ l da suspensão celular e adicionado 90 μ l de Azul de Tripán. Foi realizada a quantificação total das células em câmara de Neubauer, sendo que as células que adquiriram a coloração azul foram consideradas como inviáveis. O número de células presentes na suspensão foi ajustado para 2x10⁶ células por ml de solução, utilizando-se apenas as suspensões com viabilidade celular superior a 90%.

4.4. Procedimento para Avaliação por Espraimento e da Fagocitose Realizada por Macrófagos Peritoneais

4.4.1 Avaliação do espraimento de macrófagos estimulados com BCG.

Essa técnica foi executada conforme descrito por RABINOVITCH; DEStEFANO (1973a e 1973b) e adaptada por PASSETI (1993). Alíquotas de aproximadamente de 2x10⁶ células/ml foram colocadas em duplicatas sobre lamínulas de vidro 13x13mm, sendo acondicionadas em placas com 24 poços de 16mm de diâmetro e deixadas por 20min em temperatura ambiente. Decorrido esse tempo às lamínulas foram lavadas com PBS a 4°C sendo a seguir recobertas com 1ml de PBS glicosado. As placas foram fechadas e incubadas em estufa a 37°C por 1 hora. Novamente foram lavadas com PBS a 4°C sendo posteriormente fixadas com solução de glutaraldeído 0,5%. As células aderidas às lamínulas foram analisadas em microscópio óptico de contraste de fase. O resultado foi expresso pela porcentagem de células espraídas

que é definido pelo cálculo do índice de espraçamento representado pela seguinte fórmula:

$$\text{índice de espraçamento} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células espraçadas}}{200 \text{ células aderidas}} \times 100$$

Portanto o índice de espraçamento é igual à porcentagem de células que espraçam.

4.4.2 Avaliação da fagocitose realizada por macrófagos estimulados com BCG.

Essa técnica foi executada conforme descrito por RABINOVITCH; DE STEFANO (1973a e 1973b) e adaptada por PASSETI (1993). As células coletadas da cavidade peritoneal após aderirem à lamínula, como descrito no item 4.1, foram incubadas por 1 hora em estufa a 37°C na presença de 1mg de Zymozan-A por poço. Na etapa seguinte as lamínulas foram lavadas vigorosamente com PBS a 4°C por 30 segundos sendo posteriormente fixadas em solução de glutaraldeído 0,5%. As células foram analisadas em microscópio óptico de contraste de fase. Os resultados foram expressos pela porcentagem de células que fagocitaram uma ou mais partículas de Zymozan-A; o cálculo do índice de fagocitose foi dado pela seguinte fórmula:

$$\text{índice de fagocitose} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células que fagocitaram}}{200 \text{ células aderidas}} \times 100$$

Portanto, o índice de fagocitose é a porcentagem de células que fagocitaram.

4.5. Determinação da Liberação de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

Essa metodologia foi baseada em PICK; KEISARI (1980) e modificada por RUSSO *et al.* (1989). Foram utilizadas placas de 96 poços com fundo chato, compostas por 12 colunas de 8 linhas. Na primeira coluna foram adicionados 100 μ l da solução phenol red em cada poço (branco). Nas colunas 2 e 3 foram colocadas em quadruplicatas concentrações crescentes de H_2O_2 (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 nmoles H_2O_2 /100 μ l), para obtenção da curva padrão. Nas colunas restantes da mesma placa foram colocados 100 μ l de solução celular, sendo cada amostra disposta em quadruplicata. Dois poços serviram para testar liberação espontânea de H_2O_2 e os outros dois para liberação induzida, adicionando-se 10ng/ml de miristato-acetato de forbol (PMA) por poço.

As placas foram fechadas e incubadas em estufa a 37°C/1hora. Após este período a reação foi interrompida pela adição de 10 μ l de NaOH 1N. A concentração de H_2O_2 de cada amostra foi avaliada através de leitura da absorbância em leitor de ELISA-Dynatech Immunoassay System/MR 5000, com filtro branco de 540nm, contra o branco da solução phenol red.

Os resultados obtidos após a leitura foram expressos em densidade óptica (DO), sendo transformados em nmoles de H_2O_2 liberados por 2×10^6 células, mediante equação de regressão linear com base na curva padrão.

4.6. Determinação da Produção de Óxido Nítrico (NO)

A produção de NO foi determinada através da medida de nitritos no sobrenadante de cultura celular, seguindo metodologia descrita por DING *et al.*, 1988. A concentração de nitrito (NO_2^-) está diretamente relacionada com a produção de óxidos inorgânicos pelos macrófagos, como óxido nítrico e dióxido de nitrogênio, que

são formados por ação da superóxido dismutase. Em vista da dificuldade da medida direta do óxido nítrico, pode-se estimar sua liberação após a conversão de nitrato em nitrito, seguida da determinação de nitrito por reação com reagente de Griess. As amostras foram dispostas em placas com 96 poços e incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Decorrido esse tempo, as placas foram centrifugadas a 1200rpm por 10min. O sobrenadante (50µl/poço) foi transferido para outra placa. Foi adicionado 50µl de reagente de Griess por poço, e a absorbância foi determinada em leitor de ELISA-Dynatech Immunoassay System/MR 5000, com filtro branco de 540nm, contra branco constituído por meio de cultura (RPMI) e reagente de Griess, com base em uma curva padrão feita com concentrações de nitrato de sódio (5,0; 10,0; 30,0 e 60,0 mM de NO₂⁻). Os resultados foram expressos em µmol/NO₂⁻.

4.7. Dosagens Hormonais

Os mesmos animais submetidos ao procedimento de lavado peritoneal foram utilizados na coleta de sangue para quantificação dos níveis plasmáticos de corticosterona e de prolactina. A coleta de sangue foi feita por punção cardíaca, com seringas heparinizadas, após anestesia do animal com inalação de éter. O plasma, resultante da centrifugação do sangue, foi dividido em alíquotas, que foram estocadas a -80°C para dosagem posterior. O sangue foi coletado sempre entre 8:00 e 11:00 horas, para evitar-se a variação circadiana destes hormônios.

4.8. Tratamentos

Todos os tratamentos foram realizados em machos e fêmeas, sendo o n=6 por grupo. Cada grupo experimental foi acompanhado de um grupo controle, sendo os animais dos dois grupos tratados simultaneamente. A inoculação intraperitoneal

de onco-BCG oral (2,0mg de bacilo/animal) foi realizada em duas injeções, 11 e 3 dias antes do dia experimental (dia da coleta do lavado peritoneal e do sangue), tanto para o grupo controle quanto para o experimental. Além deste controle, no experimento de dosagem hormonal utilizou-se um grupo sem manipulação como referência para os níveis basais de corticosterona e prolactina em ratos.

4.8.1. Tratamento Agudo

Os animais foram tratados com uma única injeção subcutânea de haloperidol (2,0mg/kg) no dia experimental (grupo E1), ou injeção do veículo de diluição (grupo C1) uma hora antes da coleta dos materiais. Adicionalmente, dois grupos de animais (n=6), um de machos e outro de fêmeas foram tratados com 6,0mg/kg de haloperidol em uma única injeção (grupo E4).

4.8.2. Tratamento Prolongado

Os animais foram tratados com injeções diárias de haloperidol (2,0mg/kg) subcutâneas por 21 dias (grupo E2), ou injeções do veículo de diluição (grupo C2), sendo a ultima injeção administrada no dia do experimento, 1 hora antes da coleta do material.

4.8.3. Suspensão Abrupta do Tratamento Prolongado – Abstinência

Os animais foram tratados com injeções diárias de haloperidol (2,0mg/kg) subcutâneas por 21 dias (grupo E3), ou injeções do veículo de diluição (grupo C3), depois deste período houve a retirada do tratamento por 72 horas antes da coleta do material.

4.8.4. Denominação dos Grupos

C – Animais sem manipulação

C1 – Tratamento agudo - solução de ácido láctico+BCG

E1 – Tratamento agudo - haloperidol 2mg/kg+BCG

E4 – Tratamento agudo - haloperidol 6mg/kg+BCG

C2 – Tratamento prolongado 21 dias - solução de ácido láctico+BCG

E2 – Tratamento prolongado 21 dias - haloperidol 2mg/kg+BCG

C3– Abstinência de 72 horas do tratamento prolongado - solução de ácido láctico+BCG

E3 – Abstinência de 72 horas do tratamento prolongado - haloperidol 2mg/kg+BCG

Resumo dos tratamentos:

Tratamentos	SEM TRATAMENTO	AGUDO	PROLONGADO	ABSTINÊNCIA
SEM TRATAMENTO	C	—	—	—
acido láctico 0,5% + BCG	—	C1	C2	C3
haloperidol 2mg/kg + BCG	—	E1	E2	E3
haloperidol 6mg/kg + BCG	—	E4	—	—

4.9. Delineamento Experimental

4.9.1. EXPERIMENTO 1: Estudo dos Efeitos Decorrentes do Tratamento **Agudo** com Haloperidol (2,0mg/kg) em Ratos Machos e Fêmeas Sobre a Atividade de Macrófagos Peritoneais Ativados.

Doze machos e 12 fêmeas foram divididos aleatoriamente em 2 grupos (**C1 e E1**) com 6 animais cada, que receberam o tratamento descrito nos itens 4.8 e 4.8.1. As células provenientes do lavado peritoneal (item 4.3) foram processadas e utilizadas na avaliação da atividade de macrófagos, utilizando-se como parâmetros à porcentagem de espraimento e fagocitose (item 4.4) e a produção de peróxido de hidrogênio (item 4.5) e óxido nítrico (item 4.6).

4.9.2. EXPERIMENTO 2: Estudo dos Efeitos Decorrentes do Tratamento **Prolongado** com Haloperidol (2,0mg/kg) em Ratos Machos e Fêmeas Sobre a Atividade de Macrófagos Peritoneais Ativados.

Doze machos e 12 fêmeas foram divididos aleatoriamente em 2 grupos (**C2 e E2**) com 6 animais cada, e receberam o tratamento descrito nos itens 4.8 e 4.8.2. As células provenientes do lavado peritoneal (item 4.3) foram processadas e utilizadas na avaliação da atividade de macrófagos, utilizando-se como parâmetros à porcentagem de espraimento e fagocitose (item 4.4) e a produção de peróxido de hidrogênio (item 4.5) e óxido nítrico (item 4.6).

4.9.3. EXPERIMENTO 3: Estudo dos Efeitos Decorrentes da **Retirada Abrupta (Abstinência)** do Tratamento Prolongado com Haloperidol (2,0mg/kg) em Ratos Machos e Fêmeas Sobre a Atividade de Macrófagos Peritoneais Ativados.

Doze ratos machos e 12 fêmeas foram divididos aleatoriamente em 2 grupos (**C3 e E3**) com 6 animais cada, e receberam o tratamento descrito nos itens 4.8 e 4.8.1. As células provenientes do lavado peritoneal (item 4.3) foram processadas e utilizadas na avaliação da atividade de macrófagos, utilizando-se como parâmetros a porcentagem de espraçamento e fagocitose (item 4.4) e a produção de peróxido de hidrogênio (item 4.5) e óxido nítrico (item 4.6).

4.9.4. EXPERIMENTO 4: Estudo dos Efeitos Decorrentes do Tratamento **Agudo** com Haloperidol (**6,0mg/kg**) em Ratos Machos e Fêmeas Sobre a Atividade de Macrófagos Peritoneais Ativados.

Seis ratos machos e seis fêmeas receberam duas doses de BCG (2,0mg/animal), 11 e 3 dias antes do dia experimental, para ativação dos macrófagos peritoneais. Uma hora antes da coleta do lavado peritoneal, os animais receberam uma injeção de haloperidol na dose de 6mg/kg (**grupo E4**). As células provenientes do lavado peritoneal (item 4.3) foram processadas e utilizadas na avaliação da atividade de macrófagos, utilizando-se como parâmetros a porcentagem de espraçamento e fagocitose (item 4.4) e a produção de peróxido de hidrogênio (item 4.5) e óxido nítrico (item 4.6).

4.9.5. EXPERIMENTO 5: Estudo dos Efeitos Decorrentes do Tratamento **Agudo** com Haloperidol em Ratos Machos e Fêmeas Sobre os Níveis Plasmáticos de Corticosterona e de Prolactina.

Dezoito ratos machos e 18 fêmeas foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (**C, C1 e E1**) com 6 animais cada, que receberam o tratamento descrito nos itens 4.8 e 4.8.1. Após anestesia com éter o sangue foi coletado por punção cardíaca e processado para efetuar-se a dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona e de prolactina, conforme descrito no item 4.7. Os animais dos grupos C1 e E1 foram os mesmos utilizados no experimento 1.

4.9.6. EXPERIMENTO 6: Estudo dos Efeitos Decorrentes do Tratamento Prolongado com Haloperidol em Ratos Machos e Fêmeas Sobre os Níveis Plasmáticos de Corticosterona e de Prolactina.

Dezoito ratos machos e 18 fêmeas foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (**C, C2 e E2**) com 6 animais cada, que receberam o tratamento descrito nos itens 4.8 e 4.8.1. Após anestesia com éter o sangue foi coletado por punção cardíaca e processado para efetuar-se a dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona e de prolactina, conforme descrito no item 4.7. Os animais dos grupos C2 e E2 foram os mesmos utilizados no experimento 2.

4.9.7. EXPERIMENTO 7: Estudo dos Efeitos Decorrentes da Retirada Abrupta (Abstinência) do Tratamento Prolongado com Haloperidol em Ratos Machos e Fêmeas Sobre os Níveis Plasmáticos de Corticosterona e de Prolactina.

Dezoito ratos machos e 18 fêmeas foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (**C, C3 e E3**) com 6 animais cada, que receberam o tratamento descrito nos itens 4.8 e 4.8.1. Após anestesia com éter o sangue foi coletado por punção cardíaca e processado para efetuar-se a dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona e

de prolactina , conforme descrito no item 4.7. Os animais dos grupos C3 e E3 foram os mesmos utilizados no experimento 3.

4.10. Análise Estatística

Para avaliação da atividade geral de macrófagos (espraiamento, fagocitose, H_2O_2 e NO) e para as dosagens hormonais foram utilizadas a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas para análise das diferenças entre os tratamentos, e a análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) seguida do teste de Bonferroni, para analisar as possíveis diferenças entre machos e fêmeas. Em todos os casos, foi verificada previamente a existência de homocedasticidade entre os resultados através do teste de Bartlett (Johnson e Leone). A probabilidade de $p < 0.05$ foi considerada como indicativa de diferenças significantes.

5. RESULTADOS

5.1. Estudo dos Efeitos Decorrentes do Tratamento **Agudo** com Haloperidol (2,0mg/kg) em Ratos Machos e Fêmeas Sobre a Atividade de Macrófagos Peritoneais Ativados.

O tratamento agudo com haloperidol na dose de 2,0mg/kg (E1) (figs. 1 a 5) não foi capaz de alterar significativamente a atividade de macrófagos peritoneais quando comparado ao respectivo controle (C1), tanto em ratos machos quanto em fêmeas, em todos os parâmetros analisados: espraçamento (machos $F=8.3$, $df=5,30$; fêmeas $F=5.2$, $df=5,30$, $p<0.05\%$), fagocitose (machos $F=8.6$, $df=5,30$; fêmeas $F=5.2$, $df=5,30$, $p<0.05\%$), produção de NO (machos $F=5.7$, $df=5,28$; fêmeas $F=8.2$, $df=5,26$, $p<0.05\%$) e H_2O_2 espontânea (machos $F=3.4$, $df=5,29$; fêmeas $F=16.6$, $df=5,28$, $p<0.05\%$) e estimulada com PMA (machos $F=4.3$, $df=5,29$; fêmeas $F=18.6$, $df=5,28$, $p<0.05\%$). Contudo, este esquema de tratamento nos mostra uma tendência ao aumento de espraçamento (fig 1 A e B), fagocitose (fig 2 A e B) e produção de NO (fig 5 A e B), não havendo alteração alguma na produção de H_2O_2 tanto espontânea (fig 3 A e B) quanto estimulada com PMA (fig 4 A e B). Não houve diferença significativa entre machos e fêmeas após o tratamento agudo com haloperidol em nenhum dos parâmetros analisados para atividade de macrófagos, espraçamento ($F=0.02$, $df=1,20$, $p<0.05\%$), fagocitose ($F=0.01$, $df=1,20$, $p<0.05\%$), NO ($F=0.04$, $df=1,20$, $p<0.05\%$), H_2O_2 ($F=0.02$, $df=1,20$, $p<0.05\%$), com PMA ($F=0.04$, $df=1,20$, $p<0.05\%$).

5.2. Estudo dos Efeitos Decorrentes do Tratamento **Prolongado** com Haloperidol (2,0mg/kg/dia por 21 dias) em Ratos Machos e Fêmeas Sobre a Atividade de Macrófagos Peritoneais Ativados.

O tratamento prolongado com haloperidol (grupo E2) aumentou a porcentagem de espraimento (machos $F=8.3$, $df=5,30$; fêmeas $F=5.2$, $df=5,30$, $p<0.05\%$) (fig 1 A e B), de fagocitose (machos $F=8.6$, $df=5,30$; fêmeas $F=5.2$, $df=5,30$, $p<0.05\%$), (fig 2 A e B), e da produção de NO (machos $F=5.7$, $df=5,28$; fêmeas $F=8.2$, $df=5,26$, $p<0.05\%$), (fig 5 A e B), em macrófagos ativados tanto de animais machos quanto de fêmeas. Não houve alteração significativa na produção espontânea ($F=3.4$, $df=5,29$, $p<0.05\%$) e/ou estimulada com PMA ($F=4.3$, $df=5,29$, $p<0.05\%$) de H_2O_2 em machos (fig 3 B e 4 B) e em fêmeas (espontânea $F=16.6$, $df=5,28$; com PMA $F=18.6$, $df=5,28$, $p<0.05\%$) (fig 3 A e 4 A). Não houve diferença significativa entre machos e fêmeas após o tratamento prolongado com haloperidol em nenhum dos parâmetros analisados para atividade de macrófagos, espraimento ($F=0.07$, $df=1,20$, $p<0.05\%$), fagocitose ($F=0.04$, $df=1,20$, $p<0.05\%$), NO ($F=0.05$, $df=1,20$, $p<0.05\%$), H_2O_2 ($F=0.04$, $df=1,20$, $p<0.05\%$), com PMA ($F=0.08$, $df=1,20$, $p<0.05\%$).

5.3. Estudo dos Efeitos Decorrentes da **Retirada Abrupta do Tratamento Prolongado (Abstinência)** com Haloperidol (2,0mg/kg/dia por 21 dias) em Ratos Machos e Fêmeas Sobre a Atividade de Macrófagos Peritoneais Ativados.

Nos animais abstinentes (grupo E3), tanto em machos em quanto fêmeas, não houve alteração da porcentagem de espraimento (machos $F=8.3$, $df=5,30$; fêmeas $F=5.2$, $df=5,30$, $p<0.05\%$) (fig 1 A e B) e de fagocitose (machos $F=8.6$, $df=5,30$; fêmeas $F=5.2$, $df=5,30$, $p<0.05\%$) (fig 2 A e B), bem como da

produção de NO (machos $F=5.7$, $df=5,28$; fêmeas $F=8.2$, $df=5,26$, $p<0.05\%$) (fig 5 A e B), em comparação ao grupo controle C3, não havendo diferença significativa entre machos e fêmeas para estes 3 parâmetros espraimento ($F=1.2$, $df=1,20$), fagocitose ($F=1.7$, $df=1,20$, $p<0.05\%$), NO ($F=1.4$, $df=1,20$, $p<0.05\%$). Já a produção de H_2O_2 espontânea ($F=16.6$, $df=5,28$, $p<0.05\%$) e estimulada por PMA ($F=18.6$, $df=5,28$, $p<0.05\%$) aumentou nas fêmeas, tanto no grupo controle (C3) quanto no experimental (E3) (fig 3 B e 4 B) se comparado aos demais grupos (C1, E1, C2 e E2). O mesmo não acontece nos machos (espontânea $F=3.4$, $df=5,29$; com PMA $F=4.3$, $df=5,29$, $p<0.05\%$), onde este parâmetro permanece inalterado após abstinência (fig 3A e 4A). Para produção de H_2O_2 (fig 3 e 4), tanto espontânea quanto estimulada, houve diferença significativa entre machos e fêmeas pela análise de duas vias ANOVA, sendo que as fêmeas apresentaram maior produção de H_2O_2 no grupo controle C3 e no experimental E3 comparando com os grupos C3 e E3 de machos (espontânea $F=2.2$, $df=1,20$; PMA $F=0.4$, $df=1,20$, $p<0.05\%$).

5.4. Estudo dos Efeitos Decorrentes do Tratamento **Agudo** com Haloperidol (6,0mg/kg) em Ratos Machos e Fêmeas Sobre a Atividade de Macrófagos Peritoneais Ativados.

Nas fig 6 A e B observa-se um aumento significativo na porcentagem de fagocitose (machos $F=9.5$, $df=2,15$; fêmeas $F=5.3$, $df=2,15$, $p<0.05\%$) e espraimento (machos $F=6.7$, $df=2,15$; fêmeas $F=8.6$, $df=2,15$, $p<0.05\%$) dos macrófagos resultantes de animais tratados com 6mg/Kg haloperidol (grupo E4). A produção de H_2O_2 espontânea (machos $F=1.2$, $df=2,15$; fêmeas $F=1.1$, $df=2,15$,

$p < 0.05\%$), estimulada com PMA (machos $F=2.3$, $df=2,15$; fêmeas $F=1.5$, $df=2,15$, $p < 0.05\%$) e de NO (machos $F=2.2$, $df=2,15$; fêmeas $F=1.2$, $df=2,14$, $p < 0.05\%$) não foram alteradas pelo tratamento agudo com dose de 6mg/Kg de haloperidol, tanto em machos quanto em fêmeas (fig 7 A e B, fig 8). Não houve diferença significativa entre machos e fêmeas após o tratamento agudo com 6mg/kg de haloperidol em nenhum dos parâmetros analisados para atividade de macrófagos, espraçamento ($F=0.03$, $df=1,20$), fagocitose ($F=0.04$, $df=1,20$, $p < 0.05\%$), NO ($F=0.04$, $df=1,20$, $p < 0.05\%$), H_2O_2 ($F=0.02$, $df=1,20$, $p < 0.05\%$), com PMA ($F=0.03$, $df=1,20$, $p < 0.05\%$).

5.5. Estudo dos Efeitos Decorrentes do Tratamento **Agudo** com Haloperidol em Ratos Machos e Fêmeas Sobre os Níveis Plasmáticos de Corticosterona e Prolactina.

Tanto em machos quanto em fêmeas, os níveis plasmáticos de corticosterona (fig 9 A e B) (machos $F=19.2$, $df=6,33$; fêmeas $F=15.9$, $df=6,33$, $p < 0.05\%$) e prolactina (tabela 1) (machos $F=38.6$, $df=5,28$; fêmeas $F=30.9$, $df=5,28$, $p < 0.05\%$) aumentam de maneira significativa, após tratamento agudo com haloperidol 2mg/kg (E1), em comparação com os grupos C e C1. Não há diferenças significantes entre os resultados de machos e fêmeas quanto à dosagem de corticosterona ($F=0.2$, $df=1,20$, $p < 0.05\%$). Já para prolactina, os resultados de machos e fêmeas diferem. Observamos que as fêmeas possuem nível mais alto de prolactina plasmática que os machos para o grupo controle sem manipulação (C) e para o grupo E1 ($F=27.7$, $df=1,20$, $p < 0.05\%$).

5.6. Estudo dos Efeitos Decorrentes do Tratamento **Prolongado** com Haloperidol (2mg/kg/dia por 21 dias) em Ratos Machos e Fêmeas Sobre os Níveis Plasmáticos de Corticosterona e Prolactina.

Após tratamento prolongado com haloperidol 2mg/kg/dia/21dias (E2), os níveis plasmáticos de corticosterona (fig 9 A e B) (machos $F=19.2$, $df=6,33$; fêmeas $F=15.9$, $df=6,33$, $p<0.05\%$) e prolactina (tabela 1) (machos $F=38.6$, $df=5,28$; fêmeas $F=30.9$, $df=5,28$, $p<0.05\%$) aumentam de maneira significativa em machos e fêmeas em comparação com os grupos C e C2. Não há diferenças significantes entre os resultados de machos e fêmeas quanto à dosagem de corticosterona após o tratamento prolongado ($F=0.9$, $df=1,20$, $p<0.05\%$).

Para dosagem de prolactina, os valores obtidos para fêmeas foram maiores do que o limite de detecção do método, não sendo possível determinarmos uma média do nível de prolactina plasmática em fêmeas, após tratamento prolongado com haloperidol (grupo E2). Por esse motivo também, não foi possível uma comparação efetiva entre os resultados de machos e fêmeas para o grupo E2.

5.7. Estudo dos Efeitos Decorrentes da **Retirada Abrupta do Tratamento Prolongado (Abstinência)** com Haloperidol (2mg/kg/dia por 21 dias) em Ratos Machos e Fêmeas Sobre os Níveis Plasmáticos de Corticosterona e de Prolactina.

Após a retirada abrupta do tratamento prolongado com haloperidol 2mg/kg/dia/21dias (E3), não existem diferenças significantes para os níveis plasmáticos de corticosterona (fig 9 A e B) (machos $F=19.2$, $df=6,33$; fêmeas $F=15.9$, $df=6,33$, $p<0.05\%$) e prolactina (tabela 1) (machos $F=38.6$, $df=5,28$; fêmeas $F=30.9$, $df=5,28$, $p<0.05\%$) tanto em machos quanto em fêmeas, em comparação com os

grupos C e C3. Não há diferenças significantes entre os resultados de machos e fêmeas quanto à dosagem de corticosterona ($F=5.9$, $df= 1,20$, $p<0.05\%$) e de prolactina ($F=9.3$, $df= 1,20$, $p<0.05\%$) após a retirada do tratamento prolongado.

Figura 1: Porcentagem de macrófagos espraçados em um total de 200 células. Os grupos (n=6) receberam 2 injeções de onco-BCG 40mg i.p., 11 e 3 dias antes do lavado peritoneal. Os tratamentos com haloperidol (2mg/kg s.c.) foram: **E1** = uma injeção, **E2** = uma injeção por dia/21 dias, **E3** = idem ao tratamento E2 e suspensão deste por 72 horas. Os respectivos grupos controle (**C1**, **C2**, **C3**) receberam injeções do veículo de diluição (ácido láctico 0,5%) com mesmo esquema de tratamento. Em **A** machos e em **B** fêmeas.

Os resultados representam a média $\pm$ o erro padrão da média.

* $p < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controle.

ANOVA seguida de teste de Tukey Kramer

Figura 2: Porcentagem de macrófagos com presença de fagócitos em um total de 200 células. Os grupos (n=6) receberam 2 injeções de onco-BCG 40mg i.p., 11 e 3 dias antes do lavado peritoneal. Os tratamentos com haloperidol (2mg/kg s.c.) foram: **E1** = uma injeção, **E2** = uma injeção por dia/21 dias, **E3** = idem ao tratamento E2 e suspensão deste por 72 horas. Os respectivos grupos controle (**C1**, **C2**, **C3**) receberam injeções do veículo de diluição (ácido láctico 0,5%) com mesmo esquema de tratamento. Em **A** machos e em **B** fêmeas.

Os resultados representam a média $\pm$ o erro padrão da média.

* $p < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controle.

ANOVA seguida de teste de Tukey Kramer

Figura 3: Produção espontânea de H_2O_2 em μmol por macrófagos peritoneais ($2 \times 10^6 \text{ cel.}$). Os grupos ($n=6$) receberam 2 injeções de onco-BCG 40mg i.p., 11 e 3 dias antes do lavado peritoneal. Os tratamentos com haloperidol (2mg/kg s.c.) foram: **E1** = uma injeção, **E2** = uma injeção por dia/21 dias, **E3** = idem ao tratamento E2 e suspensão deste por 72 horas. Os respectivos grupos controle (**C1**, **C2**, **C3**) receberam injeções do veículo de diluição (ácido láctico 0,5%) com mesmo esquema de tratamento. Em **A** machos e em **B** fêmeas.

Os resultados representam a média $\pm$ o erro padrão da média.

* $p < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controle.

ANOVA seguida de teste de Tukey Kramer

Figura 4: Produção de H₂O₂ estimulada por PMA em μmol por macrófagos peritoneais (2x10⁶ cel.). Os grupos (n=6) receberam 2 injeções de onco-BCG 40mg i.p., 11 e 3 dias antes do lavado peritoneal. Os tratamentos com haloperidol (2mg/kg s.c.) foram: **E1** = uma injeção, **E2** = uma injeção por dia/21 dias, **E3** = idem ao tratamento E2 e suspensão deste por 72 horas. Os respectivos grupos controle (**C1**, **C2**, **C3**) receberam injeções do veículo de diluição (ácido láctico 0,5%) com mesmo esquema de tratamento. Em **A** machos e em **B** fêmeas.

Os resultados representam a média ± o erro padrão da média.

*p<0,05 em relação aos respectivos grupos controle.

ANOVA seguida de teste de Tukey Kramer

Figura 5: Produção de NO em μmol , estimada através da quantificação da produção de nitrito, por macrófagos peritoneais ($2 \times 10^6 \text{ cel.}$). Os grupos ($n=6$) receberam 2 injeções de onco-BCG 40mg i.p., 11 e 3 dias antes do lavado peritoneal. Os tratamentos com haloperidol (2mg/kg s.c.) foram: **E1** = uma injeção, **E2** = uma injeção por dia/21 dias, **E3** = idem ao tratamento E2 e suspensão deste por 72 horas. Os respectivos grupos controle (**C1**, **C2**, **C3**) receberam injeções do veículo de diluição (ácido láctico 0,5%) com mesmo esquema de tratamento. Em **A** machos e em **B** fêmeas.

Os resultados representam a média $\pm$ o erro padrão da média.

* $p < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controle.

ANOVA seguida de teste de Tukey Kramer

Figura 6: Porcentagem de macrófagos peritoneais, em um total de 200 células, com presença de fagócito (**A**) ou espalhados (**B**). Grupos de ratos machos e fêmeas (n=6) receberam 2 injeções de onco-BCG 40mg i.p., 11 e 3 dias antes da coleta do lavado peritoneal. Os tratamentos foram: **C1** = uma injeção s.c. do veículo de diluição (ácido láctico 0,5%), **E1** = uma injeção s.c. de 2mg/kg de haloperidol, **E4** = uma injeção s.c. de 6mg/kg de haloperidol. A coleta do lavado foi realizada uma hora após os tratamentos.

Os resultados representam a média $\pm$ o erro padrão da média.

*p<0,05 em relação ao grupo C1

ANOVA seguida de teste de Tukey Kramer

Figura 7: Produção em μmol de H_2O_2 espontânea (**A**) ou induzida por PMA (**B**) por macrófagos peritoneais (2×10^6 cel.). Grupos de ratos machos e fêmeas ($n=6$) receberam 2 injeções de onco-BCG 40mg i.p., 11 e 3 dias antes da coleta do lavado peritoneal. Os tratamentos foram: **C1** = uma injeção s.c. do veículo de diluição (ácido láctico 0,5%), **E1** = uma injeção s.c. de 2mg/kg de haloperidol, **E4** = uma injeção s.c. de 6mg/kg de haloperidol. A coleta do lavado foi realizada uma hora após os tratamentos.

Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão da média.

ANOVA seguida de teste de Tukey Kramer

Figura 8: Produção de NO em µmol, estimada através da quantificação da produção de nitrito, por macrófagos peritoneais (2×10^6 cel.). Grupos de ratos machos e fêmeas ($n=6$) receberam 2 injeções de onco-BCG 40mg i.p., 11 e 3 dias antes da coleta do lavado peritoneal. Os tratamentos foram: **C1** = uma injeção s.c. do veículo de diluição (ácido láctico 0,5%), **E1** = uma injeção s.c. de 2mg/kg de haloperidol, **E4** = uma injeção s.c. de 6mg/kg de haloperidol. A coleta do lavado foi realizada uma hora após os tratamentos.

Os resultados representam a média $\pm$ o erro padrão da média.

ANOVA seguida de teste de Tukey Kramer

Figura 9: Dosagem de corticosterona plasmática em ng/ml. Os grupos (n=6) receberam 2 injeções de onco-BCG 40mg i.p., 11 e 3 dias antes da coleta do sangue por punção cardíaca. Os tratamentos com haloperidol (2mg/kg s.c.) foram: **E1** = uma injeção, **E2** = uma injeção por dia/21 dias, **E3** = idem ou tratamento E2 e suspensão deste por 72 horas. Os respectivos grupos controle (**C1**, **C2**, **C3**) receberam injeções do veículo de diluição (ácido láctico 0,5%) com mesmo esquema de tratamento. No grupo controle **C** os animais não receberam qualquer tipo de tratamento ou manipulação. Em **A** machos e em **B** fêmeas.

Os resultados representam a média $\pm$ o erro padrão da média.

* $p < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controle.

° $p < 0,05$ em relação ao controle sem manipulação

ANOVA seguida de teste de Tukey Kramer.

Tabela 1: Nível plasmático de prolactina em ng/ml em ratos machos e fêmeas, após tratamento com 2mg/kg de haloperidol s.c. agudo (**E1**), prolongado (**E2**) (uma injeção/dia/21 dias) e retirada abrupta do tratamento prolongado por 72 horas (**E3**).

Grupos n=6	Prolactina ng/ml	
	machos	fêmeas
C	28,9±5,5	333,2±105,3°
C1	21,0±4,3	68,0±17,1
E1	500,4±73,2*	4.884,3±935,0*°
C2	28,6±4,8	19,8±4,9
E2	10.352,0±4.694,4*	>150.000.000,0
C3	17,6±2,7	21,5±4,9
E3	18,7±4,9	0,8±0,1

C controle sem manipulação

C1, C2 e C3 respectivos grupos controle que receberam injeções do veículo (ácido láctico 0,5%) em mesmo esquema de tratamento.

Os dados representam a média ± erro padrão da média

* p < 0.05 em comparação ao respectivo grupo controle e ao grupo controle sem manipulação. ANOVA seguida de teste de Tukey Kramer

° p < 0.05 em comparação ao grupo de machos de mesmo tratamento. ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni.

6. DISCUSSÃO

O sistema imune no homem, bem como em diversos animais, não possui autonomia em sua atividade funcional, sendo regulado em grande parte pelo sistema nervoso central e periférico. Essa regulação é realizada por vários neurotransmissores, neuropeptídios, hormônios e citocinas, que interagem com as células efectoras do sistema imune, e por meio desta interação, regulam tanto as respostas fisiológicas quanto respostas ao estresse ou a patologias, visando sempre a homeostase do organismo (WEIGENT, BLALOCK, 1987). Dos neurotransmissores com papel relevante na manutenção da homeostase do indivíduo, através da interação com os efetores do sistema imune, estão as catecolaminas (MARINO *et al*, 1999; BERGQUIST, 1998). A importância funcional da dopamina sobre as células do sistema imune é indiscutível, visto que células imunes, como leucócitos, linfócitos e macrófagos, apresentam receptores de dopamina, um sistema de transporte e síntese endógena deste neurotransmissor (BASU, 2000), além de este estar presente no núcleo de linfócitos (BERGQUIST, 1998). A investigação da funcionalidade da dopamina sobre o sistema imune ganha interesse por causa da associação deste neurotransmissor com patologias neurológicas como doença de Parkinson e esquizofrenia (TEMLETT, 1996). Em ambas patologias existe uma alteração da neurotransmissão dopaminérgica, com concomitante anomalia na função imune (MULLER *et al*, 1993). Neste sentido, antagonistas dopaminérgicos, como o haloperidol, são utilizados clinicamente com sucesso para o controle dos sintomas da esquizofrenia. Os dados na literatura sobre esquizofrenia, tratamento com neurolépticos e SI são contraditórios. Isso ocorre pelo fato dos dados clínicos serem obtidos de pacientes com diferentes graus de severidade desta doença, que

recebem tratamentos com diferentes doses de neurolépticos, além de não ser levado em conta o sexo do indivíduo.

Apesar de informações controversas na literatura sobre haloperidol e sistema imune, o que se pode afirmar é que este modula a função imune (LEYKIN *et al*, 1997; MAES *et al*, 1997; MULLER *et al*, 1991; SCHATNER *et al*, 1996). Contudo, estudos *in vivo* em camundongos apontam um aumento da atividade imune após tratamento prolongado com haloperidol (FRUSSA-FILHO *et al*, 1991, 1992; KLEEB, *et al*, 1997, 1999), já os estudos *in vitro* demonstram que o haloperidol é inibidor da atividade imune (LEYKIN *et al*, 1997; TSAO *et al*, 1998). Em vista ao contraste de informações da modulação do haloperidol sobre a função imune, decidimos investigar como essa modulação ocorre *in vivo*, em três diferentes esquemas de tratamento, agudo, prolongado e retirada abrupta do tratamento prolongado, utilizando ratos como sujeitos experimentais. Para esse estudo analisamos a atividade de macrófagos peritoneais estimulados com onco BCG-oral. A análise e quantificação da atividade de macrófagos proporcionam uma idéia da imunidade natural do animal no momento da coleta do material. Estudos em animais e em seres humanos revelaram que a inoculação de BCG pode ativar vários tipos de células, como linfócitos T e B, macrófagos e células NK (O'DONNEL *et al.*, 1994). Segundo DANNERBERG JR. *et al.* (1972), os macrófagos são as principais células responsáveis pela destruição dos bacilos da tuberculose em mamíferos, tornando-se para isso altamente ativados. Para complementar nosso objetivo, utilizamos animais machos e fêmeas para uma comparação entre os sexos, uma vez que mulheres são mais sensíveis ao tratamento com haloperidol que os homens, apresentando mais reações adversas, e necessitando de menores doses desse neuroléptico para a obtenção dos mesmos resultados (ZHANG-WONG *et al*, 1998). As diferenças genéticas específicas do sexo

para o conteúdo e atividade da enzima P450 no fígado, têm sido relatadas como responsáveis por essa variação de sensibilidade aos neurolépticos. Havendo com isso uma diferença sexual na razão de degradação do haloperidol (POLLOCK, 1994; 1997). Em adição, o uso de contraceptivos orais e a fase do ciclo estral em fêmeas, também modulam a funcionalidade da enzima P450, alterando o metabolismo do haloperidol (KIMMEL *et al*, 1992). Imunologicamente também existem diferenças entre homens e mulheres, sendo as mulheres mais resistentes a infecções (KLEIN, 2000), deixando claro a importância da comparação da atividade de macrófagos entre os sexos.

Neste estudo, o tratamento agudo com haloperidol, tanto em machos quanto em fêmeas, não foi capaz de alterar significativamente a atividade de macrófagos peritoneais, estimulados com onco-BCG, em todos os parâmetros analisados (figuras. 1 a 5), porém, observa-se uma tendência ao aumento de atividade nos macrófagos de animais experimentais (E1), se comparados com o grupo controle (C1). A administração prolongada de haloperidol (E2) alterou significativamente o espraimento (figura 1), a fagocitose (figura 2) e a produção de NO (figura 5) em macrófagos peritoneais, tanto em machos quanto em fêmeas. Apesar da dose ser a mesma utilizada no tratamento agudo (2mg/kg), a continuidade do tratamento por 21 dias foi capaz de modular a atividade dos macrófagos, aumentando-a. Em vista destes resultados, optamos por adicionar um grupo de animais tratados agudamente com 6mg/kg de haloperidol (E4), e obtivemos aumento significativo da porcentagem de espraimento (figura 6 B) e fagocitose (figura 6 A). Uma possível explicação para estes resultados seria a ação direta do haloperidol sobre os receptores dopaminérgicos em macrófagos. A dopamina age sobre as células imune estimulando a síntese de citocinas antiinflamatórias e inibindo a síntese de citocinas

proinflamatórias, modulando de maneira inibitória a atividade das células tipo Th1 (imunidade celular) e Th2 (imunidade humoral) (BERGQUIST *et al*, 1998; ELENKOV, CHROUSOS, 2002). Como nossos resultados indicam que o tratamento com haloperidol aumenta a atividade de macrófagos, isso pode estar acontecendo pelo bloqueio direto da ligação da dopamina com seus receptores presentes em macrófagos. Estudos referentes à ação de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre a fisiologia de macrófagos, apontam a presença de receptores tipo D₁ e D₂ nestas células (HASKÓ *et al*, 1996; GOMEZ *et al*, 1999), o que torna possível a ação direta do haloperidol. Porém, caso haja uma ação direta do haloperidol sobre os receptores de dopamina da membrana dos macrófagos, são necessárias quantidades maiores do que 2mg/kg para que o antagonismo dopaminérgico seja efetivo a ponto de alterar o comportamento destas células, visto que o grupo E1 não apresenta alteração da atividade de macrófagos. Sendo assim, o aumento da atividade de macrófagos promovido pelo tratamento prolongado com haloperidol, pode estar ocorrendo devido ao acúmulo de haloperidol ou de seus metabólicos no indivíduo, pois o tratamento agudo com 6mg/kg de haloperidol também aumenta a atividade de macrófagos. Para confirmação desse fato será necessária uma dosagem dos níveis plasmáticos de haloperidol e de seus metabólicos, em todos os grupos. Entretanto, nossa dúvida sobre esta hipótese reside no fato de dados da literatura apontarem um efeito supressor de antagonistas dopaminérgicos sobre macrófagos (HASKÓ *et al*, 1996; GOMEZ *et al*, 1999) e linfócitos (TSAO *et al*, 1997; 1998), utilizando técnicas *in vitro*, onde estes antagonistas dopaminérgicos agem diretamente sobre essas células. MADEJ *et al*, (1998) trabalhando com atividade citotóxica de macrófagos, *in vivo* mostram um aumento dessa atividade após uma única injeção e após 14 dias de tratamento com haloperidol, já *in vitro* essa alteração

não está presente. Os autores concluem que o efeito imunomodulatório dos neurolépticos depende principalmente da dosagem e das condições experimentais. Nos parece, contudo, que existe a necessidade de algum fator endógeno do indivíduo, para que o haloperidol exerça o papel de estimulador de macrófagos.

Das possíveis substâncias com potencial para exercerem o papel de fator deflagrador do aumento da atividade de macrófagos, após tratamento com haloperidol, estão a prolactina e a corticosterona. Como a dopamina é o fator inibidor da liberação de prolactina hipofisária, o bloqueio exercido pelo tratamento com haloperidol nos receptores D₂ de dopamina conseqüentemente aumenta a liberação de prolactina. Prolactina é um hormônio secretado pela hipófise anterior com várias funções, dentre elas a manutenção da imunocompetência em humanos. Este hormônio é produzido também em células imune como monócitos, macrófagos e linfócitos (COOK, 1995), e as que não o produzem, como as células NK, necessitam da prolactina hipofisária circulante para manter sua funcionalidade (MATERA, 1996), fato este que demonstra a importância deste hormônio para homeostase do SI. Macrófagos peritoneais de camundongos tratados com prolactina *in vitro*, apresentam aumento da produção de NO e interleucina 1 (IL-1), efeito este dependente de cálcio e de proteína quinase C (PKC) (KUMAR *et al*, 1997). O tratamento de camundongos com metoclopramida, um antagonista de dopamina, ou com prolactina, induz um aumento da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos, indicando aumento de atividade nestas células (ZHU *et al*, 1997). Vale lembrar que a síntese de prolactina nas células imunocompetentes é controlada por citocinas (COOK, 1995). Não há, portanto, ligação entre o possível bloqueio local dos receptores de dopamina, com a síntese de prolactina nos macrófagos. Em nossos resultados, o nível plasmático de prolactina (tabela 1) após

tratamento agudo (E1) com 2mg/kg de haloperidol aumenta de maneira significativa, mas, após tratamento prolongado (E2) este aumento é muito maior, chegando a ponto de não ser possível à obtenção de resultados para fêmeas, pois os valores ultrapassaram a detecção do método. Baseados nestes resultados podemos concluir que o aumento dos níveis de prolactina obtido no grupo E1 não atinge o limite necessário para um efeito sobre os macrófagos, e este nível efetivo só é conseguido após tratamento prolongado (E2), bem como após tratamento agudo com 6mg/kg (E4). Infelizmente não podemos no momento confirmar essa hipótese, pois não se efetuou dosagem hormonal nos animais do grupo E4. Parece óbvio, mas vale lembrar que os níveis de prolactina são maiores em fêmeas devido à função deste hormônio na lactação.

A corticosterona parece não influenciar na diferença dos resultados de atividade de macrófagos entre os grupos E1 e E2, pois esses grupos apresentam o mesmo padrão de aumento do nível plasmático desse hormônio. Segundo GOEBEL *et al* (1992), o aumento de corticosterona promovido pelo tratamento com haloperidol não ocorre por ação direta desse neuroléptico no córtex da adrenal, mas sim via prolactina. A infusão por diálise de haloperidol na adrenal de ratos não altera o conteúdo plasmático de prolactina e de corticosterona, porém o tratamento sistêmico com haloperidol aumenta o nível plasmático destes dois hormônios, sem interferir com a produção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), mostrando uma via alternativa para o aumento de liberação de corticosterona após tratamento com haloperidol (GOEBEL *et al*, 1992). A corticosterona, assim como as catecolaminas, age sobre o sistema imune interferindo com o balanço das respostas tipo Th1 e Th2, aumentando a produção de citocinas antiinflamatórias e diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, promovendo uma inibição (ELENKOV, CHROUSOS,

2002). Em trabalhos anteriores realizados em nosso Laboratório, foi reportado que existe uma relação inversa entre os níveis séricos de corticosterona e atividade de macrófagos (MASSOCO e PALERMO-NETO, 1999; PALERMO-NETO et al., 2003). Uma possível sugestão para o efeito do tratamento com haloperidol sobre a atividade de macrófagos seria de uma ação antagonista da prolactina sobrepondo o efeito da corticosterona sobre a função de macrófagos. Este fato foi relatado também por ZHU et al (1997), que sugerem que o efeito estimulatório da prolactina sobre o SI resulta de um antagonismo desta sobre os efeitos promovidos pelos glicocorticóides neste sistema.

No grupo de animais em que houve a retirada abrupta do tratamento prolongado com haloperidol (grupo E3), a alteração da atividade de macrófagos produzida pelo tratamento prolongado é revertida, fazendo com que a porcentagem de espraimento (figura. 1), fagocitose (figura 2) e a produção de NO (figura 5) retorne a níveis semelhantes ao controle (C3). O mesmo acontecendo com os níveis plasmáticos de prolactina (tabela 1) e corticosterona (figura 9), que aumentam após o tratamento prolongado (E2), mas retornam aos níveis basais após a abstinência de 72 horas (E3). Estudos mostram que alguns dos efeitos centrais do haloperidol persistem após vários dias sem o tratamento (BAZIAN *et al*, 2000). Em nosso estudo, com 72 horas de suspensão do tratamento não há mais efeito do haloperidol, pelo menos sobre a atividade de macrófagos e sobre os níveis plasmáticos de prolactina e corticosterona.

Na análise da atividade de macrófagos o espraimento, a fagocitose e a liberação de NO por essas células, são indicativos de sua atividade, porém um outro fator, de extrema importância para medida da atividade de macrófagos, é a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Espécies reativas de oxigênio produzidas e

liberadas durante a resposta celular a diferentes estímulos, são resultantes do “burst respiratório”, que nada mais é que uma seqüência de reações bioquímicas que envolvem alto consumo de oxigênio. Estas substâncias, dentre elas o NO e o H_2O_2 , são produzidos também como produtos de secreção de fagócitos ativados e são um indicativo da atividade de macrófagos. Apesar dos animais tratados prolongadamente com haloperidol apresentarem uma alta porcentagem de macrófagos fagocíticos, não ocorreu alteração significativa na produção espontânea de H_2O_2 por esses macrófagos (figura 3 e 4). Para destruição dos microorganismos invasores, os fagócitos produzem uma verdadeira bateria de óxidos reativos, que são gerados pela ação de quatro enzimas: 1) NADPH oxidase, que tem como produto final a produção de superóxido (O_2^-); 2) superóxido dismutase que catalisa a conversão de O_2^- em H_2O_2 e oxigênio, 3) óxido nítrico sintase que catalisa a produção de NO e 4) mieloperoxidase que catalisa a reação entre o H_2O_2 e um halogênio (principalmente Cl^-), tendo como produto principal o $HOCl^-$ (halogênio oxidado). Todas as reações não enzimáticas desencadeadas por fagócitos são realizadas por esses quatro produtos, O_2^- , H_2O_2 , NO e HOCl (BABIOR, 2000).

Várias substâncias estão envolvidas na modulação da ativação de macrófagos (interleucinas, interferons, fator de necrose tumoral, neurotransmissores, hormônios, etc) que, dependendo da situação, podem agir como indutoras ou supressoras dessa ativação (MILLER, HUNT, 1996). O balanço entre essas substâncias pode gerar maior ou menor produção de determinados produtos da ativação. Porém, como a produção de óxidos reativos por fagócitos depende do balanço entre as reações desencadeadas pelas quatro enzimas citadas acima, o tratamento com haloperidol pode estar interferindo com esse balanço, deslocando as reações no sentido da produção de NO. Para produção de NO, a NO sintase

depende de arginina, oxigênio e NADPH, sendo esse processo parcialmente independente dos outros três. Já a produção de H_2O_2 pela superóxido dismutase, depende da produção de superóxido pela NADPH oxidase. E ainda, o H_2O_2 é consumido na produção de HOCl pela mieloperoxidase. Como nossa intenção era apenas demonstrar se havia uma maior atividade de macrófagos após o tratamento com haloperidol, é difícil, apenas com esses experimentos determinarmos porque os macrófagos, apesar de estarem ativos, não aumentaram a liberação de H_2O_2 . Kleeb et al, 1999, demonstraram que o aumento da produção de NO por macrófagos de animais tratados com haloperidol ocorre via NO sintase induzível, e que a inibição desta enzima, abole o efeito de diminuição do crescimento tumoral desencadeado por esse tratamento. Estes resultados concordam com os nossos dados, uma vez que também obtivemos aumento de NO após tratamento prolongado com haloperidol. Porém, estudos que analisam a atividade de macrófagos sobre a destruição de células tumorais, confirmam a importância da produção de H_2O_2 para que essa função do macrófago ocorra (Fecchio et al, 1990). O nosso modelo experimental exclui o aumento de H_2O_2 dos efeitos do tratamento prolongado com haloperidol sobre a atividade de macrófagos, sendo este tratamento, portanto modulador do espriamento, da fagocitose e da produção de NO.

Quanto à produção de H_2O_2 pelo grupo E3, os macrófagos de machos e fêmeas se comportam de maneira diferente, mostrando haver modulação dos hormônios sexuais para produção de H_2O_2 nestas condições experimentais. As fêmeas abstinentes tanto do grupo controle (C3), quanto do grupo experimental (E3), apresentam aumento da produção de H_2O_2 , tanto espontânea (figura 3) quanto induzida por PMA (figura 4).

Via de regra, o haloperidol é uma droga utilizada por longos períodos de tratamento, e vários estudos indicam que a suspensão abrupta da droga é um forte agente estressor (KUHS, FOLKERTS, 1995). O estresse representa a reação do organismo a um estímulo que afete o equilíbrio fisiológico normal. A resposta fisiológica que decorre independe do tipo de estímulo estressor e inicia-se com diferentes áreas do SNC liberando noradrenalina e acetilcolina das terminações nervosas vegetativas e logo após, a medula adrenal libera adrenalina. Mais tardiamente é ativado o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) que aumenta os níveis de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e do ACTH estimulando conseqüentemente a liberação de glicocorticóides (HOMMO-DELARCHE *et al.*, 1991). Porém, devido ao tratamento com haloperidol por si só aumentar os níveis de corticosterona, a retirada do tratamento promove o retorno dos níveis basais desse hormônio. Então, o estresse em fêmeas abstinentes, pode ser descartado como modulador da liberação de H_2O_2 , uma vez que o principal fator indicativo de estresse apresenta nível plasmático fisiológico neste grupo.

Ainda sobre o aumento de H_2O_2 em fêmeas, podemos discutir a influência do ciclo estral, visto que o tratamento prolongado com haloperidol interrompe o ciclo das fêmeas em diestro (E2 e E3), porém, durante as 72 horas de abstinência as fêmeas do grupo E3 tornam a ciclar. Um fato curioso que ocorreu durante o tratamento prolongado foi que as fêmeas controle (C2 e C3), mesmo recebendo injeção contendo apenas o veículo de diluição (ácido láctico 0,5%), também apresentaram parada do ciclo em diestro. Sendo que as fêmeas do grupo C3 também voltam a ciclar nas 72 horas de abstinência. A sincronização de ciclo de fêmeas que vivem juntas em determinado ambiente é uma rotina no manejo de animais experimentais. A presença de machos na mesma sala ou apenas o cheiro

da urina deles faz com que todas as fêmeas de uma sala passem a ciclar de maneira regular de 4 em 4 dias. Luminosidade, estresse no manejo, quantidade de animais por caixa, são alguns dos fatores que também podem influenciar no ciclo estral das fêmeas. A hiperprolactinemia prolongada, provocada pelo tratamento com neurolépticos, reduz o comportamento sexual em humanos e roedores em ambos os sexos, causando inibição do ciclo estral em ratas e amenorréia em mulheres (SMITH, 1980). O nível elevado de prolactina plasmática inibi os pulsos de liberação de gonadotrofinas hiposísárias, induzindo anovulação em mulheres, que pode ser revertida com administração de agonistas de dopamina como bromocriptina (GUNNET, MOORE, 1988). A retomada do ciclo implica em síntese e liberação de hormônios sexuais que exibem ação moduladora sobre as células do sistema imune. A administração *in vivo* de estrógeno aumenta em 50-80% a fagocitose de macrófagos peritoneais tanto em camundongos machos quanto em fêmeas (CHEN AND JOHNSON, 1993). Em concentrações fisiológicas, estrogênios estimulam macrófagos a produzirem TNF, IL-1 e IL-6, assim como as células B a produzirem imunoglobulinas, porém, em concentração farmacológica, inibem a produção de IL-4, IL-2 e INF- γ pelas células T (CUTOLO *et al*, 2002). Não existem trabalhos na literatura descrevendo uma interação entre hormônios sexuais femininos e produção de H₂O₂ por macrófagos. O que podemos afirmar é que o tratamento com haloperidol não é o responsável pelo aumento de H₂O₂ nas fêmeas abstinentes, uma vez que as fêmeas controle apresentam o mesmo aumento que as experimentais. Tanto a prolactina quanto a corticosterona voltam aos níveis plasmáticos basais após o período de abstinência, indicando não haver modulação destes hormônios sobre este efeito. A dosagem dos hormônios sexuais destes animais será necessária para uma análise mais efetiva deste efeito.

Em conclusão, podemos afirmar que o tratamento com haloperidol altera a atividade de macrófagos, porém não podemos responder se há uma ação direta deste neuroléptico sobre os receptores dopaminérgicos dos macrófagos, ou se essa modulação ocorre pela ação da prolactina. Contudo, depois de tudo o que foi discutido acima, e com base na revisão de literatura, ficamos inclinados em acreditar na segunda hipótese, sendo a prolactina o fator modulador da atividade de macrófagos após o tratamento com haloperidol.

7. CONCLUSÕES

O tratamento com haloperidol é modulador da atividade de macrófagos peritoneais de ratos machos e fêmeas, sendo necessário uma dose aguda maior que 2mg/kg para que essa modulação ocorra.

Os hormônios sexuais não modulam a atividade de macrófagos peritoneais em ratos, uma vez que macrófagos peritoneais de ratos machos e fêmeas se comportam da mesma maneira antes e após o tratamento com haloperidol.

Baseados na revisão de literatura e em nossos resultados sugerimos que:

O aumento da atividade de macrófagos produzida pelo tratamento prolongado com haloperidol é devido à ação da prolactina sobre estas células, visto que este hormônio é imunoestimulador e o tratamento prolongado com haloperidol aumenta muito os níveis plasmáticos deste hormônio.

Os hormônios sexuais femininos modulam a produção de peróxido de hidrogênio em ratas após abstinência do tratamento prolongado com haloperidol e com o veículo.

A corticosterona parece não participar do aumento da atividade de macrófagos peritoneais de ratos, pois o nível plasmático deste hormônio é o mesmo no grupo que apresenta aumento de atividade de macrófagos (tratamento prolongado) quanto no grupo em que não há alteração na atividade destas células (agudo 2mg/kg).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADASHI, E.Y.; RESNICK, C.E.; CROFT, C.S.; PAYNE, D.W. Tumor necrosis factor alpha inhibits gonadotropin hormonal action in nontransformed ovarian granulosa cells. A modulatory noncytotoxic property. **Journal of Biological Chemistry**, v.264 (20), p. 11591-11597, 1989.

AGUILERA, G.; MENDELSON, F.A.O.; CATT, K.J. Dopaminergic regulation of aldosterone secretion, In: GANONG, W.F.; MARTINI, L. (Eds.) **Frontiers in Neuroendocrinology**, New York, Raven Press, 1984, p. 265-293.

AHMED S.P.; AHMAD, M. AHMED, S.I.; NAJAM, R.; KHURSHID, S.J. Effect some psychoactive drugs on stress induced alteration in plasma corticosterone level. **Journal of Parkinson Medical Association**, v. 45 (6), p. 153-155, 1995.

AHMED, S.A.; PENHALE, W.J.; TALAL, N. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. **American Journal of Pathology**, v. 121, p. 531-551, 1985.

ANDREANI, C.L.; PAYNE, D.W., PACKMAN, J.N.; RESNICK, C.E., HURWITZ, A.; ADASHI, E.Y. Cytokine-mediated regulation of ovarian function tumor necrosis factor alpha inhibits gonadotropin-supported ovarian androgen biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266 (11), p. 6761-6766, 1991.

BABIOR, B.M. Phagocytes and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, v.109, p. 33-44, 2000.

BADWEY, J.A.; KARNOVSKY, M.L. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. **Annual Reviews of Biochemistry**, v.49, p. 695-726, 1980.

BADWEY, J.A.; ROBINSON, J.M., KARNOVSKY, M.L. Comparative biochemical and cytochemical studies on superoxide and peroxide in mouse macrophages. **Journal of Cellular Physiology**, v. 115, p. 208-216, 1983.

BALDESSARINI, R.J. Drugs and the treatment of psychiatric disorders: Psychosis and Anxiety. In: MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W. (Eds), **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, New York, McGraw-Hill, 1995, p. 399-430.

BARRET, R.J.; WRIGHT, K.F.; TAYLOR D.R.; PROAKIS, A.G. Involvement of dopamine receptor subtypes in dopaminergic modulation of aldosterone secretion in rats. **Life Science**, v. 40, p. 1499-1506, 1987.

BASEDOVSKY, O.H.; DEL REY, A.; SORKIN, E. Antigenic competition between horse and sheep red blood cell is a hormone-dependent phenomenon. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 37, p. 106-113, 1979.

BASEDOVSKY, O.H.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; DINARELLO, C.A. Immunoregulatory feedback between interleukin-I and glucocorticoid hormones. **Science**, v. 233, p. 652-654, 1986.

BASU, S., DASGUPTA, P.S. Dopamine, a neurotransmitter, influences the immune system. **Journal of Neuroimmunology**, v. 102, p. 113-124, 2000.

BASU, S., DASGUPTA, P.S., LAHIRI, T., ROYCHOWDHURY, J. Uptake and biodistribution of dopamine in bone marrow, spleen and lymph nodes of normal and tumor bearing mice. **Life Science**, v. 53, p. 415-424, 1993.

BAUER, M.; VEDHARA, K.; PERKS, P.; WILCOCK, G.; LIGHTMAN, S.; SHANKS, N. Chronic stress in caregivers of dementia patients is associated with reduced lymphocyte sensitivity to glucocorticoids. **Journal of Neuroimmunology**, v. 103, p. 84-92, 2000.

BAUER, M.E.; PERKS, P.; LIGHTMAN, S.L.; SHANKS, N. Restraint stress is associated with changes in glucocorticoid immunoregulation. **Physiology & Behavior**, v. 73, p. 525-532, 2001.

BAZYAN, A.S.; GETSOVA, V.M.; ORLAVA, N.V. Haloperidol catalepsy consolidation in the rat as a model of neuromodulatory integration. **Neuroscience**, v. 99 (2), p. 279-278, 2000.

BERGQUIST, J.; TARKOWSKI, A.; EKMAN, R.; EWING, A. Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. **Proceeding of Natural Academic Science U.S.A.**, v. 91, p. 12912-12916, 1994.

BERGQUIST, J., TARKOWSKI, A., EWING, A., EKMAN, R. Catecholaminergic suppression of immunocompetent cells. **Immunology Today**, v. 19 (12), p. 562-567, 1998.

BEUTLER, B.; KROCHIN, N.; MILSARK, I.W. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. **Science**, v. 232, p. 977-980, 1986.

BLALOCK, J.E. The syntax of immune-neuroendocrine communication. **Immunology Today**, v. 15, p. 504-511, 1994.

BOKOR, M.; FARAGO, A.; SCHNABEL, R.; GARAM, T. Relationship between the immune system and disease of the central nervous system. **Therapia Hungarica** (English version), v. 40, p. 51-57, 1992.

BOLE-FEYSOT, C.; GOFFIN, V.; EDERY, M.; BINART, N.; KELLY, P.A. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. **Endocrinology Review**, v. 19, p. 225-268, 1998.

BONDY, P.K. Disorders of the adrenal cortex. In: WILSON, J.D.; FOSTER, D.W.; Williams, W.D. (Eds.) **Textbook of Endocrinology**. Philadelphia, Saunders Company, 1985, p.816-890.

BOREL, J.F., HIESTAND, P.C. Immunomodulation: particular perspectives. **Transplantation Proceedings**, v. 31, p. 1464-1471, 1999.

BOROVIKOVA, L.V.; IVANOVA, S. ZHANG, M.; YANG, H. BOTCHKINA, G.I.; WATKINS, L.R.; ABUMRAD, N.; EATON, J.W.; TRACEY K.J. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, p. 458-462, 2000.

BUSATTO, G.F.; KERWIN, R.W. Schizophrenia, psychosis, and the basal ganglia. In: MIGUEL, E.C.; RAUCH, S.L.; LECKMAN, J.F (Eds), **The Psychiatric Clinics of North America. Neuropsychiatry of the Basal Ganglia**, Philadelphia, Saunders, 1997, p. 897-910.

CHAMBERS, D.A., SCHAUENSTEIN, K. Mindful immunology: neuroimmunomodulation. **Immunology Today**, v. 21 (4), p. 168-170, 2000.

CHEN, Y.; JOHNSON, A.G. *In vivo* activation of macrophages by prolactin from young and aging mice. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 15, p. 39-45, 1993.

CHOU, J.C.; DOUYON, R.; CZOBOR, P.; VOLAVKA, J.; COOPER, T.B. Change in plasma prolactin and clinical response to haloperidol in schizophrenia and schizoaffective disorder. **Psychiatry Research**, v. 81 (1), p. 51-55, 1998.

COHN, Z.A. The structure and function of monocytes and macrophages. **Advanced Immunology, New York**, v. 9, p. 163-214, 1978.

COOKE, N.E. Prolactin: basic physiology. In: DEGROOT, L.J.(Ed), **Endocrinology**, Philadelphia, Saunders, 1995, p. 368-393.

COOKE, P.S.; HOLSBERGER, D.R.; WITORSCH, R.J.; SYLVERTER, P.W.; MEREDITH, J.M.; TREINEN, K.A.; CHAPIN, R.E. Thyroid hormone, glucocorticoids, and prolactin at the nexus of physiology, reproduction, and toxicology. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.194 ,p. 309-355, 2004.

CUNNINGHAM JR., E.T.; WADA, E.; CARTER, D.B., TRACEY D.E.; BATTEY, J.F.; De SOUZA, E.B. In situ histochemical localization of type 1 interleukin-1 receptor messenger RNA in the central nervous system, pituitary, and adrenal gland of mouse. **Journal of Neuroscience**, v. 12, p. 1101-1114, 1992.

CUTOLO, M. Macrophage as effectors of the immunoendocrinologic interactions in autoimmune rheumatic diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 876, p. 32-42, 1999.

CUTOLO, M. Effects of DMARDs on IL-1Ra levels in rheumatoid arthritis: is there any evidence? **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 5 (27), p. S26-31, 2002.

DANNENBERG, A.M.Jr.; ANDO, M.; SHIMA, K. Macrophage accumulation, division, maturation, digestive and microbicidal capacities in tuberculous lesions. 3. The turnover of macrophages and its relation to their activation and antimicrobial immunity in primary BCG lesions and those of reinfection. **Journal of Immunology** ,v. 109 (5), p. 1109-1121, 1972.

DeGIORGI, L.; ALTAMORE, D. Modification of the immune system following mental and physical stress. **Bulletin Institute Pasteur**, v. 90, p. 99-107, 1992.

DING, A.H.; NATHAN, C.F.; STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 141 (7), p. 2407-2412, 1988.

DOMINGUES-JUNIOR, M.; PINHEIRO, S.R.; GUERRA, J.L.; PALERMO-NETO, J. Effects of treatment with amphetamine and diazepam on Mycobacterium bovis-induced infection in hamsters. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 22 (3), p. 555-574, 2000.

DORCE, V.A.C. AND PALERMO-NETO, J. Behavioral and neurochemical changes induced by aging in dopaminergic systems of male and female rats. **Physiology and Behavior**, v. 56, p. 1015-1019, 1994.

ELENKOV, I.J.; CHROUSOS, G.P. Stress hormones, proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, and autoimmunity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 966, p. 290-303, 2002.

ELENKOV, I.J.; CHROUSOS, G.P. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/antiinflammatory cytokines and susceptibility to disease. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 10, p. 359-368, 1999.

FEARON, D.T.; LOCKSLEY, R.M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. **Science**, v. 272, p. 50-53, 1996.

FECCHIO D.; SIROIS, P.; RUSSO, M.; JANCAR, S. Studies on inflammatory response induced by Erlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, v. 14 (1), p. 125-132, 1990.

FISZER, U.; PIOTROWSKA, K.; KORLAK, K.; CZLONKOWSKA, A. The immunological status in Parkinson's disease. **Medical Laboratory Science**, v. 48, p. 196-200, 1991.

FITZGERALD, L. Exercise and the immune system. **Immunology Today**, v. 9, p. 337-339, 1988.

FRANCHIMONT, D. GALON, J. GADINA, M.; VISCONTI, R.; ZHOU, Y.; ARINGER, M.; FRUCHT, D.M.; CHROUSOS, G.P., O'SHEA, J.J. Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selective inhibits IL-12-induced Stat-4 phosphorilation in T lymphocytes. **Journal of Immunology**, v. 164, p. 1768-1774, 2000.

FRUSSA-FILHO, R.; MONTEIRO, M.C.; SOARES, C.G.C.; DÉCIO, R.C. Effects of haloperidol, bromocriptine and amphetamine on the development of Ehrlich ascites carcinoma in mice. **Pharmacology**, v. 45, p. 58-60, 1992.

FRUSSA-FILHO, R.; SOARES, C.G.C.; DÉCIO, R.C.; FRANCISCHETTI, I.; HABER, V.A; ONIMARU, A.T. Antitumor effects of dopaminergic blockers in mice bearing Ehrlich tumors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, p. 611-614, 1991.

GERFEN, C.R. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. **Trends Neuroscience**, v. 15 (4), p. 133-139, 1992.

GILMAN, S.C.; ROSENBERG, J.S.; FELDMAN, J.D. T lymphocytes of young and aged rats. II. Functional defects and the role of interleukin-2. **Journal of Immunology**, v. 128 (2), p. 644-650, 1982.

GLENTHØJ, B.Y. The brain dopaminergic system. Pharmacological, behavioural and electrophysiological studies. **Danish Medical Bulletin**, v. 42 (1), p. 1-21, 1995.

GOEBEL, S.; DIETRICH, M.; JARRY, H.; WUTTKE, W. Indirect evidence to suggest that prolactin mediates the adrenal action of haloperidol to stimulate aldosterone and corticosterone secretion in rats. **Endocrinology**, v. 130 (2), p. 914-919, 1992.

GOMEZ, F.; RUIZ, P.; BRICEÑO, F.; RIVERA, C.; LOPEZ, R. Macrophage Fc γ receptors expression is altered by treatment with dopaminergic drugs. **Clinical Immunology**, v. 90 (3), p. 375-387, 1999.

GORDON, S. The role of the macrophage in immune regulation. **Research Immunology**, v. 149, p. 685-688, 1998.

GUNNET, J.W.; MOORE, K.E. Neuroleptics and neuroendocrine function. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 28, p. 347-366, 1998.

HADDAD, J.J.; SAADÉ, N.E.; SAFIED-GARABEDIAN, B. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal resolving axis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 133, p. 1-19, 2002.

HAMMOND, B.; KONTOS, H.A.; HESS, M.L. Oxygen radicals in the adult respiratory distress syndrome, in myocardial ischemia and reperfusion injury, and in cerebral vascular damage. **Canadian Journal of Physiology Pharmacology**, v. 63, p. 173-187, 1985.

HASKÓ, G.; SZABÓ, C.; MERKEL, K.; BENCSIES, A.; ZINGARELLI, B.; KVETAN, V.; VIZI, E.S. Modulation of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α and nitric oxide production by dopamine receptor agonist and antagonists in mice. **Immunology Letters**, v. 49, p. 143-147, 1996.

HAUDUROY, P.; ROSSET, W. BCG and infections induced in laboratory animals. **Pathology and Microbiology (Basel.)**, v. 28 (6), p. 992-996, 1965.

HILLHOUSE, E.W. Interleukin-2 stimulates the secretion of arginine vasopressin but not corticotropin-releasing hormone from rat hypothalamic cells in vitro. **Brain Research**, v. 650, p. 323-325, 1994.

HOFFMAN-GOETZ, L.; PEDERSEN, B.K. Exercise and the immune system: a model of stress response? **Immunology Today**, v. 15, p. 382-387, 1994.

HOLDSTOCK, G.; CHASTENAY, B.F.; KRAWITT, E.L. Effects of testosterone, oestradiol and progesterone on immune regulation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 47, p. 449-456, 1982.

HOMMO-DELARCHE, F.; FITZPATRICK, F.; CHRISTEFF, N.; NUNEZ, E.A.; BACH, J.F.; DARDENNE, M. Sex steroids, glucocorticoids, stress and autoimmunity. **Journal Steroid Biochemistry Molecular Biology**, v. 40 (4-6), p. 619-637, 1991.

IKEMOTO, S.; GOLDERS, N.E. Microinjections of dopamine agonists and cocaine elevate plasma corticosterone: dissociation effects among the ventral and dorsal striatum and medial prefrontal cortex. **Brain Research**, v. 814 (1-2), p. 171-178, 1998.

ITO, I.; HAYASHI, T.; TAMADA, K.; KUZUYA, M.; NAITO, M.; IGUCHI, A. Physiological concentration of estradiol inhibits polymorphonuclear leucocyte chemotaxis via a receptor mediated system. **Life Science**, v. 56, p. 2247-2253, 1995.

JANKOVIĆ, D.B. Neuroimmunomodulation: facts and dilemmas. **Immunology Letters**, v. 21, p. 101-118, 1989.

JOSEFSSON, E.; TARKOWSKI, A.; CARLSTEN, H. Anti-inflammatory properties of estrogen. I. in vivo suppression of leukocyte production in bone marrow and

redistribution of peripheral blood neutrophils. **Cellular Immunology**, v. 142, p. 67-78, 1992.

JOSEFSSON, E.; BERGQUIST, J.; EKMAN, R.; TARKOWSKI, A. Catecholamines are synthesized by mouse lymphocytes and regulate function of the cells by induction of apoptosis. **Immunology**, v. 88, p. 140-146, 1996.

KATO, K.; CHEN, Y.; NAKANE, A.; MINAGAWA, T.; FUJIEDA, K.; KIMURA, T.; YAMAMOTO, K. Suppression of delayed-type hypersensitivity in mice pretreated with diethylstilbestrol: involvement of sex hormones in immunomodulation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 43, p. 530-538, 1988.

KEREPCIC, I.; BAMBURAC, J.; JURIN, M. Is dopamine related to immunologic changes in schizophrenic patients? **Annals of New York Academic Science**, v. 496, p. 737-739, 1987.

KIDOKORO, Y. Spontaneous calcium action potentials in a clonal pituitary cell line and their relationship to prolactin secretion. **Nature**, v. 258, p. 741-742, 1975.

KIMMEL, S.; GONSALVES, L.; YOUNGS, D.; GIDWANI, G. Fluctuating levels of antidepressants premenstrually. **Journal of Psychosomatic Obstetrics and Gynecology**, v. 13, p. 277-280, 1992.

KLEEB, S.R., XAVIER J.G., FRUSSA-FILHO, R., DAGLI, M.L.Z. Effect of haloperidol on the development of the solid Ehrlich tumor in mice. **Life Science**, v. 60, p. 69-74, 1997.

KLEEB, S.R.; RIZZO, M.S.; DAGLI, M.L.Z.; FRUSSA-FILHO, R. Haloperidol increases spreading and nitric oxide production in macrophages from tumor-bearing mice: a possible mechanism for its antitumoral effect. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 21, p. 575-580, 1999.

KLEIN, S.L. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, p. 627-638, 2000.

KOOB, G.F.; BLOOM, F.E. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. **Science**, v. 242 (4879), p. 715-723, 1988.

KOWALSKI, J.; BLADA, P.; KUCIA, K.; MADEJ, A.; HERMAN, Z.S. Neuroleptics normalize increased released of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha from monocytes in schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 50 (3), p. 169-175, 2001.

KRUGER, T.E. Immunomodulation of peripheral lymphocytes by hormones of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. **Advances in Neuroimmunology**, v. 6, p. 387-395, 1996.

KUHS, H.; FOLKERTS, H. Suspension therapy in acute schizophrenia. Clinical and neuroendocrine/biochemical effects of abrupt discontinuation of neuroleptic medication. **Neuropsychobiology**, v. 31 (3), p. 135-145, 1995.

KUMAR, A., SINGH, S.M., SODHI, A. Effect prolactin on nitric oxide and interleukin-1 production of murine peritoneal macrophages: role of Ca²⁺ and protein kinase C. **International Journal Immunopharmacology**, v. 19 (3), p. 129-133, 1997.

LEY, K.; ARFORS, K.E. Changes in macromolecular permeability by intravascular generation of oxygen-derived free radicals. **Microvascular Research**, v. 24, p. 25-33, 1982.

LEYKIN, I., MAYER, R., SHNITZKY, M. Short and long-term immunosuppressive effects of clozapine and haloperidol. **Immunopharmacology**, v. 37, p. 75-86, 1997.

LIU, Y., WOLFE-JR., S.A. Haloperidol and spiperone potentiate murine splenic B cell proliferation. **Immunopharmacology**, v. 34, p. 147-159, 1996.

MADEJ, A.; BELOWSKI, D.; KOWALSKI, J.; HERMAN, Z.N. Influence of neuroleptics on cytotoxic activity of macrophages in rats. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, v. 137 (5), p. 135-139, 1998.

MAES, M.; DELANGHE, J.; RANJAN, R.; MELTZER, H.Y.; DESNYDER, R.; COOREMAN, W.; SCHARPE, S. The acute phase protein response in schizophrenia, mania and major depression: effects of psychotropic drugs. **Psychiatry Research**, v. 66, p. 1-11, 1997.

MAES, M. BOSMANS, E.; CALABRESE, J.; SMITH, R.; MELTZER, H.Y. Interleukin-2 and interleukin-6 in schizophrenia and mania: effects of neuroleptics and mood stabilizers. **Journal of Psychiatry Research**, v. 29, p. 141-152, 1995.

MANNEL, D.N.; FALK, W.; YRAN, I. Inhibition of murine cytotoxic T cell responses by progesterone. **Immunology Letters**, v. 26, p. 89-94, 1990.

MARINO, F.; CONSENTINO, M.; BOMBELLI, R.; FERRARI, M.; LECCHINI, S.; FRIGO, G. Endogenous catecholamine synthesis, metabolism, storage, and uptake in human peripheral blood mononuclear cells. **Experimental Hematology**, v. 27, p. 489-495, 1999.

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

MATERA, L. Endocrine, paracrine and autocrine actions of prolactin on immune cells. **Life Sciences**, v. 59 (8), p. 599-614, 1996.

McPHAIL, L.C.; SHIRLEY, P.S.; CLAYTON, C.C.; SNYDERMAN, R. Activation of the respiratory burst enzyme from human neutrophils in a cell-free system. Evidence for a soluble cofactor. **Journal of Clinical Investigation**, v. 75 (5), p. 1735-1739, 1985.

MILLER, L.; HUNT, J.S. Sex steroid hormones and macrophage function. **Life Sciences**, v. 59 (1), p. 1-14, 1996.

MULLER, N., ACKENHEIL, M., HOFSHUSTER, E., MEMPEL, W., ECKSTEIN, R. Cellular immunity in schizophrenic patients before and during neuroleptic therapy. **Psychiatry Research**, v. 37, p. 147-160, 1991.

MULLER, N., ACKENHEIL, M., HOFSHUSTER, E., MEMPEL, W., ECKSTEIN, R. Cellular immunity, HLA-class 1 antigens and family history of psychiatric disorder in endogenous psychosis. **Psychiatry Research**, v. 48, p. 201-217, 1993.

MURBURG, M.M.; PALY, D.; WILKINSON, C.W.; VEITH, R.C.; MALAS, K.L.; DORSA, D.M. Haloperidol increases plasma beta endorphin-like immunoreactivity and cortisol in normal human males. **Life Science**, v. 39 (4), p. 373-381, 1986.

MURBURG, M.M.; WILKINSON, C.W.; RASKIND, M.A.; VEITH, R.C.; DORSA, D.M. Evidence for two differentially regulated populations of peripheral beta-endorphin-releasing cells in humans. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 77 (4), p. 1033-1040, 1993.

NATHAN, C.F.; ROOT, R.K. Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, v. 146, p. 1648-1661, 1977.

O'DONNELL, M.A.; ALDOVINI, A.; DUDA, R.B.; YANG, H.; SZILVASI, A.; YOUNG, R.A.; DeWOLF, W.C. Recombinant Mycobacterium bovis BCG secreting functional interleukin-2 enhances gamma interferon production by splenocytes. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 2508-2514, 1994.

OLSEN N.J.; WATSON, M.B.; HENDERSON, G.S.; KOVACS, W.J. Androgen deprivation induces phenotypic and functional changes in the thymus of adult male mice. **Endocrinology**, v. 129, p. 2471-2476, 1991.

ORTEGA, E. Neuroendocrine mediators in the modulation of phagocytosis by exercise: physiological implications. **Exercise Immunology Review**, v. 9, p. 70-93, 2003.

PAAVONEN, T.; ANDERSSON, L.C.; ADLERCREUTZ, H. Sex hormone regulation of in vitro immune response estradiol enhances human B cells maturation via inhibition of suppressor T cells in pokeweed mitogen-stimulated cultures. **Journal of Experimental Medicine**, v. 154 (6), p. 1935-1945, 1981.

PALERMO-NETO, J. Dopaminergic systems. Dopamine receptors. In: Miguel, E.C.; Rauch, S.L.; Leckman, J.F.(Eds), **The Psychiatric Clinics of North América. Neuropsychiatry of the Basal Ganglia**. Philadelphia, Saunders, 1997, p. 705-721.

PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C.O.; DE SOUZA, R.W. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain Behavioural Immunology**, v. 17 (1), p. 43-54, 2003.

PASSETI, T.A. **Regulação genética de atividades funcionais de macrófagos inflamatórios. Influência na resistência à infecção experimental pelo *Toxoplasma gondii***. 1993. 87f. Dissertação (Mestrado), Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

PICCINI, M.P.; GIUDIZI, M.G.; BIAGIOTTI, R.; BELONIL.; GIANNARINI, L.; SAMPOGNARO, S.; PARROUCHI, P.; MANETTI, R.; ANNUNZIATO, F.; LIVI, C.; ROMAGNANI, S.; MAGGI, E. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. **Journal of Immunology**, v. 155, p. 128-133, 1995.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produce by cell in culture. **Journal Immunological Methods**, v. 38, p. 161-170, 1980.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal Immunological Methods**, v. 46, p. 211-226, 1981.

POLLOCK, B.G. Recent developments in drug metabolism of relavance to psychiatrists. **Havard Review of Psychiatry**, v. 2, p. 204-213, 1994.

QIU, Y.H.; PENG, Y.P.; JIANG, J.M.; WANG, J.J. Expression of tyrosine hydroxylase in lymphocytes and effect of endogenous catecholamines on lymphocyte function. **Neuroimmunomodulation**, v. 11 (2), p. 75-83, 2004.

QUAN, N.; WHITESIDE, M.; HERKENHAM, M. Time course and localization patterns of interleukin-1 messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. **Neuroscience**, v. 83, p. 281-293, 1998.

RABINOVICH, M.; DeSTEFANO, M.J. Macrophage spreading in vitro: I. Inducers of spreading. **Experimental Cell Research**, v. 77, p. 323-334, 1973a.

RABINOVICH, M.; DeSTEFANO, M.J. Macrophage spreading in vitro: II. Manganese and other metals as inducers or as co-factors for induced spreading. **Experimental Cell Research**, v. 79, p. 423-430, 1973b.

RAPPOLEE, D.A.; WERB, Z. Secretory products of phagocytes. **Currunt Opinion in Immunology**, v. 1 (1), p. 47-55, 1988.

REYNOLDS, G.P. Development in the drug treatment of schizophrenia. **Journal of Pathology**, v. 141, p. 309-331, 1983.

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, p. 1145-1153, 1999.

RINCÓN, E.O.; MARCHENA, J.M.; GARCÍA, J.J.; SCHMIDT, A.; SCHULZ, T.; MALPICA, I.; RODRÍGUES, A.B.; BARRIGA, C.; MICHNA, H.; LÖTZERCH, H.

Phagocytic function in cyclists: correlation with catecholamines and cortisol. **Journal Applied Physiology**, v. 91, p. 1067-1072, 2001.

ROBBINS, S.L. Inflamação e Reparo. In: **Patologia Estrutural e Funcional**, Interamericana, Rio de Janeiro, 1974, p. 51-94.

ROOT, R.K.; METCALF, J.; OSHINO, N.; CHANGE, B. H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis. I. Documentation, quantification and some regulating factors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 55, p. 945-955, 1975.

RUSSO, M.; TEIXEIRA, H.C.; MARCONDES, M.C.G.; BARBUTO, J.A.M. Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 22, p. 1271-1273, 1989.

SCHATTNER, A., CORI, Y., HAHN, T., SIROTA, P. No evidence for autoimmunity in schizophrenia. **Journal Autoimmunology**, v. 9, p. 661-666, 1996.

SHEVACH, E.M. Macrophages and others accessory cells. In: W.E. Pau, **Fundamental Immunology**. Raven Press, New York, 1984, p. 71-107.

STHOEGER, Z.M.; CHIORAZZI, N.; LAHITA, R.G. Regulation on the immune response by sex hormones. I. in vitro effects of estradiol and testosterone on pokeweed mitogen-induced human B cell differentiation. **Journal of Immunology**, v. 141, p. 91-98, 1988.

STRUVE, J.; ARONSSON, B.; FRENNING, B.; GRANATH, F.; SYDOW, M.; WEILAND, O. Intramuscular vs intradermal administration of a recombinant hepatitis B vaccine: a comparison of response rates and analysis of factors influencing the antibody response. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 24, p. 423-429, 1992.

STYPULA, G.; KUNERT-RADEK, J.; STEPIEN, H.; ZYLINSKA, K.; PAWLIKOWSKI, M. Evaluation of interleukins, ACTH, cortisol and prolactin concentrations in the blood of patients with parkinson's disease. **Neuroimmunomodulation**, v. 3 (2-3), p. 131-134, 1996.

TANAKA, K.F.; SHINTANI, F.; FUJII, Y.; YAGI, G.; ASAI, M. Serum interleukin-18 levels are elevated in schizophrenia. **Psychiatry Research**, v. 96 (1), p. 75-80, 2000.

TEMLETT, J.A. Parkinson's disease: biology and aetiology. **Current Opinion in Neurology**, v. 9, p. 303-307, 1996.

TSAO, C.W.; LIN, Y.S.; CHENG, J.T. Effect of dopamine of immune cell proliferation in mice. **Pharmacology Letters**, v. 61 (24), p. 361-371, 1997.

VALLONE, D.; PICETTI, R.; BORRELLI, E. Structure and function of dopamine receptors. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, p. 125-132, 2000.

VERHOEF, C.M., van ROON, J.A.; VIANEN, M.E.; LAFEVER, F.P.; BIJLSMA, J.W. The immune suppressive effect dexamethasone in rheumatoid arthritis is accompanied by upregulation of interleukin 10 and by differential changes in interferon- γ and interleukin 4 production. **Annual Rheumatology Disease**, v. 58, p. 49-54, 1999.

WEBER, M.M.; MICHL, P.; AUERNHAMMER, C.J.; ENGELHARDT, D. Interleukin-3 and interleukin-6 stimulate cortisol secretion from adult human adrenocortical cells. **Endocrinology**, v. 138, p. 2207-2210, 1997.

WEIGENT, D.A.; BLALOCK, J.E. Interactions between the neuroendocrine and immune systems: common hormones and receptors. **Immunology Review**, v. 100, p. 79-108, 1987.

WERB, Z. How the macrophage regulates its extracellular environment. **American Journal of Anatomy**, v. 166 (3), p. 237-256, 1983.

YIM, C.Y.; BASTIN, N.R.; SMITH, J.C.; HIBBS JR., J.B.; SAMLOWSKI, W.E. Macrophage nitric-oxide synthesis delay progression of ultraviolet-light-induced murine skin cancer. **Cancer Research**, v. 53, p. 5507-5511, 1993.

YU-LEE, L.Y. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. Recent. **Progress in Hormonal Research**, v. 57, p. 435-455, 2002.

ZHANG-WONG, J.; BEISER, M.; ZIPURSKY, R.B., BEAN, G. An investigation of ethnic differences in the pharmacodynamics of haloperidol. **Psychiatry Research**, v. 81, p. 333-339, 1998.

ZHU, X.H.; ZELLWEGER, R.; WICHMANN, M.W.; AYALA, A.; CHAUDRY, I.H. Effects of prolactin and metoclopramide on macrophage cytokine gene expression in late sepsis. **Cytokine**, v. 9 (6), p. 437-446, 1997.