MÔNICA SAKAI

**EFEITOS DO DIAZEPAM SOBRE O CRESCIMENTO TUMORAL
E IMUNIDADE DE ANIMAIS PORTADORES DO TUMOR
ASCÍTICO DE EHRLICH**

São Paulo
2004

MÔNICA SAKAI

**Efeitos do diazepam sobre o crescimento tumoral e
imunidade de animais portadores do Tumor Ascítico
de Ehrlich**

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

Departamento:
Patologia

Área de Concentração:
Patologia Experimental e Comparada

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. 1427 Sakai, Mônica
FMVZ Efeitos do diazepam sobre o crescimento tumoral e imunidade
de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich / Mônica Sakai.
– São Paulo : M. Sakai, 2004.
128 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo.
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de
Patologia, 2004.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e
Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. João Palermo Neto.

1. Neuroimunomodulação. 2. Diazepam. 3. Tumor de Ehrlich
animal. 4. Macrófago. 5. Linfócitos. 6. Imunidade natural. I. Título.

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 diazepam sobre a resposta imune de animais portadores do tumor de Ehrlich", Protocolo nº 160/2002, 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 "Diazepam effects on immune response in Ehrlich tumor bearing mice" protocol number 160/2002, 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

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: SAKAI, Mônica

Título: Efeitos do diazepam sobre o crescimento tumoral e imunidade de animais portadores do Tumor Ascítico de Ehrlich

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – USP para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Julgamento _____

Aos meus pais Tieko, Toshiuke (in memorian) e Jum, pelos ensinamentos que levarei por toda a vida, pelo apoio irrestrito nos momentos mais difíceis, por tudo que sou.

Aos meus irmãos Flávio e Paulo Roberto e à Rita pelo apoio, pelos conselhos, por dividirem comigo as alegrias e tristezas desta caminhada.

Ao Claudio, pela paciência e por sua presença que ilumina a minha vida.

Ao Prof. Dr. João Palermo Neto, pela confiança e pelos ensinamentos durante estes anos, pelo exemplo de dedicação e entusiasmo pela ciência.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Patologia e Toxicologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), local aonde este trabalho foi realizado.

À Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli (VPT-FMVZ-USP), por seu otimismo contagiante, contribuição neste trabalho e apoio sempre presentes.

Ao Prof. Benjamim Eurico Malucelli (VPT-FMVZ-USP), pelos conselhos e pelo auxílio desde o princípio.

Ao Prof. Dr. Paulo César Maiorka (VPT-FMVZ-USP), pela amizade, incentivo e ensinamentos transmitidos a cada dia.

Ao Prof. Dr. Luis Carlos de Sá Rocha (VPT-FMVZ-USP), pelo apoio durante a realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Idércio Luiz Sinhorini (VPT-FMVZ-USP), por transmitir seu grande entusiasmo pela vida e pelo carinho.

Ao Prof. Dr. Luciano Freitas Felício (VPT-FMVZ-USP), pelo carinho e pela atenção sempre dispensada.

Ao Prof. Dr. Vassilios Papadopoulos, Georgetown University - Medical Center - Washington, D.C., EUA, pelas sugestões durante a realização deste projeto.

A Profa. Dra. Sonia Jancar e Marina T. Shio, do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciência Biomédicas - USP, pela doação das células YAC-1.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas, do Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina - USP, pelo apoio e atenção sempre presentes.

Aos funcionários do Biotério (VPT-FMVZ-USP): Claudia, Idalina, Rosiris, Herculano, Nelson, Luis pela paciência e dedicação diária.

Aos funcionários do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia (VPT-FMVZ-USP): Priscila, Magali e Ricardo pela atenção e auxílio durante os experimentos.

Às funcionárias das secretarias (VPT-FMVZ-USP), Cristina, Claudia, Silvia, Romeika e Marguiti pela convivência e gentileza.

Aos funcionários do Laboratório de Histologia (VPT-FMVZ-USP), Cláudio e Luciano, pela confecção das lâminas histológicas.

Às funcionárias da secretaria de pós-graduação da FMVZ-USP, Sandra, Claudia e Deise pela colaboração.

Aos funcionários da biblioteca da FMVZ-USP Helena, Ana, Solange, Mara, Cristiane, Margareth e Elza, pela correção da tese e auxílio em todos os momentos.

A todos meus colegas de pós-graduação: Cristina, Thiago, Dario, Fabio, Ricardo Lazzarini, Basso, Frederico, Carolina Penna, Daniel Stankevicius, Eduardo, Evelise, Glaucie, Luciana Vismari, Silvia Morgulis, Ana Leda, Caio, Wanderley, Vanessa, Daniel Cohn, Adriana Portela, Luciana Mirotti, Elaine, Maria Isabel, Camila, Márcia Sukikara, Érika, Fabiana Godoy, Adriana Valera, Domenica, Ísis, Andréia, Marcos, Breno, Helena, Altamir, Renato, Renata, Soraya, Marcela, Aline, Milena, Fabiana Xavier, Carlos Collares, Daniela, Ligia, Sílvia Oloris, Patrícia, Márcia Nagamine, Heidge, José Luis, Lucas, Kátia Pinelo, Kátia Kimura, Stefanie, Luciana Torres, Daniel Sanches, Ana Paula, Carolina Scarpa, Renata Domenico, Marco Aurélio e Ricardo Yuji pela convivência e aprendizado a cada dia.

Ao Laboratório Cristália pela doação do placebo do COMPAZ® (diazepam).

Ao laboratório de Patologia do Hospital Sírio Libanês pelo auxílio durante as reações de imunoistoquímica.

À FAPESP apoio financeiro concedido, pela bolsa de estudos (02/04975-1) e pelo projeto temático (99/04228-7) da qual este trabalho faz parte.

RESUMO

SAKAI, M. **Efeitos do diazepam sobre o crescimento tumoral e imunidade de animais portadores do Tumor Ascítico de Ehrlich.** [Diazepam effects on tumor growth and on immunity of Ehrlich tumor bearing mice]. 2004. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Benzodiazepínicos (BDZ) são fármacos amplamente utilizados devido às suas propriedades ansiolíticas e sedativas, mediadas pelo complexo GABA_A no Sistema Nervoso Central (SNC). Além destes receptores centrais, os BDZ possuem afinidade por receptores do tipo periféricos (PBR) os quais estão presentes em células do sistema imune, como linfócitos e macrófagos, em células tumorais e em glândulas adrenais. O presente trabalho avaliou os efeitos do diazepam, um BDZ freqüentemente utilizado, sobre o crescimento tumoral e a imunidade de animais portadores do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE). Mais especificamente, este trabalho avaliou os seguintes parâmetros da resposta imune: atividade de macrófagos, populações de linfócitos B, T helper e citotóxicos esplênicos, citotoxicidade de células *Natural Killer* (NK). Além disso, a marcação para PBR em células do TAE e avaliação de possíveis efeitos do diazepam ou Ro5-4864 *in vitro* sobre o ciclo celular do TAE foram avaliadas. Os resultados mostraram os seguintes efeitos do tratamento com diazepam *in vivo* (3,0 mg/kg): (1) aumento do crescimento do TAE; sem modificação das fases do ciclo celular do tumor, após 7 dias, (2) diminuição do número de leucócitos da cavidade peritoneal, da produção de NO e do índice de espraçamento; mas sem interferência com a produção de peróxido de hidrogênio e o índice de fagocitose, após 2 dias (3) não modificou o peso relativo do baço e a porcentagem de linfócitos esplênicos, após 2 dias ou 7 dias (4) aumento da citotoxicidade de células NK, após 3 dias (5) diminuição da porcentagem de células

do TAE marcadas para PBR, após 7 dias. O tratamento *in vitro* com diazepam ou Ro5-4864 mostrou um aumento da proliferação de células do TAE. Já o tratamento *in vivo* com diazepam em doses menores (0,3 mg/kg e 1mg/kg) não modificou o crescimento do TAE, após 7 dias. Desta forma, sugere-se que o diazepam na dose de 3,0 mg/kg tenha aumentado o crescimento do TAE e diminuído a resposta imune inata, observada por meio da diminuição da atividade dos macrófagos peritoneais. Parece-nos plausível excluir de nossos resultados a participação de linfócitos B, T helper e citotóxicos. Por outro lado, não foi possível precisar a relevância das células NK para o desenvolvimento do tumor. Além disso, pode-se afirmar que há expressão de PBRs em células do TAE e que o tratamento *in vitro* com diazepam ou Ro5-4684 aumentou a proliferação destas células. Desta forma, os resultados dos dois últimos experimentos sugerem que a existência de efeitos do diazepam sobre crescimento tumoral *in vivo* pode também ser atribuída, ao menos em parte, a uma ação direta deste fármaco sobre células do TAE.

Palavras chave: Neuroimunomodulação, Diazepam, Tumor de Ehrlich animal, Macrófago, Linfócitos, Imunidade Natural

ABSTRACT

SAKAI, M. **Diazepam effects on tumor growth and on immunity of Ehrlich tumor bearing mice.** [Efeitos do diazepam sobre o crescimento tumoral e imunidade de animais portadores do Tumor Ascítico de Ehrlich]. 2004. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Benzodiazepines (BDZ) are drugs widely used due to their anxiolytic and sedative properties, acting on specific sites coupled to GABA_A complex in the Central Nervous System (CNS). Besides these central receptors, BDZ have affinity for peripheral-type receptors (PBR), which have been found in immune cells, such as lymphocytes and macrophages, in tumor cells and in the adrenal glands. The present study evaluated the effects of diazepam, a commonly used BDZ, on tumor growth and immunity of mice bearing Ehrlich Ascitic Tumor (EAT). Specifically, this study evaluated the following parameters of the immune system: macrophage activity, populations of B, helper and cytotoxic T lymphocytes, and Natural Killer (NK) cells cytotoxicity. Furthermore, the evaluation of PBR expression in EAT cells and possible *in vitro* effects of diazepam or Ro5-4864 on EAT cell cycle were performed. Results showed the following diazepam effects *in vivo* (3.0 mg/kg per day): (1) increased tumor growth without changes in cell cycle, after 7 days; (2) decreased the number of leucocytes in the peritoneal cavity, the production of NO and the spreading index, but did not modify the production of hydrogen peroxide and the phagocytosis index, after 2 days; (3) did not modify the relative spleen weight and the population of lymphocytes after 2 or 7 days, (4) increased NK cytotoxicity after 3 days; (5) reduced the percentage of EAT cells expressing PBR after 7 days. Experiments performed *in vitro* showed that diazepam or Ro5-4864 increased the proliferation of EAT cells. Diazepam treatment *in vivo* using lower doses (0.3 mg/kg and 1mg/kg) did not modify

tumor growth. Therefore, diazepam in the dose of 3.0 mg/kg increased the growth of EAT and reduced innate immunity, probably through the decrease in the activity of peritoneal macrophages. A role of B and helper or cytotoxic T lymphocytes in our experiments seems unlikely since the population of these cells types remained unchanged. On the other hand, it was not possible to determine the relevance of NK cells cytotoxicity on tumor development. The expression of PBR in EAT cells and the increase of their proliferation induced by *in vitro* treatment with diazepam or Ro5-4684 were observed. The results of these two last experiments suggest that the increase on tumor growth following diazepam treatment *in vivo* can be attributed, at least in part, to a direct action of this drug on EAT cells.

Palavras chave: Neuroimmunomodulation. Diazepam. Ehrlich Tumor. Macrophage. Lymphocytes. Natural Immunity.

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA	-	6-hidroxi-dopamina
ACTH	-	Hormônio adrenocorticotrópico
APC	-	Células apresentadoras de antígenos
B Max	-	Binding máximo para receptores
BCG	-	Cepa atenuada do bacilo Calmette-Guerin
BDZ	-	Benzodiazepínicos
BSA	-	Albumina sérica bovina
CBR	-	<i>Central benzodiazepine receptor</i>
CD	-	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	-	DNA complementar
conA	-	Concanavalina A
DBI	-	<i>Diazepam binding inhibitor</i>
FITC	-	Isoticianato de fluoresceína
FSC	-	Feixe de luz que indica o tamanho da célula
GABA _A	-	Complexo receptor γ-aminobutírico
GM-CSF	-	Fator estimulante de colônia granulócito macrófago
HPA	-	Hipotálamo-pituitária-adrenal
IFN-γ	-	Interferon-γ
Ig	-	Imunoglobulina
IL	-	Interleucina
Kd	-	Constante de afinidade
LPS	-	Lipopolissacarídeo
MDF	-	<i>Macrophage deactivating factor</i>
MHC	-	Complexo de histocompatibilidade principal
mRNA	-	RNA mensageiro
NK	-	<i>Natural killer</i>
NO	-	Óxido nítrico
OVA	-	Ovalbumina
PAF	-	Fator de agregação plaquetária
PBR	-	<i>Peripheral benzodiazepine receptor</i>
PBS	-	<i>Phosphate buffer saline</i>

PE	-	Ficoeritrina
PGE2	-	Prostaglandina E2
PHA	-	Fitohemaglutinina
PI	-	Iodeto de propídeo
PK 11195	-	Ligante específico para PBR
PMA	-	<i>Phorbol miristate acetate</i>
Ro5-4864	-	Ligante específico para PBR
SEB	-	<i>Staphylococcal enterotoxin B</i>
SI	-	Sistema Imune
SNA	-	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	-	Sistema Nervoso Central
SNP	-	Sistema Nervoso Periférico
SSC	-	Feixe de luz que indica a granulosidade da célula
TAE	-	Tumor Ascítico de Ehrlich
TNF- α	-	Fator de necrose tumoral alfa
VDAC	-	Canal de anion voltagem dependente
VEGF	-	Fator do crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO	19
2.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PBR - RECEPTORES BENZODIAZEPÍNICOS PERIFÉRICOS.....	26
2.3 EFEITOS DOS BENZODIAZEPÍNICOS SOBRE PBR.....	30
2.3.1 Envolvimento dos PBRs com funções imunes	30
2.3.2 Envolvimento dos PBRs com o câncer	33
2.4 IMUNOLOGIA TUMORAL	36
3 OBJETIVOS.....	41
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 ANIMAIS	43
4.2 DROGAS E REAGENTES	44
4.3 TRATAMENTO	48
4.4 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DE CÉLULAS DO TUMOR DE EHRlich.....	49
4.5 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DO TUMOR DE EHRlich.....	49
4.6 COLETA E CONTAGEM DE CÉLULAS DO LAVADO PERITONEAL.....	50
4.7 TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO MACROFÁGICA:	50
4.7.1 Determinação da Produção de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)	50
4.7.2 Determinação da Produção de Óxido Nítrico (NO).....	51
4.7.3 Avaliação do espriamento e da fagocitose realizado por macrófagos peritoneais	52
4.8 CITÔMETRO DE FLUXO.....	53
4.9 AVALIAÇÃO DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE CELULAR.....	54
4.10 SEPARAÇÃO E OBTENÇÃO DOS LINFÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO.....	55
4.11 CULTURA E MARCAÇÃO DE CÉLULAS ALVO YAC-1	56
4.12 ATIVIDADE DE CÉLULAS NATURAL KILLER – CITOMETRIA DE FLUXO	56

4.13 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE PBRS EM CÉLULAS DO TAE – IMUNOISTOQUÍMICA	57
4.14 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE PBRS EM CÉLULAS DO TAE – CITOMETRIA DE FLUXO	59
4.15 CULTURA DE CÉLULAS DO TUMOR DE EHRLICH	60
4.16 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR –CITOMETRIA DE FLUXO	61
5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS.....	63
5.1 EXPERIMENTO 1 - EFEITOS DE UM TRATAMENTO COM DIAZEPAM 3,0 mg/Kg (7 DIAS) SOBRE O CRESCIMENTO DO TAE	63
5.2 EXPERIMENTO 2 - EFEITOS DE UM TRATAMENTO COM DIAZEPAM 3,0 mg/Kg (POR 2 DIAS) SOBRE A MIGRAÇÃO E ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS, AVALIADOS 24 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO DO TAE, POR MEIO DAS TÉCNICAS DE PRODUÇÃO DE H ₂ O ₂ E NO, ESPRAIAMENTO E DE FAGOCITOSE	69
5.3 EXPERIMENTO 3 - EFEITOS DE UM TRATAMENTO (2 E 7 DIAS) COM DIAZEPAM 3,0 mg/Kg SOBRE A PORCENTAGEM DE LINFÓCITOS B E T (HELPER E CITOTÓXICOS) EM ANIMAIS PORTADORES DO TAE	76
5.4 EXPERIMENTO 4 - EFEITOS DE UM TRATAMENTO (3 DIAS) COM DIAZEPAM 3,0 mg/Kg SOBRE A ATIVIDADE CITOTÓXICA DE CÉLULAS NK PROVENIENTES DE ANIMAIS PORTADORES DO TAE	80
5.5 EXPERIMENTO 5 - INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE PBRS EM CÉLULAS DO TAE EM ANIMAIS TRATADOS OU NÃO COM O DIAZEPAM 3,0 mg/Kg	83
5.6 EXPERIMENTO 6 - EFEITOS DE UM TRATAMENTO COM DIAZEPAM E Ro5- 4864 <i>IN VITRO</i> SOBRE O CICLO CELULAR TAE	88
5.7 EXPERIMENTO 7 - EFEITOS DE UM TRATAMENTO PROLONGADO (7 DIAS) COM DIAZEPAM 0,3 mg/Kg E 1,0 mg/Kg (7 DIAS) SOBRE O CRESCIMENTO DO TAE.....	92
6 DISCUSSÃO	97
7 CONCLUSÕES	112
REFERÊNCIAS.....	114

1 INTRODUÇÃO¹

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

Neste contexto, mostrou-se que os benzodiazepínicos além de atuar em receptores GABA_A centrais produzindo seus clássicos efeitos ansiolíticos, atuam também em outro tipo de receptores: Receptores Benzodiazepínicos Periféricos (PBR) presentes em macrófagos, linfócitos e outras células do sistema imune e, também, na membrana das mitocôndrias das células da adrenal e nas células tumorais.

Sabe-se que os benzodiazepínicos inibem manifestações imuno-inflamatórias após administração em ratos e camundongos. Estudos mostraram que o diazepam foi capaz de diminuir a atividade de macrófagos peritoneais, mensurada através da taxa de espraçamento e fagocitose, bem como da liberação de H₂O₂, assim como o edema de pata e a pleurisia experimental induzidos por carragenina.

¹ As referências bibliográficas estão citadas no item 2 Revisão de literatura

Nos dias atuais tem sido bastante discutido e estudado o conforto de pacientes portadores de neoplasias. Assim, uma sub-especialidade dentro da área da saúde tem se destacado: a psico-oncologia. Neste contexto, destaca-se a preocupação existente com problemas de ansiedade e depressão que possam estar presentes em pacientes cancerosos. Os benzodiazepínicos despontam, assim, como eventual terapêutica paliativa para esse tipo de problema. Por outro lado, alguns estudos têm sido conduzidos na tentativa de controlar, com o uso de benzodiazepínicos, episódios eméticos induzidos pela quimioterapia do câncer.

Alguns trabalhos têm mostrado a presença de uma maior densidade de PBRs em células tumorais, como no carcinoma de ovário e no hepatocarcinoma celular. Estudos de imunoistoquímica correlacionaram positivamente a existência de uma maior expressão de PBR em hepatocarcinoma e em astrocitomas humanos com o grau de malignidade dos mesmos. Além disso, foi demonstrado que ligantes de PBR como o diazepam, o PK11195 e o Ro5-4864 foram capazes de interferir com a proliferação de células de um tumor mamário humano BT-20 causando: em baixas doses (1 nM) um aumento de proliferação celular e em altas doses (1 mM) uma diminuição desta proliferação.

Uma vez que os PBRs estão distribuídos em várias células do organismo e, também em células tumorais e, considerando-se que o uso de ligantes de PBR são capazes de modificar a resposta imune-inflamatória e a capacidade de proliferação de células tumorais propomo-nos estudar os efeitos de um tratamento com diazepam sobre o crescimento do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE). Especificamente, pretendemos verificar se este benzodiazepínico interfere com o crescimento tumoral e com a resposta imune frente a este estímulo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO

As interações bi-direcionais entre o Sistema Nervoso Central (SNC) e o Sistema Imune (SI) têm sido fonte para pesquisas multidisciplinares na área de neuroimunomodulação ou psiconeuroimunologia (BESEDOVSKY; DEL REY; SORKIN, 1985; BLALOCK, 1989; LICINIO; FROST, 2000; YANG; GLASER, 2002, 2003). Desde Selye (1936), já se havia observado que agentes considerados estressores causavam aumento do peso das adrenais e involução tímica. Bartrop et al. (1977) verificaram que viúvas apresentavam uma diminuição da função linfocitária. Neste sentido, Galeno, 200 AC, já acreditava que mulheres melancólicas eram mais susceptíveis ao desenvolvimento de tumores de mama. Estes estudos foram importantes, pois demonstraram a existência de uma correlação entre os SNC e SI; desde então, pesquisas têm sido realizadas na tentativa de melhor compreender os mecanismos responsáveis por esta correlação.

Atualmente, sabe-se que diversos estímulos provenientes do SNC são capazes de modular uma resposta imune. Desta forma, o sistema endócrino, em especial, o eixo Hipotálamo Pituitária Adrenal (HPA), é um dos responsáveis por vários elos de ligação entre estes dois sistemas (LICINIO; FROST, 2000; SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000; STRANGE et al., 2000). Sabe-se, também, que as endorfinas, o Sistema Nervoso Autônomo (SNA) (BLALOCK, 1989) e também medicamentos de ação central, como os benzodiazepínicos (MASSOCO; PALERMO-NETO, 1999, 2003; SCHLUMPF et al., 1990) interferem com a resposta imune.

A ativação do eixo HPA, e a conseqüente produção dos glicocorticóides, durante o estresse são um dos principais mecanismos responsáveis pelas alterações encontradas no decorrer de uma resposta imune. Sabe-se serem os glicocorticóides capazes de inibir a transcrição de inúmeras citocinas, como da interleucina 1 (IL-1), IL-13, IL-5, IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral (TNF) e fator estimulante de colônia (GM-CSF) (GUYRE et al., 1988). Além disso, os glicocorticóides não interferem apenas com a síntese de citocinas; outros mecanismos também descritos para elas incluem a diminuição de receptores para IL-4 (SO et al., 2002) e a diminuição da migração/quimiotaxia de eosinófilos (SUGIMOTO et al., 2003) e de neutrófilos (VAN OVERVELD et al., 2003).

Desta forma, Zhou et al. (1993) mostraram que ratos submetidos a situações estressantes, como, por exemplo, choque nas patas, apresentaram um aumento dos níveis plasmáticos de ACTH, corticosterona e IL-6. Estes mesmos autores mostraram a importância dos hormônios para este fato, em especial dos glicocorticóides, pois ratos adrenalectomizados e submetidos à situação de estresse, apresentaram uma menor resposta ao estressor, mensurada pelo menor aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 (ZHOU et al., 1993). Neste sentido, Cao e Lawrence (2002) mostraram que camundongos submetidos a um estresse agudo por frio e contenção apresentavam aumento dos níveis séricos de corticosterona, IL-6 e Interferon- γ (IFN- γ), e também, um maior número de bactérias (*Listeria monocytogenes*) viáveis em órgãos como baço e fígado após uma infecção experimental, evidenciando, desta forma, a importância do estresse na modulação dos processos imunológicos e no desenvolvimento de uma infecção.

Além disso, Fonseca, Massoco e Palermo-Neto (2002) mostraram que um estresse aplicado em fêmeas gestantes, interfere com parâmetros comportamentais

e atividade de macrófagos da prole. Mais especificamente, estes autores observaram que esta prole de camundongos apresentou uma maior locomoção total avaliada no campo aberto e um menor índice de espraçamento de macrófagos peritoneais. Além disso, estes mesmos autores mostraram que este estresse aplicado durante a fase pré-natal interferiu com a responsividade de alguns parâmetros da resposta imune da prole de camundongos submetidos a um estresse pós-natal, ou seja, houve um aumento da produção de H_2O_2 e uma diminuição do índice de fagocitose no grupo de animais estressados pré e pós natalmente quando estes são comparados ao grupo de animais estressados apenas pré natalmente (FONSECA; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2002).

Sabe-se, também, que estímulos estressores interferem com a resposta imunológica, modificando, por exemplo, o balanço entre a imunidade do tipo Th1 e Th2. Iwakabe et al. (1998) mostraram que camundongos submetidos a um estresse por contenção apresentavam aumento dos níveis séricos de corticosterona, diminuição da atividade de células NK e da produção de IFN- γ , enquanto a produção de IL-4 não se apresentava diminuída, mostrando, estes achados, um deslocamento do balanço Th1/Th2 induzido pelo estresse, isto é, um direcionamento para Th2. Este desequilíbrio pode ser de grande relevância, pois uma resposta imunológica do tipo Th2 foi relatada como capaz de tornar indivíduos mais susceptíveis a determinados tipos de doenças, em especial, às alergias (BASHIR et al., 2004; MORAFO et al., 2003). Neste sentido, um estudo realizado por Portela et al. (2001) mostrou que ratos previamente sensibilizados por ovalbumina (OVA), submetidos a estresse por choque nas patas e subsequente desafio com OVA, obtiveram um menor tempo de interação social com outro rato e maior número de leucócitos do

lavado broncoalveolar quando comparados a animais não estressados; relatando, desta forma, uma clara correlação entre estresse e resposta pulmonar anafilática.

Estudos baseados nesta complexa relação entre SNC, SI e endócrino também têm sido realizados para elucidar alguns mecanismos envolvidos com a progressão de tumores. Palermo-Neto, Massoco e Robespierre de Souza (2003) mostraram que camundongos submetidos a um estresse físico ou psicológico apresentaram elevação dos níveis de corticosterona, diminuição do índice de espraçamento e de fagocitose por macrófagos peritoneais e, também, um maior crescimento do TAE. Camundongos estressados durante a fase pré-natal apresentaram aumento dos níveis de ansiedade, diminuição dos índices de espraçamento e fagocitose por macrófagos peritoneais e, também, aumento do crescimento do Tumor de Ehrlich em sua forma sólida e ascítica (PALERMO-NETO; MASSOCO; FÁVARE, 2001). Strange et al. (2000) mostraram que camundongos machos submetidos a estresse psicossocial e inoculados com um tumor andrógeno responsivo (AR SC115) apresentavam menor resposta à quimioterapia e, também, uma menor sobrevivência, dependendo os efeitos observados do tipo de estresse aplicado. Estas evidências justificam a grande preocupação dos pesquisadores com esta área de pesquisa, também chamada de psico-oncologia. Desta forma, outros trabalhos têm sido realizados em seres humanos buscando avaliar a necessidade de se complementar os tratamentos convencionais (quimioterapia e radioterapia, por exemplo) com outros ligados ao uso de psicofármacos e/ou a um acompanhamento psicológico que, de alguma forma, auxiliem o paciente a reduzir seus níveis de ansiedade, apresentando uma melhor qualidade de vida (ANDERSEN et al., 2004; DAVIDSON et al., 2004, HERNANDEZ-REIF et al. 2004).

Além do eixo HPA, um outro importante mecanismo ativado durante o estresse é o Sistema Nervoso Autônomo (SNA); a estimulação deste sistema leva à liberação de noradrenalina dos terminais nervosos simpáticos e à secreção de adrenalina pela adrenal (MAIER, 2003). Sabe-se, a este respeito, que as fibras simpáticas apresentam íntimo contato com os órgãos linfóides, como acontece, por exemplo, no baço que apresenta intensa inervação simpática (MADDEN; FELTEN, 1995). Além disso, outros órgãos e células, como o pulmão (RUGG; BARNETT; NAHORSKY, 1978), macrófagos alveolares (HENRICKS et al., 1988) e os linfócitos circulantes (FELTEN et al., 1987, WATANABE; LAI; YOSHIDA, 1981) possuem alta densidade de marcação para β_2 -adrenoceptores.

Na tentativa de melhor compreender estes mecanismos neuroimunes ligados ao SNA, Broug-Holub et al. (1998) mostraram que ratos submetidos a um estresse apresentavam maior liberação de IL-1 β por macrófagos alveolares. Mostraram também que este efeito era revertido quando os animais recebiam um pré tratamento que bloqueava a atividade do SNA de maneira inespecífica, ou, também mais especificamente os β_2 -adrenoceptores, minutos antes da aplicação de um estresse. Além disso, mostraram que os animais estressados não apresentaram níveis elevados de corticosterona ou ACTH, dados que reforçavam a participação do SNA no fenômeno que analisaram.

Ainda sobre o papel do SNA nos processos neuroimunes, Del Rey et al. (2002) estudaram animais que foram inoculados com um superantígeno chamado staphylococcal enterotoxin B (SEB). Estes animais apresentaram aumento tanto da proliferação de linfócitos T esplênicos como dos níveis plasmáticos de IL-2 dois dias após a inoculação; estes mesmos autores relataram que estes parâmetros estavam diminuídos quando os animais eram previamente tratados com 6-hidroxi-dopamina

(6-OHDA), por via sistêmica, uma substância que induz denervação simpática (DEL REY et al., 2002). Em animais tratados com 6-OHDA por via intra-cérebro-ventricular (i.c.v.), observou-se uma diminuição tanto dos níveis de adrenalina e noradrenalina na região do hipotálamo, como, também da proliferação de linfócitos sanguíneos e de esplenócitos, da produção de IL-2 e de IFN- γ e da expressão de mRNA de IL-2 em esplenócitos (PACHECO-LÓPEZ et al., 2003). Neste mesmo trabalho, os autores observaram que estes efeitos imunológicos não estavam correlacionados com a ativação de eixo HPA e que eram eliminados através da realização de simpatectomia periférica, evidenciando-se, mais uma vez, a importância dos mecanismos simpáticos para a modulação de uma resposta imune (PACHECO-LÓPEZ et al., 2003)

Como já descrito acima, o SNC é capaz de interferir com o SI. No entanto, influências no sentido oposto também ocorrem; ou seja, alterações imunológicas também podem interferir com funções neuroendócrinas. Esta comunicação bi-direcional está embasada, entre outras, em razões bioquímicas, já que as células do SI e dos órgãos endócrinos possuem mediadores (homônios e citocinas), receptores e mecanismos transdutores de sinal idênticos (BLALOCK, 1989).

Desta forma, os efeitos atribuídos às citocinas no SNC podem ser agrupados em três categorias: 1- interação das citocinas com o sistema nervoso periférico (SNP), 2- efeitos centrais mediados pelas citocinas, 3- efeitos diretos das citocinas no SNC (ROTHWELL; HOPKINS, 1995).

Besedovsky et al. (1975) mostraram que a imunização de ratos e camundongos com diferentes antígenos levava a um aumento de até três vezes na concentração de corticosterona no sangue. Posteriormente, este mesmo grupo de pesquisadores mostrou que a inoculação do sobrenadante de células estimuladas

por Concanavalina A (conA) *in vitro* também era capaz de provocar um aumento dos níveis séricos de corticosterona em ratos (BESEDOVSKY; DEL REY; SORKIN, 1981). Neste sentido, processos inflamatórios e/ou infecciosos produzem citocinas que podem ativar o eixo HPA, causando alterações hormonais e comportamentais; esta ativação do eixo HPA é interpretada como um mecanismo de regulação de diversas funções orgânicas (DUNN; WANG, 1995). Desta forma, Blalock (1984) já havia proposto que o sistema imunológico seria um órgão sensorial difuso, capaz de informar ao cérebro sobre eventos relacionados a infecções ou injúrias.

O conjunto de alterações comportamentais observadas em animais após a injeção de IL-1 ou de um Lipopolissacarídeo de *E. Coli* (LPS) foi denominado de comportamento doentio (*sickness behavior*) (KENT et al., 1992; KELLEY et al., 2003). Sabe-se, portanto, que durante uma infecção o organismo desenvolve alguns sintomas clássicos como febre, anorexia, redução da atividade exploratória e da interação social (MAIER, 2003). Neste momento, é importante que o comportamento doentio não seja interpretado como um estado de depressão inespecífica do SNC, mas sim como uma estratégia altamente organizada que visa a adaptação do animal a um estímulo (uma infecção, por exemplo) e que muitas vezes este comportamento é necessário à sua sobrevivência (HART, 1988).

Dentre os mecanismos pelos quais as citocinas interferem com o comportamento animal são descritas duas vias de comunicação: uma via neural, mais rápida e uma via humoral, mais lenta (KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002). A via neural é representada por neurônios aferentes, como o nervo vago, cujas terminações inervam os órgãos da cavidade peritoneal. Desta forma, macrófagos e células dendríticas estão dispostos em íntimo contato com a bainha perineural das fibras vagais, as quais expressam receptores para IL-1, por exemplo. O papel do

nervo vago na transmissão de informações da periferia ao SNC tem sido acessado por meio de experimentos que se valem da secção do nervo (vagotomia diafragmática). Desta forma, as vias vagais aferentes parecem mediar, ao menos parcialmente, o comportamento doentio induzido por LPS ou IL-1. Já a via humoral envolve a produção de interleucinas que podem atravessar a barreira hemato-encefálica e interagir com as células da microglia; envolve, também, a produção de mediadores inflamatórios por células endoteliais, em especial, a prostaglandina E2 (PGE2) (KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002). Esta via parece ser mais importante para mecanismos que regulam a febre e alterações endócrinas. Desta forma, Li et al. (1999) mostraram que animais COX1^{-/-} apresentam aumento de temperatura após a aplicação de LPS, fato este que não ocorria com os animais COX-2^{-/-}, reforçando a idéia de que as prostaglandinas sejam importantes mediadores para a regulação da temperatura durante o comportamento doentio.

2.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PBR - RECEPTORES BENZODIAZEPÍNICOS PERIFÉRICOS

Os receptores para benzodiazepínicos podem ser classificados em: Centrais (CBR) e Periféricos (PBR). Os CBRs (*Central Benzodiazepine Receptors*) foram descritos no SNC (BRAESTRUP; SQUIRES, 1977) e são parte do complexo receptor γ -aminobutírico (GABA_A) acoplado aos canais de cloreto, responsáveis pelos efeitos ansiolítico, sedativo, anticonvulsivante e relaxante muscular dos benzodiazepínicos (COSTA et al., 1975). Estes efeitos, associados à ampla margem de segurança do ponto de vista cardiovascular, fazem dos benzodiazepínicos

fármacos freqüentemente utilizados na terapêutica clínica (STIEFEL; BERNEY; MAZZOCATO, 1999).

Já os PBRs (*Peripheral Benzodiazepine Receptors*), foram descritos como um sítio de ligação para benzodiazepínicos encontrados na periferia (GAVISH et al., 1992). Até agora já foram descritas três subunidades em que este receptor é dividido: um sítio de ligação para isoquinolonas com uma massa molecular de 18kDa, um canal de anion voltagem dependente (VDAC) com 32 kDa e uma outra proteína carreadora de adenina, com 30 kDa (McENERY et al., 1992).

Pesquisas têm sido realizadas no sentido de melhor caracterizar este receptor. Desta forma, o cDNA de PBRs já foi clonado em algumas espécies como ratos, humanos, bovinos e camundongos (GAVISH et al., 1999). Já, a caracterização e clonagem do gene que expressa os PBRs têm sido estudadas em ratos (CASALOTTI et al., 1992) e em humanos (LIN et al., 1993). Essa caracterização permitiu aos autores inferir que o produto deste gene possui uma função de “housekeeping”, após a comparação de um número variável de genes de outras espécies com o gene humano. Desta forma, a comparação do gene humano que expressa PBR com os análogos de uma bactéria (*E. coli*) e de um fungo (*A. fulgidus*) do *GenBank*, mostrou que há uma significativa homologia entre eles (RIOND et al., 1991). Estes fatos indicam a relevância destes receptores nas diferentes espécies e, mais que isto, a sua conservação através da cadeia evolutiva.

Curiosamente, Corsi et al. (2004) mostraram, em estudos de binding, que uma espécie de batata, *Solanum tuberosum*, também possuía PBRs. Estes autores sugeriram, através da avaliação da localização preferencial de PBRs em tecido meristemático, que esta proteína estaria envolvida com o desenvolvimento do vegetal.

Por outro lado, e de grande relevância, mostrou-se que os PBRs devem estar envolvidos com importantes mecanismos ligados ao desenvolvimento fetal, já que animais de um modelo *knockout* para PBR morrem durante a fase embrionária (PAPADOPOULOS et al., 1997).

Já foram descritas substâncias endógenas que possuem alta afinidade pelos PBRs; dentre elas citam-se as porfirinas e o DBI, *Diazepam Binding Inhibitor* (ZAVALA, 1997). A importância destes ligantes endógenos ainda é pouco conhecida; mas, sabe-se, no entanto, que as porfirinas modulam diversas atividades enzimáticas (VERMA; NYE; SNYDER, 1987). A este respeito, a associação de altos níveis de PBR e de porfirinas em tecidos esteroideogênicos sugere um mecanismo fisiológico para este ligante endógeno (VERMA; SNYDER, 1988), o que de fato acontece (GARNIER et al., 1994).

O DBI foi inicialmente descrito como um peptídeo capaz de inibir a ligação do diazepam com seus receptores (CORDA et al., 1984), tendo sido descrito em vários órgãos como cérebro (FERRERO et al., 1986), adrenais e testículos (GRAY et al., 1986). Relatou-se que a sua expressão encontra-se aumentada em tecidos tumorais como astrocitoma e glioblastoma (ALHO et al., 1995). Garnier et al. (1994) verificaram, neste sentido, que células de Leydig R2C, quando tratadas com um *antisense* para DBI, produziam menores concentrações de progesterona; no entanto, quando tratadas com DBI, produziam concentrações maiores de progesterona, mostrando estes fatos que a presença de DBI é importante para os processos de esteroideogênese.

Já foram desenvolvidos ligantes sintéticos para os benzodiazepínicos; dentre os mais estudados estão: o 4'-chloro-diazepam (Ro5-4864), uma isoquinolona (PK 11195) e uma indolacetamida (FGIN-1-27) (ZIRESTER; WILLIAMS, 1997). Por meio

de estudos de binding, foram avaliadas as diferentes afinidades que os ligantes têm, pelos CBRs ou PBRs. Sabe-se, assim, que o Ro5-4864 liga-se com afinidade nanomolar aos PBR e com afinidade micromolar aos CBR. O PK 11195, embora estruturalmente diferente dos benzodiazepínicos, também possui alta afinidade pelos PBRs (ZIRESTER; WILLIAMS, 1997). Sabe-se, a este respeito, que as isoquinolonas que possuem afinidade por PBR interagem com a subunidade de 18 kDa deste receptor (PAPADOPOULOS et al., 1997) e que outros ligantes, como os benzodiazepínicos, interagem com as subunidades VDAC e de 18 kDa do PBR (SNYDER; MCENERY; VERMA, 1990). Estes ligantes podem vir a ser importantes ferramentas farmacológicas, e por isto mesmo, são utilizados para estudar e caracterizar as propriedades e funções específicas dos PBRs em células normais e cancerosas.

Dentre os benzodiazepínicos utilizados na terapêutica clínica, o clonazepam liga-se com alta afinidade aos CBR e com baixa afinidade aos PBRs (WEIZMAN; GAVISH, 1993) o diazepam e o midazolam são considerados agonistas mistos, pois possuem afinidade tanto por receptores centrais como para periféricos (DOBLE, 1999; WEIZMAN; GAVISH, 1993).

Por tudo quanto exposto, acredita-se, que os PBRs estejam envolvidos em uma série de processos fisiológicos e patológicos, pois foram conservados durante a cadeia evolutiva (CORSI et al., 2004; RIOND et al., 1991), estão distribuídos em diversos tecidos (BRIBES et al., 2004), possuem importante papel no desenvolvimento fetal (PAPADOPOULOS et al., 1997) e na fisiologia orgânica (GARNIER et al., 1994). Além disso, os PBRs possuem expressão diferenciada em tumores (GALIÈGUE et al., 2004; HAN et al., 2003, HARDWICK et al., 1999), em

doenças degenerativas (FERZAZ et al., 2002) e em processos de injúria e reperfusão tecidual (HAUET et al., 2002).

2.3 EFEITOS DOS BENZODIAZEPÍNICOS SOBRE PBR

2.3.1 Envolvimento dos PBRs com funções imunes

A noção do envolvimento dos PBRs com a modulação de respostas imunes centra-se, principalmente, na distribuição destes receptores por células do SI. Assim, estudos de *binding* têm mostrado que os PBRs estão expressos em diferentes quantidades (B_{max}) em células sanguíneas (monócitos = polimorfonucleares e neutrófilos > células B, T e NK > plaquetas > eritrócitos) (ZAVALA, 1997).

Além disso, os PBRs são expressos em uma grande variedade de órgãos endócrinos, como hipófise, córtex da adrenal, testículo, próstata, placenta, ovário, útero, glândula mamária e tireóide (DE SOUZA et al., 1985). Estes receptores estão envolvidos com o desenvolvimento da esteroidogênese em glândulas adrenais de ratos (ZILZ et al., 1999); neste sentido, os benzodiazepínicos, atuando nos PBRs presentes nas mitocôndrias das células das adrenais, aumentam a produção de glicocorticóides por facilitarem a passagem do colesterol através das membranas destas mitocôndrias (KRUEGER; PAPADOPOULOS, 1990; LACAPERE; PAPADOPOULOS, 2003).

Desta forma, experimentos têm demonstrado o envolvimento dos benzodiazepínicos com a função imune e com a produção de glicocorticóides *in vivo* (LAZZARINI; MALUCELLI; PALERMO-NETO, 2001; LAZZARINI; PAULINO; PALERMO-NETO, 1996; MASSOCO; PALERMO-NETO, 1999, 2003; RIGHI et al.,

1999). Este fato, no entanto, pode ser decorrente também de possíveis efeitos diretos de ligantes de PBRs sobre células do sistema imune (BESSLER et al., 1992, 1997).

Sabe-se que camundongos adultos tratados com Diazepam (1,5 mg/Kg) durante 7 dias e cujos macrófagos peritoneais foram ativados pelo oncoBCG, apresentaram tanto um aumento dos níveis séricos de corticosterona, como uma diminuição da atividade de macrófagos mensurada através da taxa de espraimento e de fagocitose, assim como da liberação de H_2O_2 por estas células (MASSOCO; PALERMO NETO, 1999). Estes resultados foram confirmados após o tratamento com o midazolam, visto que Massoco e Palermo Neto (2003) mostraram uma diminuição na porcentagem de fagocitose e do número de bactérias que foram fagocitadas por neutrófilos sanguíneos e por macrófagos peritoneais de eqüinos. Por outro lado, o diazepam administrado agudamente ou por 21 dias na dose de 10 mg/kg em ratos aumentou o *burst oxidativo* de neutrófilos sangüíneos, e diminuiu, quando administrado cronicamente, a porcentagem de fagocitose e o número de bactérias fagocitadas por neutrófilos sangüíneos (SILVA et al., 2003).

Lazzarini, Paulino e Palermo-Neto (1996), relataram que o tratamento agudo de ratos com altas doses de diazepam (10mg/kg) diminuiu, nos mesmos, o pico do edema inflamatório induzido pela aplicação de carragenina na pata. Posteriormente em modelo experimental de pleurisia, estes autores mostraram que este resultado se repete no mesmo sentido, pois animais tratados com diazepam 10 mg/kg que receberam carragenina na cavidade pleural, apresentaram menor volume de exsudato e número de leucócitos (LAZZARINI; MALUCELLI; PALERMO-NETO, 2001). Este efeito antiinflamatório foi, no entanto, revertido tanto pela adrenalectomia dos animais (LAZZARINI; MALUCELLI; PALERMO-NETO, 2001), como pelo pré-

tratamento com RU 486 (um antagonista de receptores para glicocorticóides) e com metirapona (adrenalectomia farmacológica) (LAZZARINI, 2003), evidenciando-se, desta forma, o papel dos glicocorticóides para este fenômeno.

Nesse sentido, estudos têm mostrado uma redução, mediada pelos benzodiazepínicos, da formação de IL-2 e de seus receptores, o que seria uma possível explicação para os efeitos inibitórios dos benzodiazepínicos sobre a proliferação induzida de linfócitos T e B (CHANG; CASTLE; NORMAN, 1991). Em outros trabalhos, mostrou-se que filhotes de ratas tratadas com benzodiazepínicos durante o terço final de sua gestação exibiam marcada diminuição da proliferação de linfócitos (SCHLUMPF et al., 1990) e de citocinas como TNF- α , IL-1, IL-2 e IL-6 (SCHREIBER et al., 1993). Tais alterações eram acompanhadas tanto por reduções do número de PBR em macrófagos esplênicos, como por alterações na afinidade de ligantes PBR em linfócitos esplênicos (SCHLUMPF; LICHTENSTEIGER; RAMSEIER, 1993). Também a formação de IL-1 e de IL-6 foi afetada pela administração de benzodiazepínicos, segundo estudos realizados por Zavala; Taupin e Descamps-Latscha (1990).

Schlumpf et al. (1990) observaram que o tratamento pré-natal com agonistas de PBR (diazepam, PK11195 e Ro5-4864), causou uma depressão da resposta imune pós-natal. Ramseier, Lichtensteiger e Schlumpf (1993) mostraram que um tratamento *in vitro* também diminui a proliferação de linfócitos T e B e Bessler et al. (1997) demonstraram *in vitro* que ligantes de PBR (diazepam, PK11195 e Ro5-4864) diminuem a atividade de células NK. Outros experimentos demonstraram que o tratamento de camundongos com ligantes de PBR (PK11195 e Ro5-4864) inibiu o edema de pata induzido por carragenina de maneira dose dependente, como demonstrado por Lazzarini, Malucelli e Palermo-Neto (2001) e também, que estes

tratamentos interferiram com níveis de IL-6 e IL-13 obtidas do lavado pleural em modelo de pleurisia de camundongos induzida por carragenina (TORRES et al., 2000). Assim, infere-se que os efeitos dos benzodiazepínicos sobre o sistema imunológico esteja embasados na existência e em uma ação em PBRs.

2.3.2 Envolvimento dos PBRs com o câncer

Além dos estudos acima descritos que relacionaram o uso de benzodiazepínicos com efeitos no SI, existem outros estudos que demonstram a preocupação em avaliar-se os efeitos destes fármacos em pacientes portadores de neoplasias. Desta forma, alguns pesquisadores têm realizado estudos epidemiológicos, do tipo caso-controle, buscando por correlações entre o uso de antidepressivos e de benzodiazepínicos com o risco de desenvolvimento de câncer (BEIDERBECK et al., 2003; DUBLIN et al., 2002). Neste sentido, vale lembrar que medicamentos da classe dos psicotrópicos são freqüentemente utilizados em pacientes com câncer, em especial para minorar casos de insônia, de ansiedade ou para facilitar procedimentos médicos (STIEFEL; BERNEY; MAZZOCATO, 1999).

Os PBR têm sido descritos também em células tumorais. Estudos têm demonstrado a existência desses receptores em células de tumor mamário humano BT-20, MDA-MB-435S e SK-BR-3 mantidas em cultura (BEINLICH et al., 1999). Hardwick et al. (1999) mostraram que as células do tumor de mama MDA-231 possuem maior densidade de PBRs, potencial invasivo e quimiotático, expressão de CD44 e de vimentina quando comparadas com as células do tumor de mama MCF-7. Posteriormente, em um outro estudo, estes mesmos autores verificaram a existência de duas populações distintas de células MDA-231 que expressavam

diferentes níveis de PBR e diferentes comportamentos *in vivo* e *in vitro* (HARDWICK et al., 2001). Os PBR parecem ter importante papel no desenvolvimento tumoral *in vivo*, pois quando estas duas populações de células MDA-231 (com o mesmo índice de proliferação celular em cultura) foram injetadas em camundongos *nude*, apenas a população com maior expressão do receptor PBR foi capaz de desenvolver nódulos tumorais nos animais (HARDWICK et al., 2001).

Estudos de imunoistoquímica mostraram que, se comparados com tecidos normais, uma maior densidade de PBR pode ser encontrada em tumores humanos como, por exemplo, no carcinoma de ovário (KATZ et al., 1990), em hepatocarcinoma celular (VENTURINI et al., 1998) e em astrocitomas (MIETTINEM et al., 1995). Além disso, estudos com amostras de tecidos humanos, correlacionaram positivamente a existência de uma maior expressão de PBR com o grau de malignidade de tumores hepáticos (VENTURINI et al., 1999), de gliomas (MIYAZAWA; HAMEL; DIKSIC, 1998) e de tumores colon-retais (MAASER et al., 2002) em todos os casos, avaliados histologicamente. Outros estudos em seres humanos correlacionaram positivamente a expressão de PBR com uma maior capacidade de invasão e de metástase de tumores de mama (HARDWICK et al., 1999), de cólon (MAASER et al., 2002) e de próstata (HAN et al., 2003). Já Galiègue et al. (2004) demonstraram que um subgrupo de pacientes portadores de tumores de mama (sem hiperplasia de linfonodo), que apresentava maior marcação para PBR, obteve uma menor sobrevida. Sugere-se, então, que a maior marcação de PBR possa ser usada para identificar os casos de tumores de mama com risco mais elevado em pacientes que possuem clinicamente um fator considerado de bom prognóstico (ausência de hiperplasia de linfonodo).

Por outro lado, estudos atuais têm mostrado, e de forma mais clara, que o significado da maior expressão destes receptores em tecidos tumorais é específica para cada tipo de tumor (HAN et al., 2003), não sendo possível fazer generalizações. Desta forma, há que se considerar o tecido e o tumor a ser estudado. De fato e exemplificando a complexidade do assunto, fibrossarcomas (KLETSAS et al., 2004) e tumores de pele (HAN et al., 2003) possuem menor expressão de PBRs quando comparados com seus respectivos tecidos normais.

Além dos estudos acima descritos que indicam ser os PBRs marcadores de malignidade e, portanto do prognóstico de alguns tumores, outros estudos têm sido realizados na tentativa de compreender os efeitos de benzodiazepínicos sobre o comportamento de células tumorais. Alguns estudos *in vitro* com anestésicos não voláteis, mas que se ligam aos PBR, como o propofol, etomidato e lidocaína mostraram que estes fármacos podem modificar o comportamento de células tumorais de mama MDA-231 (GARIB et al., 2002). Estudos *in vitro* como de Carmel et al. (1999) verificaram que ligantes de PBR (PK11195 e Ro5-4864) inibiram a proliferação de células de um tumor mamário humano (MCF-7) em até 50% quando usado nas concentrações de 7 μ M e 70 μ M. Beinlich et al. (2000) demonstraram que ligantes de PBR como o diazepam, o PK11195 e o Ro5-4864 foram capazes de interferir de maneira diferente com a proliferação celular de tumor mamário humano BT-20: baixas doses (1nM) causando um aumento de proliferação e altas doses (1mM) levando a uma diminuição desta proliferação. Landau et al. (1999) relataram que os ligantes diazepam, PK11195 e Ro5-4864, em doses micromolares, diminuíram a porcentagem de células em fase de síntese no melanoma B16 e também que estas células, apresentavam-se mais diferenciadas quando avaliadas por critérios morfológicos e funcionais.

Atualmente, alguns estudos que envolvem os ligantes de PBR e a proliferação tumoral buscam o entendimento das vias de sinalização e de transdução dos sinais dentro da célula tumoral, tentando melhor compreender a sua importância para eventos moleculares ligados à progressão tumoral (KLETSAS et al., 2004; SUTTER et al., 2003).

A ampla distribuição destes receptores no organismo e, de maneira tão diferenciada, em tumores explica por si só a importância de estudos possam trazer alguma contribuição para a compreensão dos complexos papéis fisio-patológicos dos PBRs e, e até mesmo do envolvimento dos mesmos como possíveis alvos terapêuticos.

2.4 IMUNOLOGIA TUMORAL

Um fator importante para determinar a progressão das células neoplásicas é a resposta imune do hospedeiro. Por volta do início do século, Paul Ehrlich já reconhecia o potencial das interações entre o SI e as células neoplásicas, imputando falhas deste sistema como responsáveis pelo desenvolvimento das neoplasias (COTRAN et al., 1999).

Mais tarde, seguindo a mesma linha de raciocínio, Thomas e Burnet, criaram a teoria da vigilância imunológica (ABBAS et al., 2000). Essa teoria postula que células neoplásicas surgem, no organismo, com alguma frequência. No entanto, por representarem elementos estranhos, seriam reconhecidas e destruídas pelo SI. Nesta teoria os linfócitos T (helper e citotóxicos), linfócitos B, células NK e macrófagos são considerados como células efetoras da vigilância contra tumores (ABBAS et al., 2000).

Embora em muitos casos a imunovigilância seja ineficaz - visto que indivíduos imunocompetentes manifestam cânceres - a presença de infiltrados leucocitários em alguns tumores, como melanoma e colo-retais estão associados a um melhor prognóstico (CLEMENTE et al. 1996, TOOMEY et al., 1999); por outro lado, nos de mama, estão associados a um pior prognóstico (VGENOPOULOU et al., 2003). Lewis et al. (2000) relataram ser o aumento da expressão do fator do crescimento endotelial vascular (VEGF), um mecanismo promotor de angiogênese, relacionado ao macrófago infiltrante de áreas pouco vascularizadas de carcinomas mamários.

Ainda, no relacionado à atividade de macrófagos e mecanismos efetores antitumorais, estas células além de desempenharem um papel importante para o início da resposta imune específica, possuem atividade citotóxica (DONG; O'BRIAN; FIDLER, 1993; JIANG et al., 1992) e citolítica (ADAMS et al., 1980; SOMMERS; MASTIN; ADAMS, 1983) contra células tumorais. Sabe-se, também, que o óxido nítrico (NO) liberado por macrófagos constitui um dos mais importantes mecanismos de ação tumoricida destas células (KLIMP et al., 2003; SOTOMAYOR et al., 1995).

Experimentos utilizando antagonistas do fator ativador de plaquetas (PAF), o BN-52021, mostraram inibição de 33,1% até 80,8% do crescimento do TAE *in vivo*, de maneira dose dependente. Esta inibição não ocorreu nos experimentos realizados *in vitro*. Ao mesmo tempo, observou-se maior ativação de macrófagos peritoneais dos animais tratados com o BN-52021, já que estes apresentaram maior capacidade de espraiamento e de liberação de peróxido de hidrogênio (FECCHIO et al., 1990a).

A função antitumoral do SI pode acontecer, também, através da interação direta dos linfócitos T citotóxicos CD8+ com as células tumorais. Porém, essa

interação específica apenas se faz presente se as células tumorais, além de expressarem antígenos tumorais, expressarem ainda, antígenos de histocompatibilidade de classe I (BODMER et al., 1993; GARRIDO et al., 1993). Além do papel de linfócitos citotóxicos na resposta antitumoral, o linfócito T helper, desempenha uma série de atividades contra células tumorais, através do reconhecimento de antígenos tumorais e antígenos de classe II do MHC, apresentados por células apresentadoras de antígenos (APC), ou até mesmo pelas próprias células tumorais (ALEXANDER; BENNICELLI; GUERRY, 1989; BEVAN, 1987). Por outro lado, há evidências mostrando que as células NK destroem apenas as células tumorais que não expressam MHC classe I (MORETTA et al., 2003). Sabe-se que as células NK possuem a capacidade de lisar células tumorais, na ausência de estímulo prévio e constituem um importante mecanismo anti-tumoral do SI (MORETTA et al., 2003).

Sabe-se serem os linfócitos importantes elementos para uma efetiva resposta imunológica contra o TAE. De fato, animais portadores de maior atividade de linfócitos avaliada pela liberação de citocinas (TNF- α , IFN- γ e IL-1) e uma maior porcentagem de linfócitos, como de linfócitos T helper, T citotóxicos e B, apresentaram um menor crescimento tumoral (MONDAL et al., 2002).

Há que se considerar, ainda, que as células tumorais dispõem de mecanismos de escape, onde são produzidas substâncias inibidoras da atividade dos macrófagos. Dentre os fatores produzidos por células tumorais, capazes de alterar funcionalmente os macrófagos, podemos citar o *macrophage deactivating factor* (MDF) e o TGF- β (ELGERT; ALLEVA; MULLINS, 1998; TSUNAWAKI; SPORN; NATHAN, 1989). Estes fatores produzidos por células tumorais são

capazes de inibir a produção de NO por macrófagos (DING et al., 1990) e de superóxido (TSUNAWAKI; NATHAN, 1986) por macrófagos.

Uma vez que a reação inflamatória gera uma série de fatores de crescimento, citocinas e mecanismos potencialmente citotóxicos, sua ocorrência no local do aparecimento/ desenvolvimento de tumores deve ter um papel relevante na evolução destes. Tal hipótese é confirmada por uma série de observações clínicas e experimentais, que mostraram ser a reação inflamatória capaz de ora inibir, ora estimular o desenvolvimento tumoral (CARLOMAGNO et al., 1995; RILKE et al., 1991).

Um novo e grande avanço no campo de estudo da cancerologia ocorreu após o surgimento da Oncologia Experimental, um ramo da Oncologia Comparada, cuja existência se deve à introdução dos chamados tumores transplantáveis ou transmissíveis. Estes tumores provenientes de animais são mantidos em laboratório pelo transplante das células tumorais para hospedeiros susceptíveis. Os tumores transplantáveis são reconhecidos como ferramentas úteis em cancerologia, e têm sido utilizados, por exemplo, em estudos sobre a ação de componentes físicos, químicos e biológicos, entre outros, sobre seu crescimento, patogênese, estudos de citogenética, imunologia, comportamento, bioquímica e terapêutica das células tumorais.

Em 1896, Paul Ehrlich introduziu na pesquisa científica um tumor experimental, descrevendo-o como uma neoplasia mal diferenciada, transplantável, originária de adenocarcinoma mamário espontâneo de camundongas, transplantada entre animais desta espécie, inicialmente, em sua forma sólida. O Tumor de Ehrlich foi convertido para a forma ascítica por Loewenthal e Jahn (1932) através da

passagem seriada de fluido ascítico de animais inoculados intraperitonealmente com células deste tumor.

Dos inúmeros tumores experimentais utilizados para estudos *in vivo* em diversos animais, o uso do TAE, tem sido uma ferramenta muito útil, pelas seguintes razões: facilidade na padronização do número de células a serem inoculadas, facilidade de quantificação do crescimento ou da regressão da massa tumoral e, também, por tornar possível – quando do estudo das células tumorais - os mesmos métodos desenvolvidos para a pesquisa de células da corrente sangüínea e demais fluidos orgânicos.

O TAE possui capacidade de crescimento em qualquer linhagem de camundongos; provoca uma reação inflamatória no local de sua inoculação, alterando padrões de migração celular e de exsudação, além de estimular/ativar macrófagos inflamatórios (GUERRA, 1983).

Desta forma, torna-se claro a existência de diversos mecanismos imunológicos com potencial para influenciar o desenvolvimento de neoplasias. Entretanto, devido à complexidade das interações entre os diversos componentes do sistema imune e as células neoplásicas, não tem sido fácil identificar com precisão os mecanismos que estão ativos em uma determinada situação, bem como estabelecer uma hierarquia precisa dos diversos componentes da resposta imune frente aos tumores. Mesmo assim, os trabalhos continuam nesta busca e têm sido obtidos interessantes resultados.

Em vista de tudo quanto exposto, propõe-se estudar as interações entre imunidade celular, desenvolvimento do TAE, PBRs e tratamento com Diazepam.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito da administração de Diazepam sobre a imunidade celular de animais portadores do TAE, bem como os efeitos deste tratamento sobre o crescimento do tumor.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Estudar os efeitos de um tratamento por 7 dias com 3,0 mg/kg de diazepam sobre o crescimento e sobre o ciclo celular do TAE.
- b. Estudar os efeitos de um tratamento por 2 dias com 3,0 mg/kg de diazepam sobre a migração e atividade de macrófagos peritoneais, avaliados 24 horas após a inoculação do TAE, por meio das técnicas de espiamento e de fagocitose, produção de H_2O_2 e NO.
- c. Estudar os efeitos de um tratamento por 2 e 7 dias com 3,0 mg/kg de diazepam sobre a porcentagem de linfócitos B e T (helper e citotóxicos) provenientes de animais portadores do TAE.
- d. Estudar os efeitos de um tratamento por 3 dias com 3,0 mg/kg de diazepam sobre a atividade citotóxica de células NK provenientes de animais portadores do TAE.

- e. Investigar a presença de PBRs em células do TAE em animais tratados ou não com 3,0 mg/kg de diazepam por 7 dias.
- f. Estudar os efeitos de um tratamento *in vitro* com diazepam (100nM, 300nM, 600nM e 1µM) e Ro5-4864 (100nM, 300nM, 600nM e 1µM) sobre o ciclo celular do TAE.
- g. Estudar os efeitos de um tratamento prolongado por 7 dias com 0,3 mg/kg e 1mg/kg de diazepam sobre o crescimento do TAE.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos *SWISS* com peso corporal variando entre 30 a 45g no início dos experimentos, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Os animais foram utilizados em conformidade com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório da FMVZ-USP, protocolo 160/2002. Durante todo o experimento os animais permaneceram em sala com temperatura e umidade mantidas aproximadamente constantes (temperatura entre 22-25°C e umidade relativa de 65 a 70%) através de aeração, exaustão e ventilação controladas. A iluminação da sala foi mantida em um ciclo de noite/dia de 12h, sendo a fase clara iniciada às 7:00 horas. Os animais foram alimentados com ração balanceada para roedores NUTRILABOR GUABI® e água, fornecidas *ad libitum*. Os camundongos foram mantidos nestas condições por um período de adaptação de no mínimo 7 dias antes do início de cada experimento. Neste período, todos os animais foram manuseados a cada 2 dias, a fim de evitar-se a ocorrência de possíveis situações estressantes decorrentes do manuseio durante a fase experimental. Ao final desse período, todos os camundongos foram pesados para controle de peso e para o cálculo da quantidade de fármacos a ser administrada, sendo esta reajustada a cada três dias.

4.2 DROGAS E REAGENTES

- **Albumina Sérica bovina (GIBCO)** – utilizada na solução de diluição do anti-PBR
- **Anti IgG FITC (Santa Cruz Biotechnology, CA. USA)** – anticorpo secundário conjugado a fluorocromo, utilizado para quantificação de PBR
- **Anticorpos conjugados a FITC anti CD3, anti-CD4 e conjugados a PE anti CD4, anti-CD8, anti-CD19 (Pharmingen - BD)** – utilizados para marcação dos linfócitos esplênicos
- **Anti-PBR (Santa Cruz Biotechnology, CA. USA)** – anticorpo primário policlonal, utilizado para imunoistoquímica e citometria de fluxo para PBR
- **Azul de Tripán 0,4% (GIBCO)** – corante utilizado para contagem de células e determinação de viabilidade celular
- **Compaz® (Cristália do Brasil S/A)** – Diazepam, utilizado para os experimentos *in vivo*
- **Diaminobenzidina (Sigma, St Louis, MO)** - utilizada na revelação de imunoistoquímica
- **Diazepam (pó)** - utilizado para os experimentos *in vitro*
- **Ficoll-Paque (Amersham-biosciences)** – gradiente de concentração para separação de linfócitos
- **Fungizone (GIBCO)** – antifúngico a base de anfotericina B para meio de cultura celular
- **Hepes (GIBCO)** – tampão para meio de cultura celular
- **Hidróxido de Sódio (Merck)** – utilizado para parar a reação de produção de peróxido de hidrogênio
- **Iodeto de Propídeo (Sigma, St Louis, MO)** – Utilizado para avaliação de ciclo celular e avaliação da viabilidade de células YAC-1 na técnica de citotoxicidade NK
- **Kit LSAB (DAKO)** - reagente que contém anticorpo secundário e complexo streptoavidina-biotina
- **Liquemine® 25.0000UI/ 5ml (Roche)** – anticoagulante à base de heparina para coleta de sangue

- **LPS – cepa 055:b5 (Sigma, St Louis, MO)** – utilizado como estímulo à produção de NO
 - **Nitrito de Sódio (Synth)** - utilizado como curva padrão para quantificação de NO
 - **Penicilina/estreptomicina (GIBCO)** – antibiótico para meio de cultura celular
 - **Peróxido de Hidrogênio 30% (Merck)** – utilizado como curva padrão para quantificação de peróxido de hidrogênio e para bloqueio de peroxidase na técnica de imunoistoquímica
 - **PMA – Miristato-acetato de forbol (Sigma, St Louis, MO)** – utilizado para desencadear a produção de peróxido de hidrogênio.
 - **Reagente de Griess (Sulfanilamida 50% e etilenodiamina 50% - Synth)** – utilizado para a quantificação de NO
 - **Ringer Simples (Sanobiol)** – utilizado para diluir o veículo do diazepam
 - **RNase (Invitrogen)** – utilizada para degradar RNA na técnica de ciclo celular
 - **Ro 5-4864 ou 4'-chloro-diazepam (Sigma, St Louis, MO)** – utilizado para os experimentos *in vitro*
 - **RPMI 1641 (GIBCO)** – meio de cultura celular
 - **Saponina (SERVA)** - utilizada na solução de diluição do anti-PBR
 - **Soro Fetal Bovino (GIBCO)** – utilizado para enriquecer o meio de cultura
 - **Tris (GIBCO)** – tampão utilizado para lavar lâminas da reação de imunoistoquímica e para a solução de lise de hemácias
 - **Veículo Compaz® (Cristália do Brasil S/A)** – Veículo a ser diluído, utilizado para os experimentos *in vivo*
 - **Zymosan-A (Sigma, St Louis, MO)** – produto à base de *Saccharomyces cerevisiae*. Utilizado para avaliar atividade fagocítica por macrófagos.
-
- **Glutaraldeído (Nuclear®)**

Glutaraldeído 25%	2ml
PBS (cultura celular)	98ml
-
- **Metacarn**

Metanol	60%
Clorofórmio	30%
Acido acético	10%

- **PBS (salina tamponada com fosfato) – solução estoque 10x concentrada. Utilizada para cultura celular**

$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	(Sigma)	26,79g
$\text{Na}_2\text{PO}_4 \text{H}_2\text{O}$	(Sigma)	4,14g
NaCl	(Sigma)	82,0g
H_2O mili-Q		1000ml

Para uso, esta solução foi diluída 1:10 em H_2O mili-Q, mantendo-se um pH = 7,2 a 7,4.

- **PBS (salina tamponada com fosfato) – solução estoque 20x concentrada. Utilizada para reações de imunoistoquímica**

NaCl	(Sigma)	80,0g
Na_2HPO_4	(Sigma)	13,65g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \text{H}_2\text{O}$	(Sigma)	4,14g
H_2O destilada qsp		500ml

Para uso, esta solução foi diluída 1:20 em H_2O mili-Q, mantendo-se um pH = 7,2 a 7,4.

- **Solução de lise (cloreto de amônio)**

Solução Cloreto de amônio 0,16M:

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

Solução Tris 0,17M (pH 7,5):

Tris	20,5g/l
H_2O mili-Q	1000ml

Para uso misturar 9 partes da solução cloreto de amônio e 1 parte de solução Tris.

- **Solução de vermelho de fenol – utilizada no experimento para quantificação de H_2O_2**

Peroxidase	(Sigma)	0,1ml
Solução de fenol 0,5%	(Sigma)	0,2ml
Glicose 10%	(Sigma)	0,1ml
Solução A		0,8ml

Solução B		0,1ml	
Solução C		0,1ml	
H ₂ O mili-Q		8,6ml	
<u>Solução A:</u>	NaCl	(Sigma)	80,0g
	KCl	(Sigma)	2,0g
	KH ₂ PO ₄	(Sigma)	2,0g
	Na ₂ PO ₄ .7H ₂ O	(Sigma)	21,5g
	H ₂ O mili-Q		800ml
<u>Solução B:</u>	CaCl ₂	(Sigma)	1,3g
	H ₂ O mili-Q		100,0ml
<u>Solução C:</u>	MgCl ₂ .6H ₂ O	(Sigma)	2,1g
	H ₂ O mili-Q		100,0ml

➤ **Tampão Citrato pH 6,0 - utilizada na reação de imunoistoquímica**

Ac Cítrico	1,68g
H ₂ O destilada	1000ml
Acertar pH com NaOH 1N	

➤ **Tampão Tris HCl pH 7,6 - utilizada na reação de imunoistoquímica**

Tris	3,1g
NaCl	40g
H ₂ O destilada	5000ml
Acertar pH com HCl 1N	

➤ **Zymosan-A**

O zymosan-A foi pesado numa proporção de 20mg para cada 1ml de PBS. Esta mistura foi fervida sob agitação durante 1 hora. A suspensão foi então lavada com PBS por 5 vezes a 2000rpm, sendo sua concentração final ajustada para 50mg/ml de PBS. Este material biológico foi utilizado como fonte de partículas a serem fagocitadas por macrófagos peritoneais.

4.3 TRATAMENTO

Utilizou-se o diazepam (3,0 mg/kg), um ligante de receptores benzodiazepínicos centrais e periféricos. Foi, também, utilizado como seu controle o veículo deste fármaco (0,1 ml/ 10 g) diluído em ringer simples (solução a 20%). Os tratamentos foram feitos por 2 dias (Experimento 2 e 3), 3 dias (Experimento 4) ou 7 dias (Experimento 1, 3, e 5) consecutivos, sempre na dose de 3,0 mg/kg. Já para o experimento 7, as doses de 0,3mg/kg e 1,0 mg/kg foram utilizadas por 7 dias. A administração, para todos os experimentos, foi realizada por via oral, feita uma vez ao dia, sempre no mesmo horário.

Justifica-se a escolha da dose empregada de diazepam pelo fato de ser ela próxima àquela considerada como ansiolítica no ser humano, isto é, de 1 a 2 mg/kg. Ainda, em experimentos anteriores realizados em nossos laboratórios mostrou-se que a dose de 1,5 mg/kg de diazepam foi capaz de interferir tanto com a atividade de macrófagos ativados pelo OncoBCG (MASSOCO; PALERMO NETO, 1999) e com a resistência de hamsters ao *M. bovis* (RIGHI et al., 1999; UGAZ; PALERMO NETO, 1999). Optou-se por um tratamento por 7 dias, por ser este o tempo constatado como necessário para o desenvolvimento e crescimento do TAE (KLEEB, 1997). Para os experimentos que envolveram a análise de atividade de macrófagos, optou-se por tratar os animais por 2 dias, já que este é o tempo necessário para que o TAE cause ativação/migração de macrófagos peritoneais (GUERRA, 1983; KLEEB, 1997).

4.4 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DE CÉLULAS DO TUMOR DE EHRLICH

Após a eutanásia em câmara de CO₂ de um camundongo doador portador do TAE com 7 dias de evolução, procedeu-se à colheita do fluido ascítico. Esta suspensão de células foi centrifugada a 1000 rpm, 5 minutos e ressuspensa por três vezes em PBS. Realizou-se, então, contagem e avaliação de viabilidade das células tumorais assim obtidas utilizando a câmara de Neubauer (diluição 1:200 em azul de tripan).

Foi padronizado para uso um total de $1,25 \times 10^7$ células tumorais por ml de PBS com no mínimo 90% de viabilidade. Para a análise do crescimento do TAE ou para os experimentos que avaliaram parâmetros da resposta imune, 0,4 ml da suspensão de células tumorais foi inoculada ($5,0 \times 10^6$ células tumorais), no peritônio de cada camundongo.

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

4.5 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DO TUMOR DE EHRLICH

Para avaliação do crescimento do TAE os camundongos foram sacrificados em anestesia profunda através de câmara de CO₂, ao final de 7 dias da inoculação do tumor. Desses animais foi coletado o líquido ascítico total, para mensuração do volume, da concentração e do número de células tumorais presentes o que foi feito de acordo com o proposto por Dagli (1989).

4.6 COLETA E CONTAGEM DE CÉLULAS DO LAVADO PERITONEAL

Utilizando o TAE como estímulo, a coleta do lavado peritoneal (para as técnicas que avaliam atividade de macrófagos) foi realizada vinte e quatro horas após a inoculação do tumor. Para tanto, após a eutanásia em câmara de CO₂, 5 ml de PBS estéril, a 4° C, foram injetados na cavidade abdominal de cada camundongo. Após realização de massagem vigorosa da cavidade, o lavado resultante foi aspirado e colocado em tubos de polipropileno estéreis.

As células do lavado peritoneal obtidas foram diluídas em azul de tripan (diluição 1:10) sendo contadas em câmara de Neubauer. O número de células foi ajustado para uma concentração de 2×10^6 por ml de solução (RPMI ou vermelho de fenol, dependendo da técnica a ser realizada), com no mínimo 90% de viabilidade.

4.7 TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO MACROFÁGICA:

4.7.1 Determinação da Produção de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

A liberação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por células peritoneais foi determinada segundo o método descrito por Pick e Keisari (1980), adaptado para microensaio por Pick e Mizel (1981) e modificado por Russo et al. (1989).

Após colheita do lavado peritoneal, as células foram ajustadas a $2,0 \times 10^6$ células/ml em solução de vermelho fenol. *Plaqueou-se* 100 µl de cada amostra (quadruplicata) em placas de poliestireno com 96 poços, a 37°C e 5% de CO₂ por 1 hora. Foi avaliada a liberação de H₂O₂, espontânea e induzida por PMA, adicionando-se 10 µl de uma solução de 10 ng/ml de miristato-acetato de forbol

(PMA), por poço. Após a incubação todos os poços receberam 10µl de NaOH 1N para interromper a reação.

A oxidação do vermelho de fenol dependente de H_2O_2 foi mensurada em leitor de Elisa com um comprimento de onda de 620nm. Os resultados foram obtidos em densidade óptica (D.O.) e convertidos para nmoles mediante uma equação de correlação e regressão linear baseada na curva padrão. Os resultados foram então expressos em nmol/ $2,0 \times 10^5$ células.

4.7.2 Determinação da Produção de Óxido Nítrico (NO)

A produção de NO foi determinada após a conversão de nitrato em nitrito e a mensuração deste pelo reagente de Griess, como descrito por Ding; Nathan; Stuehr (1988). Esta técnica consiste na determinação indireta do NO, dosando seu metabólito NO_2^- que é uma molécula estável nas condições em que foram realizados os experimentos.

Macrófagos peritoneais coletados como descrito no item 4.5, foram ajustados a uma concentração $2,0 \times 10^6$ células/ml de meio RPMI (suplementado com HEPES 10mM, $NaHCO_3$ 24mM, 10 U/ml de penicilina 10 µg/ml de estreptomicina, 0,5 U/ml de anfotericina B) enriquecido com 5% soro fetal bovino (SFB) estéril. Desta suspensão *plaqueou-se* 100 µl de células (quadruplicata) em placas de poliestireno com 96 poços, a 37°C e 5% de CO_2 por 48 horas. Para avaliação da produção de NO estimulada, foi plaqueado LPS (10 ng/ml). Após esse período, uma nova placa recebeu na primeira coluna apenas 50µl de meio (Blank) para calibração, recebendo na segunda e terceira colunas, em quadruplicatas, 50 µl de soluções de concentrações conhecidas de nitritos (0.5, 1.0, 3.0 e 6.0 nM) respectivamente, sendo

estas utilizadas para construção de uma curva padrão. As colunas subsequentes foram então preenchidas com 50µl do sobrenadante das amostras incubadas. Todas as colunas receberam, então, 50 µl do reagente de Griess por poço.

A leitura foi realizada em um leitor de ELISA, utilizando-se um comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram obtidos em densidade óptica (D.O.) e convertidos para micromoles de NO_2^- mediante uma equação de correlação e regressão linear baseada na curva padrão. Os resultados foram então expressos em $\text{nmol}/2,0 \times 10^5$ células.

4.7.3 Avaliação do espraçamento e da fagocitose realizado por macrófagos peritoneais

A técnica utilizada para avaliar o espraçamento de macrófagos da cavidade peritoneal foi descrita por Rabinovitch e DeStefano (1973) e adaptada por Pasetti (1993).

Após a colheita do lavado peritoneal, 400 µl de uma suspensão de $2,0 \times 10^6$ células/ml foi *aliquotada* em uma placa com 24 poços contendo uma lamínula de vidro e deixadas à temperatura ambiente por 20 minutos. As lamínulas foram, em seguida lavadas com PBS a 4°C e recobertas com meio de cultura RPMI (suplementado com HEPES 10mM, NaHCO_3 24mM, 10 U/ml de penicilina 10 µg/ml de estreptomicina, 0,5 Ug/ml de anfotericina B) enriquecido com 5 % SFB estéril. As placas foram fechadas e incubadas em estufa 37° C, 5% de CO_2 por 1h para que ocorresse a o espraçamento e a fagocitose das partículas de zymosan pelos macrófagos aderidos à lamínula (antes de ir para a estufa, os poços destinados à avaliação da fagocitose receberam 6 µl de zymozan). Após este período, as

lamínulas foram lavadas com PBS, por 10 minutos. Por fim, acrescentou-se solução glutaraldeído a 0,5% em PBS por 10 minutos às lamínulas e para armazenamento das placas em geladeira 1 ml de água destilada por poço foi adicionado aos poços.

As lamínulas foram analisadas em microscópio óptico de contraste de fases (Nikon®) para visualização e contagem das células. As fórmulas utilizadas para calcular os índices de espraçamento e fagocitose em porcentagem foram:

$$\text{Índice de espraçamento} = \frac{\text{número de células espraçadas} \times 100}{200 \text{ células aderidas}}$$

$$\text{Índice de fagocitose} = \frac{\text{número de células que fagocitaram} \times 100}{200 \text{ células aderidas}}$$

4.8 CITÔMETRO DE FLUXO

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

As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades de FSC – Foward Scatter e SSC - Side Scatter que avaliam o tamanho e a complexidade interna, respectivamente. As fluorescências foram adquiridas em escala logarítmica para a avaliação de moléculas de superfície celular e

citotoxicidade de células NK e em escala linear para avaliação do ciclo celular. A fluorescência do CFSE e FITC foi detectada pelo leitor FL-1 ($530\pm 30\text{nm}$), a do PE e Iodeto de Propídeo (ciclo celular) foi detectada pelo leitor FL-2 ($585\pm 42\text{nm}$), a do Iodeto de Propídeo (citotoxicidade NK) foi detectada pelo leitor FL-3 (670nm).

Foram analisadas através do Cell Quest Pro[®] as populações de interesse em cada experimento (linfócitos, células tumorais YAC-1 ou células do tumor de Ehrlich) por meio dos gates, excluindo assim outros tipos celulares das amostras. Além disso, para todos os experimentos o aparelho foi calibrado com um tubo *branco* como controle de refração basal da célula a ser analisada.

4.9 AVALIAÇÃO DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE CELULAR

Para avaliação das moléculas de superfície celular, o baço foi coletado e macerado em solução de meio RPMI (suplementado com HEPES 10mM, NaHCO_3 24mM, 10 U/ml de penicilina 10 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de anfotericina B) enriquecido com 5 % SFB estéril. As células foram diluídas em Azul de Tripan (diluição 1:10) e contadas em Câmara de Neubauer, sendo ajustadas a uma concentração de 1×10^6 células/tubo em um volume de 100 μl .

Foram empregados os seguintes anticorpos monoclonais conjugados à fluoresceína ou ficoeritrina: anti-CD3 para detectar linfócitos T; anti-CD4 para linfócitos TCD4+ e alguns macrófagos ativados; anti-CD8 para detectar linfócitos TCD8+ e anti-CD19 para detectar linfócitos B. As amostras foram incubadas no escuro, a temperatura ambiente, durante 1 hora com os diferentes anticorpos. Após este período, foram centrifugadas e ressuspensas em 1 ml de PBS para avaliação no citômetro de fluxo (FACScan Becton Dycson[®]).

A análise foi realizada por meio do Cell Quest Pro[®]. As células que estavam marcadas duplamente pelo anti-CD3 e anti-CD4 foram consideradas como linfócitos T helper, as marcadas pelo anti-CD8 como linfócitos T citotóxicos e as marcadas pelo anti-CD19 como linfócitos B. Os resultados foram expressos em porcentagem de células, calculada através do número de linfócitos fluorescentes dividido pelo número total destas células x 100.

4.10 SEPARAÇÃO E OBTENÇÃO DOS LINFÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO

Os linfócitos foram obtidos do sangue de animais tratados ou não, coletados da veia cava caudal por meio de seringas estéreis de 1 ml com 0,1 ml de heparina sódica (Liquemine[®] 25.000 UI/5ml). O sangue foi então diluído em PBS estéril numa proporção de 1:1. Para separação dos linfócitos sanguíneos foi utilizado o reagente Ficoll-Paque (Amersham Biosciences), que separa linfócitos por gradientes de concentração. O Ficoll (à temperatura ambiente) foi adicionado a tubos falcon e o sangue + PBS foi adicionado aos tubos com ficoll vagarosamente pela parede numa proporção de sangue+PBS para ficoll de 2:1. Estes tubos foram centrifugados por 30 minutos, a 18°C, 2100rpm, com “break lento”. A camada de linfócitos é retirada vagarosamente e colocada em outro tubo falcon, sendo que para cada grupo foi feito um pool de linfócitos. Estas células foram lavadas por 3 vezes em meio RPMI (suplementado com HEPES 10mM, NaHCO₃ 24mM, 10 U/ml de penicilina 10 µg/ml de estreptomicina, 0,5 Ug/ml de anfotericina B) enriquecido com 10 % SFB estéril, a 1200rpm, 8 minutos e então contadas em câmara de Neubauer para ajuste do número de células para $2,5 \times 10^6$ céls/ml.

4.11 CULTURA E MARCAÇÃO DE CÉLULAS ALVO YAC-1

A linhagem celular YAC-1, é sensível à atividade citotóxica das células NK e foi utilizada como população alvo. Estas células foram descongeladas de 3 a 5 dias antes do ensaio e mantidas em cultura em meio RPMI (suplementado com HEPES 10mM, NaHCO_3 24mM, 10 U/ml de penicilina 10 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina, 0,5 Ug/ml de anfotericina B) enriquecido com 10% SFB estéril em concentração de aproximadamente 1×10^6 células /ml.

No dia do ensaio, 1×10^6 células alvo em 1 ml de RPMI foram incubadas com 1 μl do fluorocromo CFDA-SE (5mM), durante 20 minutos em estufa de cultura de células a 37°C e 5% de CO_2 . Após incubação, as células alvo foram centrifugadas e ressuspensas em RPMI 10% SFB. Estas células foram então contadas em câmara de Neubauer para ajuste do número de células para uma concentração de 5×10^4 céls/ml.

4.12 ATIVIDADE DE CÉLULAS NATURAL KILLER – CITOMETRIA DE FLUXO

Para a determinação da atividade citotóxica das células NK foi utilizado o método proposto por Marcusson-Stahl e Cederbrant (2003). Nesta técnica, foram utilizados 2 fluorocromos: o 5-(6)-carboxy-fluorescein succinimidyl ester (CFDA-SE), um corante fluorescente que se conjuga a enzimas citoplasmáticas (fluorescência verde), e o iodeto de propídeo que se intercala no DNA de células com membranas comprometidas (fluorescência vermelha). Dois tipos celulares são necessários para este ensaio: linfócitos e células YAC-1. Os linfócitos são considerados como células efectoras do ensaio e a linhagem celular YAC-1 é considerada como célula alvo.

Para avaliação da porcentagem de células alvo mortas pela citotoxicidade de NK, foram incubados 100 µl células efetoras e 100 µl de células alvo ou $2,5 \times 10^5$ células efetoras para 5×10^3 células alvo marcadas com CFSE (proporção de E:A = 50:1), durante 20 horas em placas de poliestireno com 96 poços, a 37°C e 5% de CO₂. Para avaliação da porcentagem de mortalidade espontânea de células alvo, 100 µl de células alvo marcadas com CFSE foram incubadas pelas mesmas 20 horas. Para identificação das células inviáveis, foi adicionado a todas as amostras o 50 µl do corante iodeto de propídeo (50 µg/ml de PBS) 5 minutos antes da leitura em Citômetro de Fluxo (FACScan Becton Dycson). Desta forma, foi possível identificar uma subpopulação duplo positiva, fluorescente em verde e vermelho que foi considerada como a população de células YAC-1 inviáveis. O resultado foi expresso porcentagem de citotoxicidade conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Citotoxicidade (\%)} = \frac{\text{MA} - \text{ME}}{100 - \text{ME}} \times 100$$

Onde: MA = porcentagem de células alvo mortas na amostra

ME = porcentagem de células alvo mortas espontaneamente

4.13 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE PBRs EM CÉLULAS DO TAE – IMUNOISTOQUÍMICA

Esta técnica foi utilizada tanto para análise da presença de PBR na adrenal, como nas células do TAE.

Coletou-se a adrenal de um camundongo não tratado e não inoculado com tumor, sendo esta fixada em metacarn por 12h, em álcool 95% por 48hs e incluída

em parafina. Dados obtidos com a adrenal foram utilizados como controle positivo da reação, devido à presença de alta densidade de PBR (PAPADOPOULOS, 1993). Já as células do TAE foram coletadas conforme descrito nos itens 4.5. Estas amostras de células foram fixadas em etanol 70%, sendo incluídas em gel de agarose 3% e em parafina (Cell Block).

Os cortes dos blocos do tecido e das células foram realizados em lâminas com silano. As lâminas passaram por 4 incubações com xilol (5 minutos cada) e uma sequência de banhos com álcool em concentrações decrescentes, até chegar à incubação com água destilada.

Após este processo de hidratação, as lâminas passaram por processo de desmascaramento de antígenos em solução de Citrato de Sódio (pH 6,0). A solução foi pré-aquecida por 30 minutos, e após a inclusão das lâminas na solução esta foi aquecida por mais 40 minutos em panela de vapor. Esperou-se aproximadamente 20 minutos até que a solução esfrie novamente.

As lâminas foram lavadas em água corrente e a peroxidase endógena foi bloqueada utilizando-se 2 incubações de 10 minutos com uma solução de H_2O_2 a 3 % em água destilada, em ambiente protegido da luz. As lâminas foram lavadas em água corrente e banhadas com tampão Tris HCl (pH 7,6). As lâminas foram, então, incubadas com o anticorpo primário anti-PBR (1:200) diluído em solução de Albumina Sérica Bovina 5% em água destilada.

Após incubação por toda noite (*overnight*) a 4°C em câmara úmida, as lâminas foram lavadas em tampão Tris HCl e a seguir incubadas com o anticorpo secundário marcado por streptavidina (Biotinylated Link Universal - Kit LSAB - DAKO). Após 35 minutos de incubação à temperatura ambiente, as lâminas foram novamente lavadas e incubadas em tampão Tris HCl por 5 minutos. O anticorpo

conjugado à estreptavidina (Streptavidin HRP - Kit LSAB - DAKO) foi adicionado à reação e incubado por 35 minutos também. As lâminas foram novamente lavadas e incubadas em tampão Tris HCl por 5 minutos.

O revelador da reação foi o corante diaminobenzidina (DAB), solução 0,03% em PBS (pH 7,4) acrescida com 0,03% de peróxido de hidrogênio. Após a revelação (aproximadamente 15 minutos) as lâminas foram lavadas em tampão Tris HCl por 5 minutos. As lâminas lavadas em água corrente, coradas em hematoxilina e desidratadas em solução crescente de álcool e xilol, para posterior avaliação através do sistema de análise de imagens OptiScan[®].

4.14 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE PBRS EM CÉLULAS DO TAE – CITOMETRIA DE FLUXO

Esta determinação foi realizada conforme metodologia descrita por Sãnger et al. (2000), após a coleta do TAE, conforme descrito nos itens 4.3., a células foram contadas em câmara de Neubauer, *aliquotadas* para 1×10^6 células por eppendorf. Estas células foram fixadas em 100 µl de paraformaldeído a 0,04% em PBS por 5 minutos. Após a fixação, as amostras foram centrifugadas e ressuspensas em 100 µl de solução de 0,1% de saponina em PBS 1% Albumina Sérica Bovina) por 5 minutos para permeabilização. Incubou-se o anticorpo primário (anti-PBR, Santa Cruz Biotechnology) diluído a 1:100, durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem das amostras em PBS, incubou-se o anticorpo secundário (anti-IgG conjugado a FITC) durante 15 minutos. As amostras foram centrifugadas e ressuspensas em 1ml de PBS para leitura em Citometro de Fluxo (FACScan Becton Dycson[®]) e posterior análise por meio do Cell Quest Pró[®]. Os resultados foram

expressos em porcentagem de células tumorais marcadas com FITC, calculada através do número de células tumorais fluorescentes dividido pelo número total destas células x 100.

4.15 CULTURA DE CÉLULAS DO TUMOR DE EHRLICH

Foram coletadas células do TAE de um camundongo doador por meio de seringas estéreis. Estas células foram lavadas por duas vezes em RPMI (suplementado com HEPES 10mM, NaHCO₃ 24mM, 100 U/ml de penicilina 100 µg/ml de estreptomicina, 0,5Ug/ml de anfotericina B) enriquecido com 10% de SFB. Após contagem e avaliação da viabilidade com azul de tripan, as células foram ajustadas para uma concentração de 5×10^5 células/ml em meio RPMI 10% SFB. *Plaqueou-se* 5×10^5 células/poço (placas de 24 poços). As células foram incubadas com diferentes concentrações de diazepam (100nM, 300nM, 600nM, 1µM), Ro5-4864 (100nM, 300nM, 600nM, 1µM) ou veículo etanol 0,01% em solução aquosa, durante 48 hs em estufa de cultura de células, a 37°C e 5% de CO₂. Para avaliação do ciclo celular, as placas foram centrifugadas por 8 minutos, 1200 rpm e o meio de cultura foi descartado. As células do Tumor de Ehrlich em cultura (populações aderentes e em suspensão) foram removidas da placa após utilização de uma solução de tripsina. Adicionou-se RPMI enriquecido com 10% soro fetal bovino nos poços. Esta suspensão de células foi colocada em tubos, que por sua vez foram centrifugados a 1200rpm, 8 minutos, a 4°C. As células foram então ressuspensas em etanol 70% por no mínimo 3 horas para fixação.

As diferentes concentrações de ligantes de PBR foram escolhidas com base na afinidade que estes ligantes possuem por células tumorais. Os ensaios de

“binding” com células de tumor de mama mostram que a afinidade pelos ligantes deste receptor se faz em concentrações nanomolares (BEINLICH et al., 1999; HARDWICK et al., 1999). Além disso, o ensaio de *binding* com células de tumor de Ehrlich também mostrou que a afinidade do PK11195 (um ligante com alta afinidade por PBR) ocorre em concentração nanomolar.

4.16 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR –CITOMETRIA DE FLUXO

As células do TAE foram obtidas em experimentos realizados *in vivo* (item 4.4) ou *in vitro* (5.11). Foi utilizada a metodologia descrita por Spector; Goldman; Leinwand (1998). Para a realização do ensaio 1×10^6 células (fixadas em etanol 70% por duas horas ou mantidas em freezer -20°C por até 20 dias) foram lavadas por duas vezes em PBS e centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm. Incubou-se estas células em 200 μl de solução com Iodeto de Propídeo 20 $\mu\text{g/ml}$, Rnase A 200 $\mu\text{g/ml}$, Triton 0,1% v/v diluídos em PBS à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após 30 minutos de incubação, procedeu-se à leitura em Citômetro de Fluxo (FACScan Becton Dycson[®]) e posterior análise por meio do Cell Quest Pro[®]. Os dados são expressos em porcentagem de células hipodiplóides, em fase G0-G1 e em fase S-G2-M.

4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados pelo teste de Bartlett, para verificação de homocedasticidade. Os dados paramétricos foram analisados através do teste “t” de Student ou através de uma análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do

teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas. Os resultados não paramétricos foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney ou pelo teste “t” de Student com correção de Welch. Foram consideradas significantes as análises que apresentaram nível de significância $p < 0,05$. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1 - EFEITOS DE UM TRATAMENTO COM DIAZEPAM 3,0 mg/Kg (7 DIAS) SOBRE O CRESCIMENTO DO TAE

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 16 animais, divididos ao acaso em 2 grupos, cada um com 8 animais. Os animais do grupo experimental receberam uma dose diária de 3,0 mg/Kg de Diazepam, durante 7 dias e os do grupo controle, 0,1ml/10g/dia de solução veículo do Diazepam pelo mesmo período, os tratamentos foram feitos por via oral. No dia do início dos tratamentos, todos os animais foram inoculados, intraperitonealmente, com 5×10^6 células do TAE para posterior análise do crescimento tumoral (conforme descrito no item 4.4 e 4.5). O ciclo celular das células tumorais foi avaliado como descrito no item 4.16.

RESULTADOS

A tabela 1 mostra e a figura 1 ilustra os efeitos do tratamento oral com diazepam (3,0 mg/kg/dia) ou com o veículo deste (0,1ml/10g/dia) durante 7 dias sobre o ganho de peso de animais inoculados com o TAE.

A análise estatística dos dados obtidos mostrou a existência de diferenças significantes ($p < 0,01$) entre os dados após o tratamento com diazepam (3,0 mg/kg/dia) no ganho de peso dos animais (D7-D0). Mais especificamente, o uso de diazepam aumentou o ganho de peso dos animais inoculados com o tumor.

Tabela 1 - Efeitos da administração oral de diazepam (3,0 mg/kg/dia) ou com o veículo deste (0,1ml/10g/dia), durante 7 dias, sobre o ganho de peso de camundongos inoculados com o TAE (5×10^6 células/animal)

Grupos ⁽¹⁾	Ganho de Peso D7-D0 (g)
Veículo	3,30 $\pm$ 0,35
Diazepam	4,10 $\pm$ 0,65**

(1) os dados representam a média $\pm$ desvio padrão

** estatisticamente diferente do controle para $p < 0,01$, teste "t" de Student

Figura 1 - Efeitos da administração oral de diazepam 3,0mg/kg/dia ou veículo deste (0,1ml/10g/dia), durante 7 dias, sobre o ganho de peso de camundongos inoculados com TAE (5×10^6 células/animal). Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, ** $p < 0,01$ (teste "t" de Student)

A tabela 2 mostra e as figuras 2, 3 e 4 ilustram os efeitos do tratamento oral com diazepam (3,0 mg/kg/dia) e veículo do diazepam (0,1ml/10g/dia) durante 7 dias, sobre o crescimento do TAE.

A análise estatística mostrou a existência de diferenças significantes entre os dados obtidos após os tratamentos com diazepam (3,0 mg/kg/dia), durante 7 dias, relativos ao crescimento tumoral avaliado por meio dos seguintes parâmetros:

volume ($p<0,05$) e número total de células tumorais ($p<0,05$), mas não para concentração de células tumorais ($p>0,05$). Especificamente, observou-se que o diazepam aumentou o volume e o número de células totais da ascite de animais inoculados com TAE.

Tabela 2 - Efeitos da administração oral de diazepam (3,0 mg/kg/dia) ou com o veículo deste (0,1ml/10g/dia), durante 7 dias, sobre o volume, concentração e número total de células da ascite de camundongos induzida pela inoculação do TAE (5×10^6 células/animal)

Grupos ⁽¹⁾	Volume (ml)	Células Totais ($\times 10^8$)	Concentração (cel/ml $\times 10^8$)
Veículo	4,91 $\pm$ 0,66	5,91 $\pm$ 1,52	1,23 $\pm$ 0,43
Diazepam	6,81 $\pm$ 1,45 *	9,36 $\pm$ 2,98 *	1,39 $\pm$ 0,43

(1) os dados representam a média $\pm$ desvio padrão

* estatisticamente diferente do controle para $p<0,05$, teste "t" de Student

Figura 2 - Efeitos da administração oral de diazepam (3,0 mg/kg/dia) ou com o veículo deste (0,1ml/10g/dia), durante 7 dias sobre o volume da ascite de camundongos induzida pela inoculação com TAE (5×10^6 células). Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, * $p<0,05$ (teste "t" de Student)

Figura 3 - Efeitos da administração oral de diazepam (3,0 mg/kg/dia) ou com o veículo deste (0,1ml/10g/dia), durante 7 dias, sobre o número de células totais ($\times 10^8$) da ascite de camundongos induzida pela inoculação com TAE (5×10^6 células). Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, * $p < 0,05$ (teste "t" de Student)

Figura 4 - Efeitos da administração oral de diazepam (3,0 mg/kg/dia) ou com o veículo deste (0,1ml/10g/dia), durante 7 dias, sobre o número de células/ml ($\times 10^8$) da ascite de camundongos induzida pela inoculação com TAE (5×10^6 células). Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, $p > 0,05$ (teste "t" de Student)

A tabela 3 mostra os efeitos do tratamento com diazepam (3,0 mg/kg/dia) e veículo do diazepam (0,1ml/10g/dia) durante 7 dias, via oral, sobre o ciclo celular das células do TAE.

A análise estatística mostrou ausência de diferenças significantes entre os dados obtidos após os tratamentos com diazepam (3,0 mg/kg/dia por 7 dias) em relação aos animais tratados com o veículo deste, no relativo ao ciclo celular de células do TAE ($p>0,05$).

Tabela 3 – Efeitos da administração oral de diazepam (3,0 mg/kg/dia) ou com o veículo deste (0,1ml/10g/dia), durante 7 dias, sobre a porcentagem de células tumorais hipodiplóides, em fase G0-G1 e S-G2-M da ascite de camundongos induzida pela inoculação com TAE (5×10^6 células/animal)

Grupos ⁽¹⁾	Hipodiplóides (%)	Fase G0-G1 (%)	Fase S-G2-M (%)
Veículo	10,15 ± 3,18	46,01± 3,30	41,92± 2,35
Diazepam	9,82 ± 2,78	47,70 ± 2,45	40,94 ± 1,76

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

A figura 5 ilustra um citograma de células do TAE fixadas em etanol 70%. Neste citograma as células tumorais foram identificadas pelas propriedades FSC e SSC (tamanho e complexidade celular, respectivamente) e analisadas conforme mostra a região R1.

A figura 6 ilustra um histograma de fluorescência FL-2 em escala linear. As células deste histograma são da região R1 como ilustra a figura 5 e foram incubadas com Iodeto de Propídeo para avaliação do ciclo celular. As diferentes regiões analisadas neste histograma (M1, M2, M3) indicam o conteúdo de DNA e são delimitadas com base na intensidade de fluorescência das células.

Figura 5 - Citograma de células do TAE ilustrando uma população R1 analisada e equivalente às células tumorais

Figura 6 - Histograma do Ciclo Celular do TAE ilustrando as três regiões analisadas: M1 = Células hipodiplóides, M2 = Células em fase G0-G1, M3 = Células em fase S-G2-M

5.2 EXPERIMENTO 2 - EFEITOS DE UM TRATAMENTO COM DIAZEPAM 3,0 mg/Kg (POR 2 DIAS) SOBRE A MIGRAÇÃO E ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS, AVALIADOS 24 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO DO TAE, POR MEIO DAS TÉCNICAS DE PRODUÇÃO DE H_2O_2 E NO, ESPRAIAMENTO E DE FAGOCITOSE

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para os experimentos que avaliaram o número de macrófagos e a produção de H_2O_2 foram utilizados 16 animais, divididos ao acaso em 2 grupos (veículo e diazepam), cada um com 8 animais. Para aqueles que avaliaram a produção de NO e os índices de espraçamento e fagocitose foram utilizados mais 14 animais, também igualmente divididos em 2 grupos (controle e diazepam). Os animais do grupo experimental receberam uma dose diária de 3,0 mg/Kg/dia de Diazepam, durante 2 dias e os do grupo controle, 0,1ml/10g/dia de solução veículo do Diazepam pelo mesmo período. Escolheu-se tratar os animais por 2 dias em função de dados anteriores que mostraram haver necessidade de 24h para ativação dos macrófagos após inoculação de 5×10^6 células do TAE (KLEEB, 1997). Assim, no primeiro dia, uma hora após os tratamentos, os animais foram inoculados, intraperitonealmente, com $5,0 \times 10^6$ células do TAE, conforme descrito nos itens 4.4. A coleta e avaliação da produção H_2O_2 , NO e índices de espraçamento e fagocitose (descritos nos itens 4.6, 4.7.1, 4.7.2, 4.7.3) foram realizadas 24 horas após a inoculação do tumor (item 4.4), e uma hora após a administração da segunda dose de diazepam ou do veículo deste.

RESULTADOS

A tabela 4 mostra e a figura 7 ilustra os efeitos do tratamento oral com diazepam (3,0 mg/kg/dia) e veículo do diazepam (0,1ml/10g/dia), durante 2 dias, sobre o número de leucócitos peritoneais, 24 horas após a inoculação de 5×10^6 células do TAE.

A análise estatística dos resultados mostra que há diferença significativa entre os dados obtidos após os tratamentos com diazepam (3,0 mg/kg/dia por 2 dias) no relativo ao número de leucócitos que migraram para a cavidade peritoneal. Observou-se que o diazepam diminuiu o número de leucócitos que migraram para a cavidade peritoneal.

Tabela 4 - Efeitos da administração oral de diazepam (3,0 mg/kg/dia) ou do veículo deste (0,1ml/10g/dia) por 2 dias sobre o número de leucócitos peritoneais, 24 horas após a inoculação de 5×10^6 células do TAE por animal

Grupos ⁽¹⁾	Número de células x 10⁶
Veículo	4,63 ± 1,24
Diazepam	2,90 ± 1,70 *

(1) os dados representam a média ± desvio padrão

* estatisticamente diferente do controle para $p < 0,05$, teste "t" de Student

Figura 7 - Efeitos da administração oral de diazepam (3,0 mg/kg/dia) ou do veículo deste (0,1ml/10g/dia) por 2 dias sobre o número de leucócitos peritoneais avaliados 24 horas após a inoculação com TAE (5×10^6 células). Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, $p < 0,05$ (teste "t" de Student)

A tabela 5 mostra os efeitos do tratamento oral com diazepam (3,0 mg/kg/dia) e veículo do diazepam (0,1ml/10g/dia), durante 2 dias, sobre a produção de H_2O_2 . Os dados foram obtidos 24 horas após a inoculação de 5×10^6 células do TAE.

A análise estatística dos resultados mostra que não há diferença significativa entre os dados obtidos após os tratamentos com diazepam (3,0 mg/kg) em relação aos obtidos em animais tratados com o veículo deste ($p > 0,05$) quer no relativo à produção espontânea de H_2O_2 quer naquela induzida por PMA (teste "t" de Student).

Tabela 5 - Efeitos da administração oral de diazepam (3,0 mg/kg/dia) ou do veículo deste (0,1ml/10g/dia) por 2 dias sobre a produção de H_2O_2 medida 24 horas após a inoculação de 5×10^6 células do TAE

Grupos ⁽¹⁾	H_2O_2 espontânea (nmoles)	H_2O_2 induzida (nmoles)
Veículo	5,75 $\pm$ 4,98	20,40 $\pm$ 7,31
Diazepam	4,61 $\pm$ 2,21	19,56 $\pm$ 6,20

(1) os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, $p > 0,05$

A tabela 6 mostra e a figura 8 ilustra os efeitos do tratamento oral com diazepam (3,0 mg/kg/dia) e veículo do diazepam (0,1ml/10g/dia), durante 2 dias, sobre a produção de NO. Como anteriormente, os dados foram obtidos 24 horas após a inoculação de 5×10^6 células do TAE.

A análise estatística dos achados experimentais mostra que há diferença significativa entre os dados obtidos após os tratamentos com diazepam (3,0 mg/kg/dia) no relativo à produção de NO com e sem estímulo (LPS *in vitro*) ($p < 0,05$). Especificamente observamos que o diazepam diminuiu a produção de NO em relação àquela medida nos animais do grupo controle, fato observado com e sem estimulação *in vitro* de macrófagos peritoneais dos animais inoculados com o TAE.

Tabela 6 - Efeitos da administração oral de diazepam (3,0 mg/kg/dia) ou do veículo deste (0,1ml/10g/dia) por 2 dias sobre a produção de NO medida 24 horas após a inoculação de 5×10^6 células do TAE

Grupos ⁽¹⁾	NO sem estímulo (micromoles)	NO com LPS (micromoles)
Veículo	15,15 $\pm$ 6,32	19,48 $\pm$ 5,25
Diazepam	6,83 $\pm$ 2,86 *	11,53 $\pm$ 6,20 *

(1) Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão

* estatisticamente diferente do controle para $p < 0,05$, teste "t" de Student

Figura 8 - Efeitos da administração oral de diazepam (3,0 mg/kg/dia) ou do veículo deste (0,1ml/10g/dia) por 2 dias sobre a produção de NO por macrófagos peritoneais (estimulados ou não por LPS *in vitro*) e avaliados 24 horas após a inoculação com o TAE (5×10^6 células). Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, $p < 0,05$ (teste “t” de Student)

A tabela 7 mostra e a figura 9 ilustra os efeitos do tratamento oral com diazepam (3,0 mg/kg/dia) e veículo 0,1ml/10g/dia), durante 2 dias, sobre os índices de espraçamento e de fagocitose. Os dados foram obtidos 24 horas após a inoculação de 5×10^6 células do TAE.

A análise estatística dos resultados mostra que há diferença significativa entre os dados obtidos após o tratamento com diazepam (3,0 mg/kg/dia) no relativo ao índice de espraçamento por macrófagos peritoneais ($p < 0,01$), mas não ao índice de fagocitose ($p > 0,05$). Especificamente, o tratamento com diazepam diminuiu o índice de espraçamento quando comparado ao seu controle.

Tabela 7 - Efeitos da administração oral de diazepam (3,0 mg/kg/dia) ou do veículo deste (0,1ml/10g/dia) por 2 dias sobre os índices de espraçamento e de fagocitose, 24 horas após a inoculação de 5×10^6 células do TAE por animal

Grupos ⁽¹⁾	Espraçamento (%)	Fagocitose (%)
Veículo	29,21 $\pm$ 4,48	38,50 $\pm$ 3,91
Diazepam	20,78 $\pm$ 3,99 **	36,08 $\pm$ 3,52

(1) Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão

** estatisticamente diferente do controle para $p < 0,01$, teste "t" de Student

Figura 9 – Efeitos da administração oral de diazepam (3,0 mg/kg/dia) ou do veículo deste (0,1ml/10g/dia) por 2 dias sobre o índice de espraçamento e de fagocitose de zymozan por macrófagos peritoneais avaliados 24 horas após a inoculação com TAE (5×10^6 células). Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, $p < 0,01$ (teste "t" de Student)

A figura 10 ilustra macrófagos peritoneais espraçados e a figura 11 ilustra macrófagos que fagocitaram partículas de Zimosan.

Figura 10 - Fotomicrografia de macrófagos em cultura celular. A seta indica um macrófago espraiado. Aumento de 20x

Figura 11 - Fotomicrografia de macrófagos em cultura celular com Zymosan. A seta indica um macrófago que fagocitou partículas de Zymosan. Aumento de 20x

5.3 EXPERIMENTO 3 - EFEITOS DE UM TRATAMENTO (2 E 7 DIAS) COM DIAZEPAM 3,0 mg/Kg SOBRE A PORCENTAGEM DE LINFÓCITOS B E T (HELPER E CITOTÓXICOS) EM ANIMAIS PORTADORES DO TAE

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 20 animais, divididos ao acaso em 4 grupos: cada um com 5 animais. Destes quatro grupos, um grupo experimental (E_1) e um controle (C_1) foram avaliados após 2 dias de tratamento e outro grupo experimental (E_2) e controle (C_2), após 7 dias de tratamento. Os animais dos grupos E_1 e E_2 (experimental) receberam uma dose diária de 3,0 mg/Kg de Diazepam, e os do grupo C_1 e C_2 (controle), 0,1ml/10g/dia de solução veículo do Diazepam. No dia do início dos tratamentos, todos os animais de todos os grupos foram inoculados, intraperitonealmente, com $5,0 \times 10^6$ células do TAE, conforme descrito nos itens 4.4. O baço foi coletado e a marcação dos linfócitos foi realizada como descrita no item 4.9.

RESULTADOS

A tabela 8 mostra os efeitos do tratamento oral com diazepam (3,0 mg/kg/dia) e veículo do diazepam (0,1ml/10g/dia) durante 2 dias, sobre a porcentagem de linfócitos T helper, citotóxicos e B provenientes de camundongos inoculados com 5×10^6 células do TAE.

A análise estatística dos resultados mostra que não há diferenças significantes entre os dados obtidos após os tratamentos com diazepam (3,0 mg/kg)

em relação aos do grupo tratado com o veículo deste, no relativo à porcentagem de linfócitos T helper, citotóxicos e B, para ($p>0,05$).

Tabela 8 - Efeitos da administração oral de diazepam (3,0 mg/kg/dia) ou do veículo deste (0,1ml/10g/dia) por 2 dias sobre o peso relativo do baço e a porcentagem de linfócitos T helper, citotóxicos e B em animais inoculados com 5×10^6 células do TAE

Grupos ⁽¹⁾	Peso relativo do baço (mg/g)	Linfócitos T helper (%)	Linfócitos T citotóxicos (%)	Linfócitos B (%)
Veículo (C₁)	3,08 ± 0,57	20,97 ± 5,31	6,53 ± 2,43	65,20 ± 5,39
Diazepam (E₁)	2,78 ± 0,59	21,22 ± 3,56	6,36 ± 1,31	63,90 ± 4,66

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

A tabela 9, por outro lado, mostra os efeitos do tratamento oral com diazepam (3,0 mg/kg/dia) e veículo do diazepam (0,1ml/10g/dia) durante 7 dias, sobre a porcentagem de linfócitos T helper, citotóxicos e B provenientes de camundongos inoculados com 5×10^6 células do TAE.

A análise estatística dos achados destes experimentos mostra que, também neste caso, não há diferenças significantes entre os dados obtidos após os tratamentos com diazepam (3,0 mg/kg) e àqueles tratados com o veículo deste, relativos a porcentagem de linfócitos T helper, citotóxicos e B, para ($p>0,05$).

Tabela 9 - Efeitos da administração oral de diazepam (3,0 mg/kg/dia) ou do veículo deste (0,1ml/10g/dia) por 7 dias sobre o peso relativo do baço e a porcentagem de linfócitos T helper, citotóxicos e B em animais inoculados com 5×10^6 células do TAE

Grupos ⁽¹⁾	Peso relativo do baço (mg/g)	Linfócitos T helper (%)	Linfócitos T citotóxicos (%)	Linfócitos B (%)
Veículo (C₂)	7,24 ± 1,07	12,06 ± 2,50	4,80 ± 0,92	64,00 ± 5,98
Diazepam (E₂)	6,24 ± 0,94	13,47 ± 2,24	4,87 ± 0,56	64,84 ± 6,79

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

A figura 12 ilustra um citograma de células obtidas do baço. Neste citograma os linfócitos foram identificados pelas propriedades FSC e SSC (tamanho e complexidade celular, respectivamente) e analisados conforme mostra a região R1.

A figura 13 ilustra dois *dot plots* com eixos de dupla fluorescência FL-1 e FL-2 em escala logarítmica. As células destes *dot plots* são da região R1 como ilustrado na figura 12 e foram marcadas com diferentes anticorpos (vide item da metodologia onde se descreve).

Figura 12 - Citograma de linfócitos esplênicos ilustrando a população R1 analisada e equivalente aos linfócitos

Figura 13 - Dot Plot de linfócitos esplênicos, ilustrando quadrantes com células marcadas com diferentes anticorpos conjugados a FITC ou PE
 Dot plot diaz035 = anticorpos CD3 FITC e CD4 PE
 Dot plot diaz034 = anticorpos CD4 FITC e CD8 PE

5.4 EXPERIMENTO 4 - EFEITOS DE UM TRATAMENTO (3 DIAS) COM DIAZEPAM 3,0 mg/Kg SOBRE A ATIVIDADE CITOTÓXICA DE CÉLULAS NK PROVENIENTES DE ANIMAIS PORTADORES DO TAE

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 20 animais, divididos ao acaso em 2 grupos: cada um com 10 animais. Os animais do grupo experimental receberam uma dose diária de 3,0 mg/Kg/dia de Diazepam, durante 3 dias e os do grupo controle, 0,1ml/10g/dia de solução veículo do Diazepam pelo mesmo período. Assim, no primeiro dia, uma hora após os tratamentos, os animais foram inoculados, intraperitonealmente, com $5,0 \times 10^6$ células do TAE, conforme descrito nos itens 4.4. O sangue foi coletado uma hora após o último dia de tratamento e a incubação com as células efectoras YAC-1 para avaliação da citotoxicidade de células NK foi realizada conforme metodologia descrita no item 4.10, 4.11 e 4.12.

RESULTADOS

A tabela 10 mostra e a figura 14 ilustra os efeitos do tratamento oral com diazepam (3,0 mg/kg/dia) e veículo do diazepam (0,1ml/10g/dia) durante 3 dias, sobre a citotoxicidade de células NK provenientes de camundongos inoculados com 5×10^6 células do TAE.

A análise estatística dos resultados mostra que há diferenças significantes entre os dados obtidos após os tratamentos com diazepam (3,0 mg/kg) em relação aos do grupo tratado com o veículo deste ($p < 0,0001$), no relativo à citotoxicidade de

células NK. Especificamente os animais do grupo tratado com diazepam apresentaram maior porcentagem de citotoxicidade quando comparados com o seu grupo controle.

Tabela 10 - Efeitos da administração oral de diazepam (3,0 mg/kg/dia) ou do veículo deste (0,1ml/10g/dia) por 3 dias sobre a citotoxicidade de células NK em animais inoculados com 5×10^6 células do TAE

Grupos ⁽¹⁾	Citotoxicidade (%)
Veículo	25,51 $\pm$ 2,71
Diazepam	74,23 $\pm$ 21,79 ****

(1) os dados representam a média $\pm$ desvio padrão

**** $p < 0,0001$, teste "t" de Student

Figura 14 - Efeitos da administração oral de diazepam (3,0 mg/kg/dia) ou do veículo deste (0,1ml/10g/dia) por 3 dias, sobre a porcentagem de citotoxicidade de células NK em animais inoculados com TAE (5×10^6 células/animal). Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, **** $p < 0,0001$ (teste "t" de Student)

A figura 15 ilustra um *dot plot* de dupla fluorescência FL-1 e FL-3 em escala logarítmica com linfócitos e células YAC-1. Neste gráfico é possível observar a região R1 correspondente às células YAC-1 que foram marcadas com o fluorocromo CFDA-SE e são analisadas em leitor FL-1.

A figura 16 mostra um histograma de fluorescência FL-3 em escala logarítmica da região R1 como ilustrado na figura 18. M1 indica a fluorescência correspondente à morte celular das células YAC-1 que incorporaram o Iodeto de Propídeo.

Figura 15 - *Dot Plot* de dupla fluorescência com linfócitos e células YAC-1, ilustrando a região R1 correspondente às células YAC-1 que foram marcadas com o fluororomo CFDA-SE

Figura 16 - Histograma de fluorescência FL-3 em escala logarítmica da região R1 (ilustrada na figura 15). M1 indica a fluorescência correspondente à morte celular das células YAC-1 que incorporaram o Iodeto de Propídeo

5.5 EXPERIMENTO 5 - INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE PBRs EM CÉLULAS DO TAE EM ANIMAIS TRATADOS OU NÃO COM O DIAZEPAM 3,0 mg/Kg

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 16 animais, divididos ao acaso em 2 grupos, cada um com 8 animais. Os animais de grupo experimental receberam uma dose oral diária de 3,0 mg/Kg de Diazepam, durante 7 dias e os do grupo controle, 0,1ml/10g/dia de solução veículo do Diazepam pelo mesmo período. No dia do início dos tratamentos, todos os animais foram inoculados, intraperitonealmente, com 5×10^6 células do TAE (item 4.4) para posterior análise do crescimento tumoral. A marcação para PBR foi realizada como descrito no item 4.13 e 4.14.

RESULTADOS

A figura 17 mostra marcação na região cortical da adrenal, utilizada como controle positivo da reação. A figura 18, por sua vez, mostra que células do TAE possuem marcação positiva para PBR.

Figura 17 - Fotomicrografia de adrenal de camundongo marcada para PBR. Notar marcação mais intensa de coloração acastanhada na região da cortical. Aumento de 20x

Figura 18 - Fotomicrografia de células do TAE de camundongo marcada para PBR. Notar marcação intensa de coloração acastanhada na região nuclear. Aumento de 100x

A tabela 11 mostra e a figura 19 ilustra os efeitos do tratamento oral com diazepam (3,0 mg/kg/dia) e veículo do diazepam (0,1ml/10g/dia) durante 7 dias, administrados por via oral sobre a porcentagem de células marcadas para PBR avaliadas por citometria.

A análise estatística dos dados obtidos mostrou a existência de diferenças significantes entre os dados obtidos após os tratamentos com diazepam (3,0 mg/kg), relativos à porcentagem de células marcadas para PBR e avaliadas por citometria ($p < 0,05$). Especificamente, o tratamento com diazepam diminuiu a porcentagem de células do TAE marcadas positivamente para PBR em relação ao seu grupo controle.

Tabela 11 - Efeitos da administração oral de diazepam (3,0 mg/kg/dia) ou do veículo deste (0,1ml/10g/dia) por 7 dias sobre a porcentagem de marcação para PBR em células do TAE

Grupos ⁽¹⁾	porcentagem de células positivas
Veículo	85,53 ± 12,60
Diazepam	52,15 ± 25,80 **

(1) os dados representam a média ± desvio padrão

** estatisticamente diferente do controle para $p < 0,01$, teste "t" de Student

Figura 19 - Efeitos da administração oral de diazepam (3,0 mg/kg/dia) ou do veículo deste (0,1ml/10g/dia) por 7 dias, sobre a porcentagem de células do TAE positivas para PBR. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, ** $p < 0,01$ (teste "t" de Student)

A figura 20 ilustra um citograma de células do TAE fixadas em paraformaldeído. Neste citograma as células tumorais foram identificadas pelas propriedades FSC e SSC (tamanho e complexidade celular, respectivamente) e analisadas conforme mostra a região R1.

A figura 21 ilustra um histograma de fluorescência FL-1 em escala logarítmica. As células deste histograma são correspondentes às células da região R1 como ilustra a figura 20 e foram marcadas com anticorpo primário para PBR e anticorpo secundário conjugado a FITC.

Figura 20 - Citograma de células do TAE ilustrando uma população R1 analisada e equivalente às células tumorais

Figura 21 - Histograma de células do TAE ilustrando a fluorescência basal de Células do Tumor de Ehrlich (histograma laranja) e a fluorescência de células positivas para PBR (histograma verde)

5.6 EXPERIMENTO 6 - EFEITOS DE UM TRATAMENTO COM DIAZEPAM E Ro5-4864 *IN VITRO* SOBRE O CICLO CELULAR TAE

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Células do TAE foram coletadas de um camundongo inoculado há aproximadamente 7 dias com o tumor, sendo incubadas com diferentes concentrações de Diazepam, Ro 5-4864 e com o diluente destes (etanol 0,01%) como descrito no item 4.15. Após 48 horas de incubação o ciclo celular foi avaliado como descrito no item 4.16.

RESULTADOS

A tabela 12 mostra e as figuras 22, 23 e 24 ilustram os efeitos do tratamento *in vitro* com diazepam, Ro5-4864 e etanol sobre o ciclo celular das células TAE.

Em relação à porcentagem de células hipodiplóides a análise estatística mostrou existência de diferenças significantes entre os grupos Diazepam 100nM ($p < 0,001$), Ro 300nM ($p < 0,001$), Ro 600nM ($p < 0,01$) e Ro 1 μ M ($p < 0,0001$) quando comparados com o controle etanol. Especificamente, nos grupos tratados com os ligantes de PBR nas doses acima citadas observou-se uma maior porcentagem de células hipodiplóides quando comparados com o grupo controle.

Em relação à porcentagem de células em fase G0-G1, a análise estatística mostrou existência de diferenças significantes entre os grupos Diazepam: 100nM ($p < 0,001$), 300nM ($p < 0,05$), 600nM ($p < 0,05$), 1 μ M ($p < 0,01$) e Ro5-4684: 100nM ($p < 0,05$), 300nM ($p < 0,01$), 600nM ($p < 0,05$), 1 μ M ($p < 0,01$) quando comparados com seu veículo etanol. Especificamente, nos grupos tratados com os ligantes de PBR,

diazepam e Ro5-4684, em todas as concentrações testadas observou-se uma menor porcentagem de células em fase G0-G1 quando comparados com o veículo etanol.

Em relação à porcentagem de células em fase S-G2-M, a análise estatística também mostrou existência de diferenças significantes entre os grupos Diazepam: 100nM ($p<0,05$), 300nM ($p<0,05$), 600nM ($p<0,05$) e 1 μ M ($p<0,01$), e Ro5-4684: 100nM ($p<0,05$), 300nM ($p<0,05$), 600nM ($p<0,05$) quando comparados com seu veículo etanol. Especificamente, nos grupos tratados com os ligantes de PBR nas doses acima citadas observou uma maior porcentagem de células em fase S-G2-M quando comparados com o veículo etanol.

Tabela 12 - Efeitos de um tratamento *in vitro* com diazepam, Ro5-4864 e veículo sobre a porcentagem de células do TAE hipodiplóides, em fase G0-G1 e S-G2-M

Grupos ⁽¹⁾		Hipodiplóides (%)	Fase G0-G1 (%)	Fase S-G2-M (%)
Veículo 0,01%		4,55 $\pm$ 1,26	66,38 $\pm$ 2,19	28,63 $\pm$ 1,02
Diazepam	100nM	9,39 $\pm$ 1,97***	54,91 $\pm$ 3,08***	35,08 $\pm$ 3,27*
	300nM	4,35 $\pm$ 1,11	60,80 $\pm$ 3,41*	34,11 $\pm$ 2,97*
	600nM	5,04 $\pm$ 0,77	59,66 $\pm$ 4,86*	35,66 $\pm$ 4,08*
	1 μ M	5,43 $\pm$ 2,04	57,23 $\pm$ 3,54**	34,50 $\pm$ 2,9**
Ro 5-4864	100nM	3,55 $\pm$ 0,66	58,91 $\pm$ 4,58*	37,11 $\pm$ 3,87*
	300nM	10,15 $\pm$ 2,24***	55,54 $\pm$ 4,65**	32,60 $\pm$ 2,93*
	600nM	9,06 $\pm$ 2,74**	57,43 $\pm$ 5,71*	30,16 $\pm$ 2,89*
	1 μ M	10,67 $\pm$ 1,22 [#]	60,03 $\pm$ 1,43**	25,09 $\pm$ 3,29

(1) os dados representam a média $\pm$ desvio padrão

* estatisticamente diferente do controle para $p<0,05$, teste "t" de Student

** estatisticamente diferente do controle para $p<0,01$, teste "t" de Student

*** estatisticamente diferente do controle para $p<0,001$, teste "t" de Student

estatisticamente diferente do controle para $p<0,0001$, teste "t" de Student

Figura 22 - Efeitos do tratamento *in vitro* com diazepam, Ro5-4864 e veículo sobre a porcentagem de células hipodiplóides do TAE. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, # $p < 0,0001$ (teste "t" de Student)

Figura 23 - Efeitos do tratamento *in vitro* com diazepam, Ro5-4864 e veículo sobre a porcentagem de células em fase G0-G1 do TAE. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (teste "t" de Student)

Figura 24 - Efeitos do tratamento *in vitro* com diazepam, Ro5-4864 e veículo sobre a porcentagem de células em fase S-G2-M do TAE. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (teste "t" de Student)

5.7 EXPERIMENTO 7 - EFEITOS DE UM TRATAMENTO PROLONGADO (7 DIAS) COM DIAZEPAM 0,3 mg/Kg E 1,0 mg/Kg (7 DIAS) SOBRE O CRESCIMENTO DO TAE

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Durante o experimento foram utilizados 24 animais, divididos ao acaso em 3 grupos, cada um com 8 animais. Os animais de grupo E1 (experimental 1) receberam uma dose diária de 0,3 mg/Kg de Diazepam, os do grupo E2 (experimental 2) receberam uma dose diária de 1,0 mg/kg de Diazepam e os do grupo C (controle), 0,1ml/ 10g de solução veículo do Diazepam. Todos animais foram tratados por 7 dias. No dia do início dos tratamentos, todos os animais foram inoculados, intraperitonealmente, com 0,4 ml de suspensão do TAE, conforme descrito no item 4.4, para posterior avaliação do crescimento tumoral. O crescimento tumoral foi avaliado após 7 dias do início do tratamento e da inoculação do tumor (item 4.5).

RESULTADOS

A tabela 13 mostra e a figura 25 ilustra os efeitos do tratamento oral com diazepam (3,0 mg/kg/dia) ou com o veículo deste (0,1ml/10g/dia) durante 7 dias sobre o ganho de peso de animais inoculados com o TAE.

A análise estatística dos dados obtidos mostrou ausência de diferenças significantes entre os dados após o tratamento com diazepam (0,3 e 1,0 mg/kg/dia) no ganho de peso dos animais (D7-D0).

Tabela 13 - Efeitos da administração oral de diazepam ((0,3 e 1,0 mg/kg/dia) ou com o veículo deste (0,1ml/10g/dia), durante 7 dias, sobre o ganho de peso de camundongos inoculados com o TAE (5×10^6 células/animal)

Grupos ⁽¹⁾	Ganho de Peso D7-D0 (g)
Veículo (C₁)	6,75 ± 2,25
Diazepam (E₁)	6,24 ± 1,80
Diazepam (E₂)	7,47 ± 2,49

(1) os dados representam a média ± desvio padrão

p>0,05 (ANOVA)

C = grupo controle tratado com veículo do diazepam por 7 dias

E₁ = grupo experimental tratado com diazepam 0,3 mg/kg por 7 dias

E₂ = grupo experimental tratado com diazepam 1,0 mg/kg por 7 dias

Figura 25 - Efeitos da administração oral de diazepam (0,3 e 1,0 mg/kg/dia) ou veículo deste (0,1ml/10g/dia), durante 7 dias, sobre o ganho de peso de camundongos inoculados com TAE (5×10^6 células/animal). Os dados representam a média ± desvio padrão, p>0,05 (ANOVA)

A tabela 14 mostra e as figuras 26, 27 e 28 ilustram os efeitos do tratamento oral com diazepam (0,3 mg/kg/dia e 1,0 mg/kg/dia) e veículo do diazepam (0,1ml/10g/dia) durante 7 dias, sobre o crescimento do tumor em camundongos inoculados com 5×10^6 células do TAE por animal.

A análise estatística mostrou a ausência de diferenças significantes entre os dados obtidos após os tratamentos com diazepam (0,3 mg/kg/dia e 1,0 mg/kg/dia), durante 7 dias, relativos ao crescimento tumoral avaliado por meio dos seguintes parâmetros: volume, número total de células tumorais e concentração de células tumorais ($p > 0,05$).

Tabela 14 - Efeitos da administração oral de diazepam (0,3 mg/kg/dia e 1,0 mg/kg/dia) ou com o veículo deste (0,1ml/10g/dia), durante 7 dias, sobre o volume, concentração e número total de células da ascite de camundongos induzida pela inoculação do TAE (5×10^6 células/animal)

Grupos ⁽¹⁾	Volume (ml)	Células Totais (x 10⁸)	Concentração (cel/ml x 10⁸)
Veículo (C₁)	6,91 ± 1,04	9,20 ± 0,74	1,35 ± 0,21
Diazepam (E₁)	6,65 ± 1,30	8,62 ± 2,44	1,30 ± 0,26
Diazepam (E₂)	6,57 ± 0,53	8,83 ± 2,03	1,34 ± 0,28

(1) os dados representam a média ± desvio padrão

$p > 0,05$ (ANOVA para os parâmetros de Volume e Concentração, Kruskal-Wallis para o parâmetro células totais)

C = grupo controle tratado com veículo do diazepam por 7 dias

E₁ = grupo experimental tratado com diazepam 0,3 mg/kg por 7 dias

E₂ = grupo experimental tratado com diazepam 1,0 mg/kg por 7 dias

Figura 26 - Efeitos da administração de diazepam (0,3 e 1,0 mg/kg/dia) ou veículo deste, sobre o volume da ascite de camundongos induzida pela inoculação com TAE (5×10^6 células/animal). Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, $p > 0,05$ (ANOVA)

Figura 27 - Efeitos da administração de diazepam (0,3 e 1,0 mg/kg/dia) ou veículo deste, sobre o número de células totais ($\times 10^8$) da ascite de camundongos induzida pela inoculação com TAE (5×10^6 células/animal). Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, $p > 0,05$ (teste "U" Mann-Whitney)

Figura 28 - Efeitos da administração de diazepam (0,3 e 1,0 mg/kg/dia) ou veículo deste, sobre o número de células/ml ($\times 10^8$) da ascite de camundongos induzida pela inoculação com TAE (5×10^6 células/animal). Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, $p > 0,05$ (ANOVA)

6 DISCUSSÃO

Os presentes resultados mostraram que o diazepam na dose de 3,0 mg/kg e administrado por via oral, durante 7 dias: 1) aumentou o crescimento do TAE quando injetado no primeiro dia do tratamento e avaliado através da medida do volume ascítico do tumor e do aumento do número total de células tumorais; 2) não modificou a concentração de células tumorais no fluido ascítico; 3) não modificou o peso relativo do baço, a porcentagem de linfócitos B, T helper ou T citotóxicos. Observamos, também, que o diazepam na dose de 3,0 mg/kg, administrado por via oral, durante 2 dias: 1) diminuiu o número de macrófagos que migraram para a cavidade peritoneal; 2) diminuiu a liberação de NO por macrófagos peritoneais (estimulados ou não por LPS) e a porcentagem de células espiadas; 3) não interferiu com a produção de H_2O_2 (induzida ou não por PMA) por macrófagos peritoneais e a porcentagem de macrófagos peritoneais que fagocitaram partículas de zymosan, 4) não modificou o peso relativo do baço, a porcentagem de linfócitos B, T helper ou T citotóxicos. O diazepam na dose de 3,0 mg/kg, administrado por via oral, durante 3 dias aumentou a citotoxicidade de células NK. O diazepam na dose de 3,0 mg/kg e administrado por via oral, durante 7 dias diminuiu a porcentagem de células do TAE marcadas para PBR. Observamos que o tratamento *in vitro* com diazepam (100nM, 300nM, 600nM e 1 μ M) e Ro5-4864 (100nM, 300nM, 600nM e 1 μ M) aumentou a porcentagem de células do TAE em fase S-G2-M. Finalmente, o tratamento por 7 dias com doses menores de diazepam 0,3 mg/kg e 1mg/kg, não modificou o crescimento do TAE.

Uma vez que os experimentos foram realizados *in vivo*, para entender os possíveis efeitos do tratamento com diazepam sobre os parâmetros avaliados nos

presentes experimentos é necessário que se considere preliminarmente, a distribuição e o papel dos PBRs (receptores periféricos para benzodiazepínicos). Estes receptores já foram encontrados tanto em células do SI (ZAVALA, 1997) como em células tumorais (HAN et al., 2003; HARDWICK et al., 1999). Sabe-se, por outro lado, que ligantes deste receptor interferem com a atividade de macrófagos peritoneais - diminuindo tanto a capacidade de fagocitose e de produção de H_2O_2 por estas células (MASSOCO; PALERMO-NETO, 1999) como, também, a fagocitose de *S. aureus* por de neutrófilos sangüíneos de ratos (SILVA et al., 2003) e por macrófagos peritoneais de eqüinos (MASSOCO; PALERMO-NETO, 2003). Interferem, ainda, com a proliferação de células tumorais como observado em um tumor de mama BT-20, onde aumentaram ou diminuíram a proliferação celular, dependendo estes resultados das doses avaliadas dos ligantes de PBR (BEINLICH et al., 2000). Finalmente, os PBR interferem com a produção de esteróides endógenos, aumentando a produção de corticosterona pelas células adrenais facilitando a passagem do colesterol, pelas membranas das mitocôndrias (LACAPERE; PAPADOPOULOS, 2003; PAPADOPOULOS, 1993). Neste sentido, os experimentos que realizamos *in vivo* buscaram avaliar a interação entre o diazepam, a imunidade e o crescimento tumoral e os experimentos *in vitro* buscaram por um efeito direto do fármaco sobre a proliferação de células tumorais. De fato, as células do sistema imune (macrófagos, linfócitos e células NK), do sistema neuroendócrino (eixo HPA), e as células tumorais são capazes de responder a este fármaco (BEINLICH et al., 2003; CALOGERO et al., 1990; HAN et al., 2003; HARDWICK et al., 1999; LACAPERE; PAPADOPOULOS, 2003; PAPADOPOULOS, 1993).

Mostramos, que animais tratados com diazepam na dose de 3,0 mg/kg e durante 7 dias apresentaram maior crescimento tumoral, fato este observado através

do maior ganho de peso, volume e número total de células tumorais presentes no líquido ascítico (Figuras 1, 2 e 3). Embora o volume ascítico tenha sido maior nos animais experimentais, não se pode inferir que tenha o diazepam causado um aumento da permeabilidade vascular. De fato, a concentração de células tumorais por ml do fluido ascítico foi a mesma para os dois grupos de animais analisados (Figura 4). Como o aumento de volume do fluido ascítico foi diretamente proporcional ao aumento de número total de células tumorais, parece plausível inferir que o maior número destas células seja a causa do maior volume (FASTAIA; DUMONT, 1976). Neste sentido, Lazzarini, Malucelli e Palermo-Neto (2001) mostraram que a administração aguda de diazepam (10 mg/kg) produziu diminuição, e não um aumento, do volume de exsudato em um estudo de pleurisia experimental induzida pela carragenina, dados também obtidos por Torres et al. (2000).

Em relação à atividade dos macrófagos observou-se que houve um menor número de células que migraram para a cavidade peritoneal (Figura 7). Lazzarini, Malucelli e Palermo-Neto (2001) no experimento acima citado quantificaram, também, o número de leucócitos presentes no exsudato pleural; mostraram que tanto o número de polimorfonucleares quanto o de mononucleares apresentavam-se diminuídos nos animais tratados com diazepam (10 mg/kg) e submetidos ao modelo de pleurisia induzido pela carragenina. Portela et al. (2002) mostraram que o diazepam diminuiu o número de linfomononucleares presentes nas vias aéreas de ratos que foram submetidos a um modelo experimental de asma e a um estímulo estressor, como o choque nas patas. Estes dois resultados concordam com os nossos achados que também mostraram uma diminuição na migração de células frente a um novo estímulo inflamatório. Especificamente, mostramos em nossos experimentos um menor número de leucócitos peritoneais em animais tratados com

diazepam na dose de 3 mg/kg e inoculados com o TAE. Estudos como os de Schlumpf et al. (1990), mostraram que o diazepam diminuiu a produção de interleucinas a partir de leucócitos. Sabe-se, também, que as citocinas são capazes de dirigir o recrutamento seletivo e a ativação de células inflamatórias (SILZLE et al., 2003; ZHANG et al., 1997). Além disso, para que células migrem da circulação para um foco inflamatório são necessários processos conhecidos como “rolling” e diapedese, dependentes, dentre outros fatores, da expressão de moléculas de adesão (COTRAN et al., 1999). Diante destes fatos, é possível que a liberação de citocinas, assim como a expressão de moléculas de adesão celular, estejam envolvidas com a diminuição do número de células que migraram para a cavidade peritoneal, após o tratamento com diazepam, como observado anteriormente por Lazzarini, Malucelli e Palermo-Neto (2001) na cavidade pleural, por Portela et al. (2002) nas vias aéreas e, agora, em nosso estudo. Dados preliminares obtidos em nossos laboratórios apontam nesta direção, pois o tratamento com diazepam diminuiu o rolling de leucócitos (MATA², informação verbal).

Além disso, observamos que os macrófagos que migraram para a cavidade peritoneal apresentaram uma diminuição de sua atividade tanto quando foram avaliados em relação à produção de NO estimulada ou não por LPS (Figura 8) como a partir da medida do índice de espraimento (Figura 9). A atividade de macrófagos tem sido amplamente estudada por vários pesquisadores sob diferentes pontos de vista (FECCHIO et al., 1990b; FONSECA; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2002; PALERMO-NETO; MASSOCO; ROBESPIERRE DE SOUZA, 2003). Neste sentido, o espraimento é considerado como um processo que representa uma das alterações decorrentes da ativação de macrófagos (FIEDLER, 1989; HAMILTON; ADAMS,

² Informação fornecida por Mata em São Paulo, 2003.

1987). Este parâmetro parece importante para animais portadores de TAE, pois a diminuição dos índices de espraimento de macrófagos de animais estressados já foi correlacionada com um maior crescimento tumoral em outros estudos (PALERMO-NETO; MASSOCO; ROBESPIERRE DE SOUZA, 2003). Concordando com os presentes achados, Massoco e Palermo-Neto (1999) observaram que animais tratados por 7 dias com diazepam na dose de 1,5 mg/kg apresentaram um menor índice de espraimento. É assim, possível sugerir um envolvimento do espraimento de macrófagos com os presentes achados após o tratamento com diazepam. Além disso, sabe-se também que o NO liberado por macrófagos constitui um dos mais importantes mecanismos de ação tumoricida (KLIMP et al., 2003; SOTOMAYOR et al., 1995). Considerando-se que neste experimento a produção de NO e o índice de espraimento por macrófagos peritoneais foi menor no grupo dos animais tratados com o diazepam, é possível sugerir que esta diminuição possa também ter favorecido o maior crescimento tumoral por reduzir mecanismos de citotoxicidade e de ativação de macrófagos contra tumores.

Por outro lado, observamos que não houve diferença entre os grupos em relação à produção de H_2O_2 induzida ou não por PMA (Tabela 5), assim como na capacidade destas células em fagocitar partículas de zymosan (Figura 9). Neste sentido, Massoco e Palermo-Neto (1999) observaram que um tratamento com diazepam por 7 dias nas dose de 1,5 mg/kg causou diminuição da liberação de H_2O_2 induzida ou não por PMA, assim como dos índices de espraimento e de fagocitose. É possível que as diferenças entre os achados anteriores e os agora obtidos em nosso grupo sejam devidas: 1-à dose e via de diazepam usada (pois estes autores usaram 1,5 mg/kg, por 7 dias, via intraperitoneal) e 2- ao estímulo usado para ativação de macrófagos (o oncoBCG, bacilo de Calmette Guerin usado pelos

autores). De fato, no presente trabalho, utilizamos o diazepam (3,0 mg/kg, por 2 dias), por via oral e células tumorais para ativação dos macrófagos. Em outras palavras é possível pensar que diferenças farmacocinéticas do diazepam, decorrentes das doses e/ou das vias de administração, ou ainda, do tempo de tratamento, assim como, diferenças entre as interações de macrófagos com as micobactérias ou com as células tumorais, respondam pelas diferenças agora encontradas.

A atividade de macrófagos em animais portadores de TAE tem sido estudada por outros pesquisadores. Fecchio et al. (1990b) demonstraram ser esta variável um importante parâmetro a ser avaliado no estudo dos mecanismos ligados à interação entre o SI e o TAE. Fármacos como antagonistas de PAF, como o BN 52021, foram capazes de inibir o crescimento do TAE e, também, de aumentar a atividade de macrófagos estimulados por este tumor (FECCHIO et al., 1990a). Estudos como os de Palermo-Neto, Massoco e Robespierre de Souza (2003) correlacionaram um menor índice de espraio e de fagocitose por macrófagos peritoneais com um maior crescimento do TAE em animais submetidos a estresses físicos ou psicológicos, isto é, que apresentavam maiores níveis circulantes de corticosterona.

Em relação à avaliação dos linfócitos de animais tratados com diazepam e inoculados com tumor, observamos que o peso relativo do baço (Tabelas 8 e 9) embora numericamente menor após o tratamento durante 2 e 7 dias, não foi estatisticamente diferente daquele dos animais não tratados com este fármaco. A porcentagem de linfócitos T helper, linfócitos T citotóxicos e linfócitos B (Tabelas 8 e 9) também não foi diferente estatisticamente entre os grupos de animais presentemente usados. Neste sentido, alguns estudos mostraram que o tratamento *in vitro* de linfócitos humanos com ligantes de PBR como diazepam e Ro5-4864

diminuiu a sua proliferação induzida por fitohemaglutinina (PHA) e ConA, assim como a liberação de IL-2 (BESSLER et al., 1992). Mostrou-se, também, que o tratamento pré-natal *in vivo* com diazepam alterou diversas funções de linfócitos, como, por exemplo, o perfil de produção de citocinas e a proliferação destas células (SCHLUMPF et al., 1995). Por outro lado, sabe-se serem os linfócitos importantes elementos para uma efetiva resposta imune do organismo contra o TAE. De fato, animais portadores de maior atividade de linfócitos avaliada pela liberação de citocinas (TNF- α , IFN- γ e IL-1) e uma maior porcentagem de linfócitos do tipo T helper, T citotóxicos e B, apresentaram um menor crescimento do TAE (MONDAL et al., 2002). No presente estudo, não foram encontradas diferenças significantes entre as porcentagens de diferentes populações de linfócitos. Estes dados podem sugerir que os linfócitos não estejam envolvidos - ao menos diretamente - com os dados presentemente obtidos e ligados ao crescimento do TAE. Ressalte-se, no entanto, que os presentes dados referem-se à porcentagem e não à atividade de linfócitos. Vale lembrar que atividade e porcentagem de linfócitos são fatos independentes, não necessariamente conectados entre si (ABBAS, 2000). Neste sentido, não se encontraram dados de literatura ligados aos efeitos de benzodiazepínicos sobre a porcentagem de linfócitos.

A análise atividade de células NK foi realizada dentro do contexto de investigação dos efeitos do diazepam sobre a imunidade e na busca por mecanismos que pudessem elucidar, em especial, as alterações imunes que culminariam com o maior crescimento do TAE em animais tratados por 7 dias e por via oral com 3,0 mg/kg de diazepam. Observamos que animais assim tratados, apresentaram - ao contrário do que se esperava - maior atividade de células NK (Figura 14) e maior crescimento tumoral quando avaliado após o tratamento. Bessler

et al. (1997) mostraram que o tratamento *in vitro* com diazepam, Ro5-4864 ou PK11195 (ligantes de PBRs) diminuiu a atividade citotóxica de células NK sobre células alvo YAC-1, fato este não observado em nossos experimentos. Esta contradição se deve, provavelmente, a diferenças nos dois experimentos; em nosso trabalho utilizamos um tratamento *in vivo* com diazepam em animais portadores de TAE e no acima descrito foi utilizado um tratamento *in vitro*. É possível sugerir que, em nosso experimento, as células NK não tenham desempenhado um papel anti-tumoral eficaz, pois mesmo na presença de um aumento da sua citotoxicidade, o TAE cresceu mais nos camundongos tratados com diazepam.

Os PBRs estão envolvidos com o desenvolvimento da esteroidogênese em glândulas adrenais de ratos (ZILZ et al., 1999) e também possuem importante papel na ativação do eixo HPA (CALOGERO et al., 1990). Desta forma, sabe-se que o tratamento com diazepam aumentou os níveis séricos de corticosterona e diminuiu a atividade de macrófagos quando administrado na dose de 1,5mg/kg, via i.p., durante 7 dias em camundongos (MASSOCO; PALERMO-NETO, 1999). Um tratamento com o midazolam, nas doses de 0,06mg/kg e 0,1 mg/kg, via endovenosa, induziu uma diminuição na porcentagem de fagocitose e no número de bactérias que foram fagocitadas por neutrófilos sanguíneos e macrófagos peritoneais de eqüinos, mas não aumentou os níveis séricos de cortisol (MASSOCO; PALERMO NETO, 2003). O diazepam administrado na dose de 10 mg/kg, via i.p., agudamente em ratos, aumentou os níveis séricos de corticosterona, diminuiu o edema de pata induzido por carragenina em ratos (LAZZARINI; MALUCELLI; PALERMO-NETO, 2001). Silva et al. (2003) também observaram um aumento dos níveis séricos de corticosterona em ratos tratados agudamente com diazepam na dose de 10 mg/kg, via i.p. e um aumento do *burst oxidativo* de neutrófilos sangüíneos.

Desta forma, parece que o aumento dos níveis séricos de corticosterona induzidas pelo diazepam e a ativação do eixo HPA sejam dependentes não apenas da dose do benzodiazepínico administrado, mas também da via e do tempo de administração. Estes níveis séricos de corticosterona podem, assim, ser correlacionados com a modulação de funções imunes, como por exemplo, com a atividade de macrófagos, com o *burst oxidativo* de neutrófilos, com o edema de pata e com a pleurisia induzidos por carragenina (LAZZARINI et al., 2003; MASSOCO; PALERMO NETO, 1999; SILVA et al., 2003). Especificamente o aumento nos níveis de corticosterona induzidos pelo diazepam levaria a uma diminuição da resposta imune como, por exemplo, transcrição de citocinas, receptores para interleucinas, migração e quimiotaxia de eosinófilos e neutrófilos (GUYRE et al., 1988; SO et al., 2002; SUGIMOTO et al., 2003; VAN OVERVELD et al., 2003).

Em nossos experimentos, ao avaliarmos parâmetros imunes, verificamos uma diminuição tanto do número de leucócitos que migraram para o peritônio, como da liberação de NO por macrófagos peritoneais e do índice de espraçamento destas mesmas células; observamos, também, um aumento da atividade citotóxica de células NK. Assim, é possível sugerir que estes efeitos possam ser decorrentes quer de um possível aumento dos níveis séricos de corticosterona, ou, alternativamente de um efeito direto do diazepam sobre estas células. Por certo, não se pode excluir um efeito que envolva ambos mecanismos.

PBRs têm sido descritos, de forma bastante clara, também em células tumorais em cultura (HARDWICK et al., 1999; LANDAU et al., 1998) e biópsia de tumores humanos (GALIÈGUE et al., 2004; HAN et al., 2003). O TAE é um tumor experimental e a descrição da presença ou ausência deste receptor seria de grande importância para aprofundar e discutir dados relativos ao estudo do efeito do

diazepam sobre esta neoplasia. Assim, optou-se por realizar os estudos relacionados à busca destes receptores em células do TAE, utilizando-se de um protocolo de imunistoquímica e, também, de um protocolo de avaliação do receptor por Citometria de Fluxo.

Já foi descrita na literatura a presença de PBRs na adrenal, especialmente na região cortical (ZILZ et al., 1999). Decidiu-se, então, utilizar a adrenal de um animal não tratado e não inoculado com tumor como controle positivo para a reação de imunistoquímica para PBR. Como ilustrado na figura 17, observamos intensa marcação para este receptor na região cortical da adrenal. Mostramos também, e por vez primeira, intensa marcação deste receptor em células do TAE, principalmente na região nuclear (Figura 18). Diversos trabalhos têm mostrado a presença de PBR em células tumorais (MAASER et al., 2002; VENTURINI et al., 1999) e também a sua correlação com a malignidade de tumores (HAN et al., 2003; MAASER et al., 2002). Por outro lado, estudos têm mostrado de forma mais clara que a maior expressão destes receptores em tecidos tumorais é específica para cada tumor (HAN et al., 2003). Hardwick et al. (1999) mostraram que a localização do receptor pode ser correlacionada com o fenótipo maligno e agressivo de células do tumor de mama, já que células MDA-231 em cultura (com maior grau de malignidade) possuem este receptor localizado principalmente na região nuclear e células MCF-7 (com menor grau de malignidade) possuem este receptor localizado preferencialmente em região citoplasmática. O TAE é considerado um tumor bastante agressivo, composto por células bastante indiferenciadas e pleomórficas, com intensa atividade proliferativa (GUERRA, 1983). Desta forma, se a presença de PBRs em diversos tumores é amplamente descrita e se estes receptores são marcadores de malignidade, parece plausível sugerir que células do TAE, por

expressaream alta densidade deste receptor sejam, de fato, de alta malignidade. Neste sentido, os PBRs foram localizados principalmente na região nuclear, o que concorda com a observação realizada por Hardwick et al. (1999) sobre a localização de PBRs e a malignidade tumoral.

O estudo de PBRs por meio da Citometria de Fluxo, facilitou a quantificação destes receptores e permitiu a análise de uma população específica do TAE, como ilustrado nas figuras 20 e 21, quer nos grupos de animais tratados oralmente com diazepam (3,0 mg/kg/dia), quer nos grupos tratados com o veículo deste fármaco (0,1ml/10g/dia) por 7 dias. No entanto, como ilustrado na figura 19, os animais tratados com o diazepam apresentaram uma menor porcentagem deste receptor, quando comparados àqueles tratados com o veículo do diazepam. Há descrições informando que tumores como astrocitomas (MIETTINEN et al., 1995), linhagens celulares como linfomas (ALEXANDER; ROLLER; KLOTZ, 1992), tumores de mama, colo-retal e próstata (HAN et al., 2003) com maior densidade de PBRs são mais malignos e mais proliferativos. Estes dados discordam daqueles de nosso trabalho se correlacionarmos a diminuição da porcentagem de células do TAE positivas para PBR após o tratamento com diazepam, com o maior crescimento tumoral evidenciado pelo maior volume ascítico e pelo maior número de células tumorais em dos animais tratados oralmente com diazepam, 3,0mg/kg, por 7 dias. De fato, observamos uma correlação inversa, ou seja, o grupo de animais tratados com o diazepam apresentou menor porcentagem de marcação para PBR e maior crescimento tumoral, o que pode, em primeira análise, parecer controverso com a descrição da literatura.

Por outro lado, a diminuição da porcentagem de células marcadas para PBR pode ser explicada por meio dos conceitos de tolerância, onde doses repetidas do

fármaco podem induzir a uma diminuição da disponibilidade de receptores (GOMES; SHEN; STAFFORD; PATEL; YOBURN, 2002; GOODMAN et al., 2003; SALPETER; ORMISTON; SALPETER, 2004). Neste sentido, Lazzarini et al. (2003) mostraram que o diazepam administrado de forma prolongada (durante 21 dias) foi capaz de induzir tolerância farmacológica. Neste trabalho, os autores mostraram que os níveis plasmáticos de diazepam, em animais tratados prolongadamente com este fármaco, foram semelhantes àqueles obtidos após um tratamento agudo. Mais que isto, mostraram que nos animais tratados prolongadamente não se observaram os efeitos do diazepam sobre os níveis de corticosterona sérica e sobre o edema de pata induzido pela carragenina, fato observado após tratamento agudo. Desta forma, pode-se sugerir que em nossos experimentos o tratamento prolongado com diazepam 3,0mg/kg, por 7 dias, por via oral possa ter induzido tolerância, isto é, uma diminuição da porcentagem de células marcadas para PBRs.

Se este fato ocorreu, não se sabe. No entanto, persiste a constatação: observamos após o uso do diazepam um menor número de PBRs em células do TAE e um aumento do crescimento tumoral. Uma vez que nosso trabalho foi realizado *in vivo*, é possível que outras variáveis já discutidas (atividade de macrófagos, proliferação de linfócitos, liberação de interleucinas, etc.) possam ter corroborado para nossos achados após o diazepam. Neste sentido, uma somatória de efeitos diversos poderia vir a justificá-los, até mesmo uma ação direta do diazepam em PBR de células tumorais.

De fato, após a descrição dos PBRs em células do TAE, questionou-se a possibilidade de um efeito direto do diazepam sobre este receptor, que modularia, desta forma, a atividade proliferativa destas células. Na tentativa de elucidar esta questão, foram realizados experimentos *in vitro* que analisaram os efeitos do

Diazepam e do Ro5-4864 sobre o ciclo celular do TAE. As células do TAE analisadas *in vitro* mostraram uma menor porcentagem de células em fase G0-G1 (fase de repouso) quando tratadas com Diazepam (100nM, 300nM, 600nM, 1µM) e com Ro5-4864 (100nM, 300nM, 600nM, 1µM) (Figura 23) e uma maior porcentagem de células em fase S-G2-M (fase de metabolismo intenso e duplicação do conteúdo de DNA) quando tratadas com Diazepam (100nM, 300nM, 600nM e 1µM), e com Ro5-4864 (100nM, 300nM, 600nM) (Figura 24). Ou seja, estes dados mostram que ligantes de PBR como o diazepam e o Ro5-4864 foram capazes de aumentar a capacidade proliferativa das células do TAE, por agirem diretamente sobre estas células nas doses então utilizadas. Desta maneira, é possível sugerir que a existência de efeitos do diazepam sobre crescimento tumoral *in vivo* se dá, ao menos parcialmente em decorrência de uma ação direta deste fármaco sobre as células do TAE.

Neste sentido, teríamos que admitir que o número de PBR em células tumorais e a atividade de fármacos nestes receptores não estariam correlacionados de forma positiva. Esta hipótese é plausível, pois encontra apoio em diversos dados de literatura, relacionados a experimentos com órgão isolados, mostrando que número de receptores e a atividade de fármacos nestes receptores são fatos excludentes, não necessariamente correlacionados (GOMES et al., 2003, NITSCHKE et al. 2002)

Os trabalhos que mostram efeitos de ligantes de PBR sobre proliferação celular são controversos. Estudos *in vitro* como os de Carmel et al. (1999) verificaram que ligantes de PBR (PK11195 e Ro5-4864) inibiram em até 50% a proliferação de células de um tumor mamário humano (MCF-7) quando usado nas concentrações de 7µM e 70µM. Beinlich et al. (2000) demonstraram que ligantes de

PBR como diazepam, PK11195 e Ro5-4864 foram capazes de interferir de maneira diferente com a proliferação celular de tumor mamário humano BT-20: baixas doses (1 nM) causando um aumento de proliferação e altas doses (1 mM) levando a uma diminuição da mesma. É possível inferir que o aumento ou diminuição da proliferação de células tumorais esteja relacionado à concentração de ligantes utilizada nos experimentos, isto é, que doses maiores de ligantes sejam capazes de diminuir a proliferação (CARMEL et al., 1999; LANDAU et al., 1998) e as doses menores induzam a um aumento da proliferação (BEINLICH et al., 2000). É importante lembrar que em nosso estudo com células do TAE as concentrações de ligantes utilizadas nos ensaios de proliferação *in vitro* foram escolhidas com base na afinidade que estes ligantes possuem por células tumorais. Os ensaios de *binding* com células de tumor de mama mostraram que a afinidade pelos ligantes deste receptor se faz em concentrações nanomolares (BEINLICH et al., 1999; HARDWICK et al., 1999). Além disso, o ensaio de *binding*, com células de TAE, também mostrou que a afinidade do PK11195 ocorre em concentrações nanomolares.

A observação de que a afinidade de benzodiazepínicos pelos PBRs ocorre em concentrações baixas (nanomolares) e que os animais que foram tratados com diazepam, oralmente (3 mg/kg), durante 7 dias apresentaram maior crescimento tumoral (maior volume e número total de células tumorais presentes no líquido ascítico), levou-nos a avaliar *in vivo* os efeitos de um tratamento com doses menores de diazepam (0,3mg/kg e 1,0 mg/kg), pelo mesmo período. Observamos que os animais tratados com as doses de 0,3mg/kg e 1,0 mg/kg de diazepam não apresentaram um aumento do crescimento tumoral, visto que os parâmetros analisados nos animais tratados com o diazepam como ganho de peso (Figura 25), volume (Figura 26), número de células totais (Figura 27) e concentração (Figura 28)

não foram diferentes daqueles dos do grupo controle. Pode-se, assim concluir, que o efeito do tratamento com diazepam *in vivo* sobre crescimento tumoral seja, de fato, dependente da dose utilizada, sendo observado na dose de 3,0 mg/kg, mas não na dose de 0,3 mg/kg e 1,0 mg/kg. Resta saber se uma concentração ainda menor do fármaco produziria efeito diferente. Neste contexto, diante do amplo uso de benzodiazepínicos em pacientes portadores de tumor (SRIVASTAVA; WALSH, 2003; STIEFEL; BERNEY; MAZZOCATO, 2003), há que se encarar os presentes resultados com muita cautela, pois os efeitos do fármaco podem depender, dentre outros fatores, do tipo de tumor e da resposta imune do paciente.

Desta forma, tomando-se os dados deste trabalho em conjunto, pode-se dizer que o diazepam na dose de 3,0 mg/kg tenha aumentado o crescimento do TAE e diminuído a resposta imune inata, observada por meio da atividade dos macrófagos peritoneais. Parece-nos plausível excluir de nossos resultados a participação de linfócitos B, T helper e citotóxicos. Por outro lado, não foi possível precisar a relevância das células NK para o desenvolvimento do tumor. De qualquer forma, pode-se afirmar que há expressão de PBRs em células do TAE e que, desta forma, a existência de efeitos do diazepam sobre crescimento tumoral *in vivo* pode ser também atribuída e ao menos em parte, a uma ação direta deste fármaco sobre células do TAE.

7 CONCLUSÕES

- a. O tratamento com diazepam na dose de 3,0 mg/kg, por via oral, durante 7 dias aumentou o crescimento do TAE; mas não interferiu com as fases do ciclo celular do tumor.
- b. O tratamento com diazepam na dose de 3,0 mg/kg, por via oral, durante 2 dias, diminuiu a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal, a produção de NO e o índice de espraçamento; mas não interferiu com a produção de peróxido de hidrogênio e o índice de fagocitose.
- c. O tratamento com diazepam na dose de 3,0 mg/kg, por via oral, durante 2 dias e 7 dias não modificou o peso relativo do baço e a porcentagem de linfócitos esplênicos.
- d. O tratamento com diazepam na dose de 3,0 mg/kg, por via oral, durante 3 dias aumentou a citotoxicidade de células NK.
- e. O tratamento com diazepam na dose de 3,0 mg/kg, por via oral, durante 7 dias diminuiu a porcentagem de células do TAE marcadas para PBR.
- f. O tratamento com Diazepam e o Ro5-4864 *in vitro* aumentou a proliferação de células do TAE.

- g. O tratamento com diazepam na dose de 0,3 mg/kg e 1mg/kg, por via oral, durante 7dias não modificou o crescimento do TAE.

Estes dados tomados em seu conjunto mostram que o diazepam na dose de 3,0 mg/kg (mas não nas doses de 0,3mg/kg e 1,0 mg/kg) aumenta o crescimento do TAE. Sugere-se que este maior crescimento tumoral nos animais tratados com diazepam 3,0 mg/kg se deva, ao menos em parte, a uma diminuição da atividade de macrófagos (liberação de NO e índice de espraiamento); fato que ocorreria em decorrência de uma ação indireta - via glicocorticoides - ou de outra direta sobre os macrófagos. A presença de PBR em células tumorais e de efeitos do tratamento com diazepam *in vitro* sobre a proliferação do TAE sugerem que o aumento do crescimento tumoral observado após o tratamento *in vivo* pode ocorrer, também parcialmente, via ação direta do diazepam sobre células tumorais.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. 553 p.

ADAMS, D. O.; KAO, K. J.; FARB, R.; PIZZO, S. V. Effects mechanisms of cytolytically activated macrophages II secretion of a cytolytic factor by activated macrophages and its relationship to secreted neutral proteases. **The Journal of Immunology**, v. 124, n. 1, p. 293-300, 1980.

ALEXANDER, M. A.; BENNICELLI, J.; GUERRY, D. Defective antigen presentation by human melanoma cell lines cultured from advanced, but not biologically early disease. **The Journal of Immunology**, v. 142, n. 11, p. 4070-4078, 1989.

ALEXANDER, B. E. E.; ROLLER, E.; KLOTZ, U. Characterization of the peripheral-type benzodiazepine binding sites on human lymphocytes and lymphoma cell lines and their role in cell growth. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, n. 2, p. 269-274, 1992.

ALHO, H.; KOLMER, M.; HARJUNTAUSTA, T.; HELÉN, P. Increased expression of diazepam binding inhibitor in human brain tumors. **Cell Growth & Differentiation**, v. 6, n. 3, p. 309-314, 1995.

ANDERSEN, B. L.; FARRAR, W. B.; GOLDEN-KREUTZ, G. M.; GLASER, R.; EMERY, C. F.; CRESPIAN, T. R.; SHAPIRO, C. L.; CARSON, W. E. Psychological, behavioral, and immune changes after a psychological intervention: a clinical trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 17, p. 3570-3580, 2004.

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

BASHIR, M. E.; LOUIE, S.; SHI, H. N.; NAGLER-ANDERSON, C. Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 11, p. 6978-6987, 2004.

BEIDERBECK, A. B.; HOLLY, E. A.; STURKENBOOM, M. C.; COEBERGH, J. W.; STRICKER B. H.; LEUFKENS. H. G. No increased risk of non-Hodgkin's lymphoma with steroids, estrogens and psychotropics (Netherlands). **Cancer Causes Control**, v. 1, n. 7, p. 639-644, 2003.

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

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

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. E.; SORKIN, E. Immune-neuroendocrine interactions. **Journal of Immunology**, v. 135, n. 2, p. 750-754, 1985.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A.; SORKIN, E. Lymphokine-containing supernatants from con A-stimulated cells increase corticosterone blood levels. **Journal of Immunology**, v. 126, n. 1, p. 385-387, 1981.

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

BESSLER, H.; WEIZMAN, R.; GAVISH, M.; NOTTI, I.; DJALDETTI, M. Immunomodulatory effect of peripheral benzodiazepine receptor ligands on human mononuclear cells. **Journal Neuroimmunology**, v. 8, n. 1, p. 19-25, 1992.

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

BEVAN, M. J. Antigen recognition. Class discrimination in the world of immunology. **Nature**, v. 325, n. 6101, p. 192-194, 1987.

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

BLALOCK, J. E. The immune system as a sensory organ. **Journal of Immunology**, v. 132, n. 3, p. 1067-1070, 1984.

BODMER, W. F.; BROWNING, M. J.; KRAUSA, P.; ROWAN, A.; BICKNELL, D. C.; BODMER, J. G. Tumor escape from immune response by variation in HLA expression and others mechanisms. **Annals of the New York Academy of Sciences USA**, v. 690, p. 42-49, 1993.

BRAESTRUP, C.; SQUIRES, R. F. Specific benzodiazepine receptor in rat brain characterized by high affinity [³H] diazepam binding. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 74, n. 9, p. 3805-3809, 1977.

BRIBES, E.; CARRIERE, D.; GOUBET, C.; GALIEGUE, S.; CASELLAS, P.; SIMONY-LAFONTAINE, J. Immunohistochemical assessment of the peripheral benzodiazepine receptor in human tissues. **The journal of histochemistry and cytochemistry** . v. 52, n. 1, p. 19-28, 2004.

BROUG-HOLUB, E.; PERSOONS, J. H. A.; SCHORNAGEL, K.; MASTBERGEN, S. C.; KRAAL, G. Effects of stress on alveolar macrophages: a role for the sympathetic nervous system. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 19, n. 5, p. 842-848, 1998.

CALOGERO, A. E.; KAMILARES, T. C.; BERNARDINI, R.; JOHNSON, E. O.; CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. Effects of peripheral benzodiazepine receptor ligands on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in the rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 253, n. 2, p. 729-737, 1990.

CAO, L.; LAWRENCE, D. A. Suppression of host resistance to *Listeria monocytogenes* by acute cold/restraint stress: lack of direct IL-6 involvement. **Journal of Neuroimmunology**, v. 133, n. 1-2, p. 132-143, 2002.

CARLOMAGNO, C.; PERRONE, F.; LAURIA, R.; DE LAURENTIIS, M.; GALLO, C.; MORABITO, A.; PETTINATO, G.; PANICO, L.; BELLELLI, T.; APICELLA, A. Prognostic significance of necrosis, elastosis, fibrosis, and inflammatory cell resection in operable breast cancer. **Oncology**, v. 52, n. 4, p. 272-277, 1995.

CARMEL, I.; FARES, F. A.; LESCHINER, S.; SCHERÜBL, H.; WEISINGER, G.; GAVISH, M. Peripheral-type benzodiazepine receptors in the regulation of proliferation of MCF-7 human breast carcinoma cell line. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, n. 2, p. 273-278, 1999.

CASALOTTI, S. O.; PELAIA, G.; YAKOVLEV, A. G.; CSIKOS, T.; GRAYSON, D. R.; KRUEGER, K. E. Structure of the rat gene encoding the mitochondrial benzodiazepine receptor. **Gene**, v. 121, n. 2, p. 377-382, 1992.

CHANG, M. P.; CASTLE, S. C.; NORMAN, V. C. Suppressive effects of alprazolam of the immune response of mice. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 3, n. 2-3, p. 259-266, 1991.

CLEMENTE, C. G.; MIHM, M. C. JR.; BUFALINO, R.; ZURRIDA, S.; COLLINI, P.; CASCINELLI, N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. **Cancer**, v. 77, n. 7, p. 1303-1310, 1996.

CORDA, M. G.; FERRARI, M.; GUIDOTTI, A.; KONKEL, D.; COSTA, E. Isolation, purifications and partial sequence of a neuropeptide (diazepam-binding-inhibitor) precursor of an anxiogenic putative ligand for benzodiazepine recognition site. **Neuroscience Letters**, v. 47, n. 3, p. 310-324, 1984.

CORSI, L.; AVALLONE, R.; GEMINIANI, E.; COSENZA, F.; VONTURINI, I.; BARALDI, M. Peripheral benzodiazepine receptors in potatoes (*Solanum tuberosum*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, n. 1, p. 62-66, 2004.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.; ROBBINS, S. L. **Pathologic basis of disease**. 6. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1999. 1424 p.

COSTA, E.; GUIDOTTI, A.; MAO, C. C.; SURIA, A. New concepts on the mechanism of action of benzodiazepines. **Life Sciences**, v. 17, n. 2, p. 167-185, 1975.

DAGLI, M. L. Z. **Disseminação linfática do Tumor de Ehrlich**: estudo experimental. 1993. 162 f. Tese (Mestrado em Patologia Experimental) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

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

DEL REY, A.; KABIERSCH, A.; PETZOLDT, S.; BESEDOVSKY, H. O. Involvement of noradrenergic nerves in the activation and clonal deletion of T cells stimulated by superantigen in vivo. **Journal of Neuroimmunology**, v. 127, n. 1-2, p. 44-53. 2002.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; GRAYCAR, J.; DERYNCK, R.; STUEHR, D. J.; SRIMAL, S. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors- β 1, - β 2 and - β 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN- γ . **The Journal of Immunology**, v. 145, n. 3, p. 940-944, 1990.

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

DOBLE A New insights into the mechanism of action of hypnotics. **Journal of psychopharmacology**, v. 13, n. 4, p. S11-20, 1999. Supplement 1.

DONG, Z.; O'BRIAN, C. A.; FIDLER, I. J. Activation of tumoricidal properties in macrophages by lipopolysaccharide requires protein tyrosine kinase activity. **Journal Leukocyte Biology**, v. 131, n. 5, p. 2362-2366, 1993

DUBLIN, S.; ROSSING, M. A.; HECKBERT, S. R.; GOFF, B. A.; WEISS, N. S. Risk of epithelial ovarian cancer in relation to use of antidepressants, benzodiazepines, and other centrally acting medications. **Cancer Causes Control**, v. 13, n. 1, p. 35-45, 2002.

DUNN, A. J.; WANG, J. Cytokine effects on CNS biogenic amines. **Neuroimmunomodulation**, v. 2, n. 6, p. 319-328, 1995.

ELGERT, K. D.; ALLEVA, D. G.; MULLINS, D. W. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 64, n. 3, p. 287-289, 1998.

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

FECCHIO, D.; RUSSO, M.; SIROIS, P.; BRAQUET, P.; JANCAR, S. Inhibition of Ehrlich ascites tumor *in vivo* by PAF antagonists. **International Journal Immunopharmacology**, v. 12, n. 1, p. 57-65, 1990a.

FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M.; JANCAR, S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich Tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, v. 14, n. 1, p. 125-132, 1990b.

FELTEN, D. L.; FELTEN, S. Y.; BELLINGER, D. L.; CARLSON, S. L.; ACKERMAN, K. D.; MADDEN, K. S.; OLSHOWKA, J. A.; LIVNAT, S. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. **Immunology Reviews**, v. 100, p. 225-260, 1987.

FERRERO, P.; COSTA, E.; CONTI-TRONCONI, B.; GUIDOTTI, S. A diazepam binding inhibitor (DBI) like neuropeptide is detected in human brain. **Brain Research**, v. 399, n. 1, p. 136-142, 1986.

FERZAZ, B.; BRAULT, E.; BOURLIAUD, G.; ROBERT, J. P.; POUGHON, G.; CLAUSTRE, Y.; MARGUET, F.; LIERE, P.; SCHUMACHER, M.; NOWICKI, J. P.; FOURNIER, J.; MARABOUT, B.; SEVRIN, M.; GEORGE, P.; SOUBRIE, P.; BENAVIDES, J.; SCATTON, B. SSR180575 (7-chloro-N,N,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4H-pyridazino[4,5-b]indole-1-acetamide), a peripheral benzodiazepine receptor ligand, promotes neuronal survival and repair. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 301, n. 3, p. 1067-1078, 2002.

FIDLER, I. J. Macrophages and metastasis – a biological approach to cancer therapy. **Cancer Research**, v. 45, p. 4714-4723, 1985.

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

GALIÈGUE, S.; CASELLAS, P.; KRAMAR, A.; TINEL, N.; SIMONY-LAFONTAINE, J. Immunohistochemical assessment of the Peripheral Benzodiazepine Receptor in breast cancer and its relationship with survival. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 6, p. 2058-5264, 2004.

GARIB, V.; NIGGEMANN, B.; ZANKER, K. S.; BRANDT, L.; KUBENS B. S. Influence of non-volatile anesthetics on the migration behavior of the human breast cancer cell line MDA-MB-468. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 46, n. 7, p. 836-844, 2002.

GARNIER, M.; BOUJRAD, N.; OGWUEGBU, S.; HUDSON JR, J. R., PAPADOPOULOS, V. The polypeptide diazepam-binding inhibitor and a higher affinity mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor sustain constitutive steroidogenesis in the R2C Leydig tumor cell line. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 35, p. 22105-22112, 1994.

GARRIDO, F.; CABRERA, T.; CONCHA, A.; GLEW, S.; RUIZ-CABELLO, F.; STERN, P. L. A. Natural history of HLA expression during tumor development. **Immunology Today**, v. 14, n. 10, p. 491-499. 1993.

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

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

GOMES, B. A.; SHEN, J.; STAFFORD, K.; PATEL, M.; YOBURN, B. C. Mu-opioid receptor down-regulation and tolerance are not equally dependent upon G-protein signaling. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 72, n. 1-2, p. 273-278, 2002.

GOODMAN, L. S.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. **Pharmacological basis of therapeutics**. 10 ed. New York: McGraw-Hill, 2001. 2148 p.

GRAY, P. W.; GLAISTER, D.; SEEBURG, P. H.; GUIDOTTI, A.; COSTA, E. Cloning and expression of cDNA for human diazepam binding inhibitor, a natural ligand of an allosteric regulatory site of the γ -aminobutyric acid type A receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 83, n. 19, p. 7547-7541, 1986.

GUERRA, J. L. **Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores de tumor de Ehrlich**. 1993. 79 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

GUYRE, P. M.; GIRARD, M. T.; MORGANELLI, P. M.; MANGANIELLO, P. D. Glucocorticoid effects on the production and actions of immune cytokines. **Journal of steroid biochemistry**, v. 30, n. 1-6, p. 89-93, 1988.

HAMILTON, T.; ADAMS, D. O. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. **Immunology Today**, v. 8, n. 5, p. 151-158, 1987.

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

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

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

HART, B L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 12, n. 2, p. 123-137, 1988.

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

HENRICKS, P. A. J.; VAN ESCH, B.; VAN OOSTERHOUT, A. J. M.; NIJKAMP, F. P. Specific and non-specific effects of β -adrenoceptor agonists on guinea pig alveolar macrophages function. **European Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 3, p. 321-330, 1988.

HERNANDEZ-REIF, M.; IRONSON, G.; FIELD, T.; HURLEY, J.; KATZ, G.; DIEGO, M.; WEISS, S.; FLETCHER, M. A.; SCHANBERG, S.; KUHN, C.; BURMAN, I. Breast cancer patients have improved immune and neuroendocrine functions following massage therapy. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 57, n. 1, p. 45-52, 2004.

IWAKABE, K.; SHIMADA, M.; OHTA, A.; YAHATA, T.; OHMI, Y.; HABU, S.; NISHIMURA, T. The restraint stress drives a shift in Th1/Th2 balance toward Th2-dominant immunity in mice. **Immunology Letters**, v. 62, n. 1, p. 39-43, 1998.

JIANG, H.; STEWART, C. A.; FAST, D. J.; LEU, R. W. Tumor target derived soluble factors synergizes with IFN γ and IL-2 to activate macrophage for tumor necrosis factor and nitric oxide production to mediate cytotoxicity of the same target. **The Journal of Immunology**, v. 149, n. 6, p. 2137-2146, 1992.

KATZ, Y.; BEN-BARUCH, G.; KLOOG, Y.; MENCZER, J.; GAVISH, M. Increased density of peripheral benzodiazepine-binding sites in ovarian carcinomas as compared with benign ovarian tumours and normal ovaries. **Clinical Science**, v. 78, n. 2, p. 155-158, 1990.

KELLEY, K. W.; BLUTHE, R. M.; DANTZER, R.; ZHOU, J. H.; SHEN, W. H.; JOHNSON, R. W.; BROUSSARD, S. R. Cytokine-induced sickness behavior. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 17, p. S112-S118, 2003. Supplement1

KENT, S.; BLUTHE, R. M.; DANTZER, R.; HARDWICK, A. J.; KELLEY, K. W.; ROTHWELL, N. J.; VANNICE, J. L. Different receptor mechanisms mediate the pyrogenic and behavioral effects of interleukin 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 19, p. 9117-9120, 1992.

KLEEB, S. R. **Efeito do haloperidol sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos**. 1997. 83 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

KLETSAS, D.; LI, W.; HAN, Z.; PAPADOPOULOS, V. Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) and PBR drug ligands in fibroblast and fibrosarcoma

cell proliferation: role of ERK, c-Jun and ligand-activated PBR-independent pathways. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, n. 10, p. 1927-1932, 2004.

KLIMP, A. H.; DE VRIES, E. G. E; SCHERPHOF, G. L.; DAEMEN, T. A potencial role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 44, n. 2, p. 143-161, 2002.

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

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

LACAPERE, J. J.; PAPADOPOULOS, V. Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. **Steroids**, v. 68, n. 7-8, p. 569-585, 2003.

LANDAU, O.; GAVISH, M.; BRENNER, S.; NORDENBERG, J. Antiproliferative and differentiating effects of benzodiazepine receptor ligands on B16 melanoma cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, n. 8, p. 1029-1034, 1998.

LAZZARINI, R. **Efeitos do diazepam sobre a resposta inflamatória aguda em ratos**. 2003. 170 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

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

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

LAZZARINI, R.; PAULINO, C. A.; PALERMO-NETO, J. Effects of high doses of diazepam on carrageenin-induced paw edema in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 11, p. 1525-1529, 1996.

LEWIS, J. S.; LANDERS, R. J.; UNDERWOOD, J. C.; HARRIS, A. L.; LEWIS, C. E. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. **The Journal of Pathology**, v. 192, n. 2, p. 150-158, 2000.

LI, S.; WANG, Y.; MATSUMURA, K.; BALLOU, L.R.; MORHAM, S. G.; BLATTEIS, C. M. The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2^{-/-}, but not in cyclooxygenase-1^{-/-} mice. **Brain Research**, v. 825, n. 1-2, p. 86-94, 1999.

LICINIO, J.; FROST, P. The neuroimmune-endocrine axis: pathophysiological implications for the central nervous system cytokines and hypothalamus-pituitary-adrenal hormone dynamics. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 10, p. 1141-1148, 2000.

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

LOEWENTHAL, H.; JAHN, G. Übertragungsversuch mit carcinomatöser Mause-ascitesflüssigkeit und ihr verhalten gegen physikalische und chemische Einwirkungen. **K. Krebsforsch**, v. 37, p. 439-447, 1932.

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

MADDEN, K. S.; FELTEN, D. L. Experimental basis for neural-immune interactions. **Physiology Reviews**, v. 75, n. 1, p. 77-106, 1995

MAIER, S. F. Bi-directional immune-brain communication: Implications for understanding stress, pain and cognition. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 17, n. 2, p. 69-85, 2003.

MARCUSSEON-STAHN, M.; CEDERBRANT, K. A flow cytometric NK-cytotoxicity assay adapted for use in rat repeated dose toxicity studies. **Toxicology**, v. 193, n. 3, p. 269-279, 2003.

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

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

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

MIETTINEN, H.; KONONEM, J.; HAAPASALO, H.; HELLEN, P.; SALLINEM, P.; HARJUNTAUSTA, T.; HELIN, H.; ALHO, H. Expression of peripheral-type benzodiazepine receptor and diazepam binding inhibitor in human astrocytomas: relationship to cell proliferation. **Cancer Research**, v. 55, n. 12, p. 2691-2695, 1995.

MIYAZAWA, N.; HAMEL, E.; DIKSIC, M. Assessment of the peripheral benzodiazepine receptors in human gliomas by two methods. **Journal of neuro-oncology**, v. 38, n. 1, p. 19-26, 1998.

MONDAL, T. K.; BHATTA, D.; BISWAS, S.; PAL, P. Superantigen-induced apoptotic death of tumor cells is mediated by cytotoxic lymphocytes, cytokines, and nitric oxide. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 290, n. 4, p. 1336-1342, 2002.

MORAFO, V.; SRIVASTAVA, K.; HUANG, C. K.; KLEINER, G.; LEE, S. Y.; SAMPSON, H. A.; LI, A. M. Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential Th2-Th1 responses in C3H/HeJ and BALB/C mice. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 5, p. 1122-1128, 2003.

MORETTA, L.; MINGARI, M. C.; BOTTINO, C.; PENDE, D.; BIASSONI, R.; MORETTA, A. Cellular and molecular basis of natural killer and natural killer-like activity. **Immunology Letters**, v. 88, n. 2, p. 89-93, 2003.

NITSCHKE, J. F.; SCHULLER, A. G.; KING, M. A.; ZENGH, M.; PASTERNAK, G. W.; PINTAR, J. E. Genetic dissociation of opiate tolerance and physical dependence in delta-opioid receptor-1 and preproenkephalin knock-out mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 24, p. 10906-10913, 2002.

PACHECO-LÓPEZ, G.; NIEMI, M. B.; KOU, W.; BILDHÄUSER, A.; GROSS, C. M.; GOEBEL, M. U.; DEL REY, A.; BESEDOVSKY, H.O. Central catecholamine depletion inhibits peripheral lymphocyte responsiveness in spleen and blood. **Journal of Neurochemistry**, v. 86, n. 4, p. 1024-1031, 2003.

PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C. O.; FÁVARE, R. C. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity and Ehrlich tumor growth **Neurotoxicology and Teratology**, v. 23, n. 5, p. 497-507, 2001.

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

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

PAPADOPOULOS, V.; AMRI, H.; LI, H.; BOUJRAD, N.; VIDIC, B.; GARNIER, M. Targeted disruption of the peripheral-type benzodiazepine receptor gene inhibits steroidogenesis in the Leydig tumor cell line. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 51, p. 32129-32135, 1997.

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

PICK, E.; KEISARY, Y. A simple colorimetric method for the measurement hydrogen peroxide produce by cell in culture. **Journal of Immunological Methods**, v. 38, n. 1-2, 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 of Immunological Methods**, v. 46, n. 2, p. 211-226, 1981.

PORTELA, C. P.; MASSOCO, C. O.; LIMA, W.T.; PALERMO-NETO, J. Stress-induced increment on total bronchoalveolar cell count in OVA-sensitized rats. **Physiology & Behavior**, v. 72, n. 3, p. 415-420, 2001.

PORTELA, C. P.; TIBERIO, I. DE F.; LEICK-MALDONADO, E. A.; MARTINS, M. A.; PALERMO-NETO, J. Effects of diazepam and stress on lung inflammatory response in OVA-sensitized rats. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 282, n. 6, p. L1289-95, 2002.

RABINOVITCH, M.; DeSTEFANO, M. J. Macrophage spreading in vitro. I. Inducers of spreading. **Experimental cell research**, v. 77, n. 1, p. 323-334, 1973.

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

RILKE, F.; COLNAGHI, M. I.; CASCINEKKI, N.; ANDREOLA, S.; BALDINI, M. T.; BUFALINO, R.; DELLA PORTA, G.; MENARD, S.; PIEROTTI, M. A.; TESTORI, A. Prognostic significance of HER-2/NEU expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. **International Journal of Cancer**, v. 49, n. 1, p. 44-49, 1991.

RIOND, J.; MATTEI, M. G.; KAGHAD, M.; DUMONT, X.; GUILLEMOT, J. C.; LE FUR, G.; CAPUT, D.; FERRARA, P. Molecular cloning and chromosomal localization of a human peripheral-type benzodiazepine receptor. **European Journal of Biochemistry**, v. 195, n. 2, p. 305-311, 1991.

ROTHWELL, N. J., HOPKINS, S. J. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. **Trends in Neurosciences**, v. 18, n. 3, p. 130-136, 1995.

RUGG, E. L.; BARNETT, D. B.; NAHORSKI S. R. Coexistence of beta-1 and beta-2 adrenoceptors in mammalian lung: evidence from direct binding studies. **Molecular Pharmacology**, v. 14, n. 6, p. 996-1005, 1978.

RUSSO, M.; TEIXEIRA, H. C.; MARCONDES, M. C.; BARBUTO, J. A. Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 22, n. 10, p. 1271-1273, 1989.

SALPETER, S. R.; ORMISTON, T. M.; SALPETER, E. E. Meta-analysis: respiratory tolerance to regular beta2-agonist use in patients with asthma. **Annals of Internal Medicine**, v. 140, n. 10, p. 802-813, 2004.

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

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

SCHLUMPF, M.; LICHTENSTEIGER, W.; RAMSEIER, H. Diazepam treatment of pregnant rats differentially affects interleukin-1 and interleukin-2 secretion in their offspring during different phases of postnatal development. **Pharmacology & toxicology**, v. 73, n. 6, p. 335-340, 1993.

SCHLUMPF, M.; PARMAR, R.; BUTIKOFER, E. E.; INDERBITZIN, S.; SALILI, A. R.; SCHREIBER, A. A.; RAMSEIER, H. R.; VAN LOVEREN, H.; LICHTENSTEIGER, W. Delayed developmental neuro- and immunotoxicity of benzodiazepines - Review. **Archives of toxicology. Supplement**, v. 17, p. 261-87, 1995.

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

SCHREIBER, A. A.; FREI, K.; LICHTENSTEIGER, W.; SCHLUMPF, M. Alterations in interleukin-6 production by LPS and ConA-stimulated mixed splenocytes, spleen macrophages and lymphocytes in prenatally diazepam-exposed rats. **Agents Actions**, v. 39, n. 3-4, p. 166-73, 1993.

SILVA, F. R.; LAZZARINI, R.; SÁ-ROCHA, L. C.; MORGULIS, M. S. F. A.; MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J. Effects of acute and long-term diazepam administrations on neutrophil activity: a flow cytometric study. **European Journal of Pharmacology**, v. 478, n. 2-3, p. 97-104, 2003.

SILZLE, T.; KREUTZ, M.; DOBLER, M. A.; BROCKHOFF, G.; KNUECHEL, R.; KUNZ-SCHUGHART, L. A. Tumor-associated fibroblasts recruit blood monocytes into tumor tissue. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 5, p. 1311-1320, 2003.

SNYDER, S. H.; MCENERY, M. W.; VERMA, A. Molecular mechanisms of peripheral benzodiazepine receptors. **Neurochemical Research**, v. 15, n. 2, p. 119-123, 1990.

SO, E. Y.; KIM, S. H.; PARK, H. H.; CHO, B. S.; LEE, C. E. Corticosteroid inhibits IL-4 signaling through down-regulation of IL-4 receptor and STAT6 activity. **FEBS Letters**, v. 518, n. 1-3, p. 53-59, 2002.

SOMMERS, J. D.; MASTIN, J. D.; ADAMS, D. O. The binding of tumor cells by murine mononuclear phagocytes can be divided with two qualitatively distinct types. **The Journal of Immunology**, v. 131, n. 4, p. 2086-2093, 1983.

SOTOMAYOR, E. M.; DINAPOLI, M. R.; CALDERON, C.; COLSKY, A.; FU, Y. X.; LOPEZ, D. M. Decreased macrophage-mediated cytotoxicity in mammary-tumor-bearing mice is related to alteration of nitric-oxide production and/or release. **International Journal of Cancer**, v. 60, n. 5, p. 660-667, 1995.

SPECTOR, D. L.; GOLDMAN, R. D.; LEINWAND, L. A. Apoptosis assays. **In: Cells, a laboratory manual culture and biochemical analysis of cells**. New York: Ed Cold Spring Harbor, 1998. v.1, capítulo 15.

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

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

STRANGE, K. S.; KERR, L. R.; ANDREWS, H. N.; EMERMAN, J. T.; WEINBERG, J. Psychosocial stressors and mammary tumor growth: an animal model. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 22, n. 1, p. 89-102, 2000.

SUGIMOTO, Y.; OGAWA, M.; TAI, N.; KAMEI, C. Inhibitory effects of glucocorticoids on rat eosinophil superoxide generation and chemotaxis. **International Immunopharmacology**, v. 3, n. 6, p. 845-852, 2003.

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

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

TOOMEY, D.; HARMEY, J.; CONDRON, C.; KAY, E.; BOUCHIER-HAYES, D. Phenotyping of immune cell infiltrates in breast and colorectal tumours. **Immunological investigations**, v. 28, n. 1, p. 29-41, 1999.

H

TSUNAWAKI, S.; NATHAN, C. F. Macrophage deactivation altered kinetic properties of superoxide production enzyme after exposure to tumor cell conditioned medium. **Journal Experimental Medicine**, v. 164, n. 4, p. 1319-1331, 1986.

TSUNAWAKI, S.; SPORN, M.; NATHAN, C. F. Comparison of transforming growth factor- β and a macrophage-deactivating polypeptide from tumor cells. **The Journal of Immunology**, v. 142, n. 10, p. 3462-3468, 1989.

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

VAN OVERVELD, F. J.; DEMKOW, U. A.; GORECKA, D.; ZIELINSKI, J.; DE BACKER, W. A. Inhibitory capacity of different steroids on neutrophil migration across a bilayer of endothelial and bronchial epithelial cells. **European journal of pharmacology**, v. 477, n. 3, p. 261-267, 2003.

VENTURINI, I.; ALHO, H.; PODKLETNOVA, I.; CORSI, L.; RYBNIKOVA, E.; PELLICCI, R.; BARALDI, M.; PELTO-HUIKKO, M.; HÉLEN, P.; ZENEROLI, M. L. Increased expression of peripheral benzodiazepine receptors and diazepam binding inhibitor in human tumors sited in the liver. **Life Sciences**, v. 65, n. 21, p. 2223-2231, 1999.

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

VGENOPOULOU, S.; LAZARIS, A. C.; MARKOPOULOS, C.; BOLTETSOU, E.; KYRIAKOU, V.; KAVANTZAS, N.; PATSOURIS, E.; DAVARIS, P. S. Immunohistochemical evaluation of immune response in invasive ductal breast cancer of not-otherspecified type. **Breast**, v. 12, n. 3, p. 172-178, 2003.

VERMA, A.; NYE, J.S.; SNYDER, S. H. Porphyrins are endogenous ligands for the mitochondrial (peripheral-type) benzodiazepine receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 84, n.8, p. 2256-2260, 1987.

VERMA, A.; SNYDER, S. H. Characterization of porphyrin interactions with peripheral type benzodiazepine receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 34, n. 8, p. 800-805, 1988.

WATANABE, Y.; LAI, R. T.; YOSHIDA, H. The beta-adrenoreceptor in human lymphocytes. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 8, n. 3, p. 273-276, 1981.

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

YANG, E. V.; GLASER, R. Stress-induced immunomodulation: implications for health. **International Immunopharmacology**, v. 2, n. 2-3, p. 315-324, 2002.

YANG, E. V.; GLASER, R. Stress-induced immunomodulation: implications for tumorigenesis. **Brain. Behavior, and Immunity**, v. 17, p. S37-S40, 2003. Supplement 1.

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

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

ZHANG, Y.; DEWITT, D. L.; MCNEELY, T. B.; WAHL, S. M.; WAHL, L. M. Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the production of monocyte prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinases. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 5, p. 894-900, 1997.

ZHOU, D.; KUSNECOV, A. W.; SHURIN, M. R.; DePAOLI, M. Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin-6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal-axis. **Endocrinology**, v. 133, n. 6, p. 2523-2530, 1993.

ZILZ, A.; LI, H.; CASTELLO, R.; PAPADOPOULOS, V.; WIDMAIER, E. P. Developmental expression of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the advent of steroidogenesis in rat adrenal glands. **Endocrinology**, v. 140, n. 2, p. 859-864, 1999.

ZIRESTER, D.; M.; WILLIAMS, C. Peripheral-type benzodiazepine receptors. **General Pharmacology**, v. 29, n. 3, p. 305-314, 1997.