DARIO ABBUD RIGHI

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CIALOTRINA
SOBRE A ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS
PERITONEAIS DE RATOS**

**São Paulo
2006**

DARIO ABBUD RIGHI

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CIALOTRINA
SOBRE A ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS
PERITONEAIS DE RATOS**

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

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. João Palermo Neto

**São Paulo
2006**

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1689 FMVZ	<p>Righi, Dario Abbud</p> <p>Efeitos da administração de cialotrina sobre a atividade de macrófagos peritoneais de ratos / Dario Abbud Righi. -- São Paulo: D. A. Righi, 2006. 152 f. : il.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2006.</p> <p>Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada. Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. João Palermo Neto.</p> <p>1. Piretróide tipo II. 2. Cialotrina. 3. Macrófago (atividade). 4. Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. I. Título.</p>
----------------	---

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 da administração de cialotrina sobre a atividade de macrófagos peritoneais de ratos. Parte II: mecanismo de ação", protocolo nº571/2004, utilizando 200 ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Palermo Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Effects of cyhalothrin administration on peritoneal macrophage activity of rats. Part II: mechanism of action", protocol number 571/2004, utilizing 200 rats, under the responsibility of Prof. Dr. João Palermo Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 15 de fevereiro de 2005

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: RIGHI, Dario Abbud

Título: Efeitos da administração de cialotrina sobre a atividade de macrófagos peritoneais de ratos.

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Esta tese foi realizada no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processos números: 03/06538-0 (bolsa de doutorado) e 04/14128-0 (projeto temático).

Aos meus pais, Prof. Dr. Gilberto Righi e Profa. Dra. Lourdes Abbud Righi e aos meus irmãos. Eles foram minha fonte de inspiração e meu apoio. Dedico a eles um “pedaço” da minha vida, pois sem eles eu não teria chegado até aqui, e porque a família é o bem mais precioso que um ser humano pode possuir.

À Fabiana, pois estar ao seu lado é sempre uma fonte infinita de momentos memoráveis de paz. Se existe uma “cara metade” você é ela.

Ao mestre, amigo e pai científico Prof. Dr. João Palermo-Neto que além de me aceitar de volta de braços abertos, despertou o meu desejo de aprender e me ensinou muito mais do que pesquisa. Conviver contigo por todos estes anos, têm sido uma fonte inesgotável de conhecimento.

- À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP, local de realização do curso de pós-graduação, e porque nada é melhor do que se sentir em casa.
- Aos Professores do Departamento de Patologia, que permitiram e auxiliaram a realização deste trabalho.
- Aos funcionários do Departamento, especialmente aos funcionários do biotério e do laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia, sem os quais essa tese jamais teria acontecido.
- Ao grupo de Neuroimunomodulação, que além de auxiliar a realização do trabalho, proporcionou muitas risadas e discussões sobre diversos temas.
- A todo o pessoal da pós pela deliciosa convivência.
- Ao Instituto Butantan de São Paulo, pela doação do Onco-BCG.
- Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP e da biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas - USP, pela dedicação e apoio a esta tese.

“What is there that is not poison? All things are poisons and nothing (is) without poison. Solely the dose determines that a thing is not a poison”.

Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim-Paracelsus (1493-1541)

“You too can be a toxicologist in two easy lessons, each of ten years.”

Arnold Lehman (1955)

RESUMO

RIGHI, D. A. **Efeitos da administração de cialotrina sobre a atividade de macrófagos peritoneais de ratos.** [Effects of cyhalothrin administration on peritoneal macrophage activity of rats]. 2006. 152 f Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Os piretróides sintéticos, em especial os do tipo II, como a cialotrina, são extensivamente utilizados para o controle de uma ampla variedade de ectoparasitas que acometem os animais de produção. Entretanto, no Brasil e em outros países, sua utilização vai além da saúde animal, sendo utilizados também em saúde pública, no controle de diversos vetores, como é o caso do vetor da dengue, dentre outros. Visto que a cialotrina modifica a atividade de macrófagos peritoneais, o objetivo deste trabalho foi investigar os prováveis mecanismos através dos quais este piretróide modifica a atividade destas células. Os presentes resultados, analisados em seu conjunto, mostram de maneira inequívoca que a cialotrina tem um efeito direto e/ou indireto sobre a atividade de macrófagos peritoneais. Especificamente, observou-se neste trabalho que o praguicida causou em ratos: **1** – marcação fos positiva em neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (NPH), após a dose de 3,0 mg/kg/dia; **2** - diminuição do percentual e intensidade de fagocitose de macrófagos peritoneais ativados e avaliados por citometria de fluxo; **3** - diminuição dose-dependente da produção de nitrito (NO_2^-); **4** – diminuição do percentual e intensidade de fagocitose de macrófagos peritoneais ativados, em ratos adrenalectomizados e/ou tratados com metirapona (inibidor da síntese de corticosterona) e RU 486 (antagonista de receptores glicocorticóides) com a finalidade de modular os níveis de glicocorticóides, e tratados com 3,0 mg/kg/dia de cialotrina; **5** – aumento dos níveis de noradrenalina hipotalâmica em animais tratados com a dose de 3,0mg/kg/dia de cialotrina; **6** - diminuição do percentual e intensidade de fagocitose, bem como diminuição da produção de nitrito de macrófagos peritoneais ativados, em ratos simpatectomizados quimicamente com 6-OHDA; **7** - diminuição dose dependente do percentual e intensidade de fagocitose, bem como da produção de nitrito de macrófagos peritoneais ativados e tratados *in vitro* com 10 e 100 nM

de cialotrina. No entanto, não observamos: **1** – alterações na produção de nitrito realizada por macrófagos peritoneais ativados, em ratos adrenalectomizados e/ou tratados com metirapona e RU 486; **2** - alterações na viabilidade celular induzida pelo tratamento *in vitro* com a cialotrina na concentração de 10 e 100 nM e **3** – alterações nos efeitos da cialotrina sobre a atividade de macrófagos tratados *in vitro* com os ligantes de receptores benzodiazepínicos periféricos. Em conjunto, os presentes dados mostram que a cialotrina interfere com a atividade de macrófagos por atuar indiretamente, através da ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA), e/ou diretamente sobre os mesmos modulando sua atividade. É muito provável que o efeito resultante do tratamento *in vivo* com este praguicida esteja ligado à somatória destas ações.

Palavras chave: Piretróide tipo II, Cialotrina, macrófago, atividade, Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal.

ABSTRACT

RIGHI, D. A. **Effects of cyhalothrin administration on peritoneal macrophage activity of rats.** [Efeitos da administração de cialotrina sobre a atividade de macrófagos peritoneais de ratos]. 2006. 152 f Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Synthetic pyrethroids, particularly those of type II, such as cyhalothrin, are extensively used in agriculture for the control of a broad range of ectoparasites in farm animals. However, in Brazil and some other countries, these pyrethroids have also been used in public health, for the control of insects that are known to be vectors of diseases such as dengue. Since it has been suggested that cyhalothrin alters activity of peritoneal macrophages, the objective of our study was to investigate the putative mechanisms for the changes induced by pyrethroid in these cells. The results presented here show, in an unequivocal manner, that cyhalothrin has a direct or indirect (or both) effect on the activity of peritoneal macrophages. We specifically observed in this work that this pesticide induced in rats: **1**- Fos-positive immunostaining in neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (NPH), after 3.0 mg/kg/day; **2** – a reduction in the percentage and intensity of phagocytosis by activated peritoneal macrophages, evaluated by flow cytometry; **3** – a dose-dependent reduction in nitrite production (NO_2^-); **4** – a reduction in the percentage and intensity of phagocytosis by activated peritoneal macrophage from adrenalectomized rats treated or not with metirapone (inhibitor of corticosterone synthesis) or RU 486 (antagonist of glucocorticoids receptors) with the propose of modulating the levels of glucocorticoids, and treated with 3.0 mg/kg/day of cyhalothrin; **5** – an increase in the hypothalamic levels of noradrenaline in rats treated with 3.0 mg/kg/day of cyhalothrin; **6** – a reduction in the percentage and intensity of phagocytosis and also a decrease in the production of nitrite by activated peritoneal macrophages, after chemical sympatectomy with 6-OHDA; **7** – a dose-dependent reduction of the percentage and intensity of phagocytosis, and also a decrement in nitrite production by activated peritoneal macrophages treated *in vitro* with 10 and 100 nM of cyhalothrin. However, we found no

differences on: **1** – nitrite production by activated peritoneal macrophages after adrenalectomy, treated or not with metirapone or RU 486; **2** –cell viability of peritoneal macrophages treated *in vitro* with 10 and 100 nM of cyhalothrin, and **3** – the effects of cyhalothrin on macrophage activity after *in vitro* treatment with peripheral benzodiazepine receptor ligands. Altogether, the present results show that cyhalothrin interferes with the activity of peritoneal macrophages by acting indirectly, via activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, or directly on these cells, altering their activity. As a matter of fact, it is quite possible that the results of *in vivo* cyhalothrin treatment on macrophage activity would be related to the combined effect of these direct and indirect influences.

Key words: Type II pyrethroid, Cyhalothrin, Macrophage activity, Hypothalamus-pituitary-adrenals axis

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μmol	micromol
6-OHDA	6 hidroxidopamina
ACTH	adrenocorticotropina
BCG	bacilo calmet guerin
BDZs	benzodiazepínicos
BLA	baso lateral da amígdala
CBR	receptores benzodiazepínicos centrais
COX	ciclooxigenase
CR3	complemento R 3
CRF	fator liberador de corticotrofina
CRH	hormônio liberador de corticotropina
CS	coreotetose e salivação
CV	coeficiente de variação
DCFH-DA	2'7' diacetato de diclorofluoresceína
DHBA	3,4 diidroxibenzilamina
DL ₅₀	dose letal cinquenta por cento
EDTA	etilenodiamina-tetra-acético
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FSC	<i>forward scatter</i>
GABA	ácido gama-aminobutírico
GMP	guanosina cíclica monofosfato
HHA	hipotálamo-hipófise-adrenal
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
i.p.	intraperitoneal
ICAM-1	molécula de adesão intracelular 1
IFN	interferon
IL	interleucina
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
kg	kilogramas
LCE	labirinto em cruz elevado
LFA-1	antígeno associado a função de linfócitos 1
MFR	receptores para manose/fucose
mg	miligramas
NK	natural killer
NE	noradrenalina
nM	nano molar
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
NO	óxido nítrico
NO ₂ ⁻	nitrito

NOEL	<i>No observed effect level</i>
NOs	óxido nítrico sintase
NPH	núcleo paraventricular do hipotálamo
OVA	ovalbumina
PB	tampão fosfato
PBR	receptor benzodiazepínico periférico
PBS	solução salina tamponada
PI	iodeto de propídeo
PMA	miristato-acetato de forbol
PTZ	pentilenotretazole
SI	sistema imune
SNAS	sistema nervoso autônomo simpático
SNC	sistema nervoso central
SSC	<i>side scatter</i>
T	tremor
TNF - α	fator de necrose tumoral - alfa
TSH	hormônio estimulador da tireóide
USP	Universidade de São Paulo
v.o.	via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 SOBRE AS RELAÇÕES ENTRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL E O SISTEMA IMUNE.....	20
2.1.1 Sobre o Macrófago e Suas Inter-relações.....	23
2.2 SOBRE OS PIRETRÓIDES E A CIALOTRINA.....	31
2.2.1 Piretróides.....	31
2.2.2 Cialotrina.....	34
2.3 SOBRE A CIALOTRINA, ESTRESSE E SISTEMA IMUNE.....	36
3 OBJETIVOS.....	40
3.1 OBJETIVO GERAL.....	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 ANIMAIS.....	41
4.2 FÁRMACOS E REAGENTES.....	42
4.3 PREPARO DOS REAGENTES E ESTÍMULOS UTILIZADOS NAS TÉCNICAS QUE AVALIAM A ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS.....	44
4.3.1 Reagentes.....	44
4.3.2 Estímulos para avaliação dos macrófagos por citometria de fluxo.....	46
4.4 PROCEDIMENTO PARA OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS DA CAVIDADE PERITONEAL.....	47
4.4.1 Preparo do Onco-BCG.....	47
4.4.2 Ativação dos macrófagos peritoneais pelo Onco-BCG.....	47
4.4.3 Colheitas de células da cavidade peritoneal.....	48

4.4.4 Quantificação e teste de viabilidade das células peritoneais.....	48
4.4.5 Microscópio ótico.....	49
4.5 MÉTODOS.....	49
4.5.1 Observações clínicas.....	49
4.5.2 Imuno-histoquímica para c-fos.....	49
4.5.3 Adrenalectomia.....	51
4.5.4 Manipulação dos níveis de glicocorticóides.....	52
4.5.5 Dosagem de noradrenalina e metabólitos (MHPG e VMA)	52
4.5.6 Simpatectomia química.....	54
4.5.7 Citometria de fluxo.....	55
4.5.8 Conjuração da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> com iodeto de propídeo.....	56
4.5.9 Medida do burst oxidativo e da fagocitose.....	58
4.5.10 Procedimento para a quantificação do óxido nítrico (NO) através da produção de nitrito (NO ₂ ⁻).....	59
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS.....	62
6.1 OBSERVAÇÕES CLÍNICAS: SINAIS.....	62
6.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CIALOTRINA NA DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE C-FOS NO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO E BASO LATERAL DA AMIGDALA.....	63
6.3 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CIALOTRINA SOBRE A ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS ATIVADOS POR DUAS DOSES DE ONCO-BCG E AVALIADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	68
6.4 PARTICIPAÇÃO DO EIXO HHA NOS EFEITOS DA CIALOTRINA. ENVOLVIMENTO DA CORTICOSTERONA.....	74
6.4.1 Parte I - Adrenalectomia.....	74

6.4.2 Parte II – Manipulação dos níveis séricos de glicocorticóides.....	79
6.5 PARTICIPAÇÃO DO SNAS NOS EFEITOS DA CIALOTRINA.....	84
6.5.1 Parte I – Dosagem de noradrenalina e seus metabólitos (VMA e MHPG)	84
6.5.2 Parte II – Simpatectomia química.....	87
6.6 POSSÍVEL EFEITO DIRETO DA CIALOTRINA SOBRE A ATIVIDADE DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	95
6.7 POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DOS PBRs(RECEPTORES BENZODIAZEPÍNICOS PERIFFÉRICOS) COM OS EFEITOS DA DIRETOS CIALOTRINA SOBRE A ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	102
7 DISCUSSÃO.....	112
8 CONCLUSÕES.....	133
REFERÊNCIAS.....	134

1 INTRODUÇÃO

As relações entre o Sistema Nervoso Central (SNC) e o Sistema Imune (SI) ocorrem em duas direções, representando um importante mecanismo homeostático dos organismos. Evidências experimentais advindas de estudos “*in vitro*” e “*in vivo*” têm reportado que estados emocionais, como o estresse e a ansiedade (ESKANDARI; STERNBERG, 2002), bem como substâncias químicas com ação no SNC, como por exemplo os benzodiazepínicos (BDZ) (MASSOCO; PALERMO-NETO, 1999, 2003; SILVA et al., 2003); os praguicidas (VOCCIA et al., 1999) e dentre estes, os piretróides tipo II (RIGHI, 2003; RIGHI; PALERMO-NETO, 2005; SANTONI et al., 1999), interferem com a atividade do sistema imune de animais de laboratório.

Abbud Righi e Palermo-Neto (2003), demonstraram que a exposição de animais à cialotrina, um piretróide tipo II, na dose de 3,0 mg/kg/ durante 7 dias, pode ser considerada estressante/ansio gênica, visto que induz mudanças comportamentais, fisiológicas e neuro-endócrinas similares àsquelas observadas na vigência de estressores, concordando com as observações relatadas por Bôer e colaboradores (1988). Fatores físicos ou psicológicos que induzem estresse, bem como substâncias químicas ansiogênicas, têm potencial para interferir, direta ou indiretamente, com a resposta imune (LAWRENCE; KIM, 2000). Demonstramos que a administração de cialotrina nas dose de 1,0 e 3,0 mg/kg durante 7 dias consecutivos pela via oral, produz alterações na atividade de macrófagos peritoneais de ratos (Righi, 2003); mais especificamente, o tratamento ocasionou uma diminuição do índice de espraimento, de fagocitose e de produção de óxido nítrico. Estes achados, ligados à esfera imunológica, levaram-nos a inferir que a cialotrina estaria mudando a imunidade por ativar o eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) produzindo, em decorrência, um aumento dos níveis séricos de corticosterona. Outra hipótese para os efeitos da cialotrina foi por nós proposta; neste caso, o

piretróide ativaria, também, o Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNAS) modificando, desta forma e indiretamente, a atividade dos macrófagos. De fato, já se mostrou que a adrenalina e a noradrenalina mediam mudanças no tráfico e função de células do sistema imune como, por exemplo, de macrófagos (YANG; GLASSER; 2002). Finalmente, uma ação direta da cialotrina sobre os macrófagos poderia estar também envolvida com nossos achados experimentais.

Uma vez que a cialotrina é um praguicida largamente utilizado e tendo em vista que modifica a imunidade inata, como referendado através da atividade de macrófagos peritoneais, depreende-se a relevância de um estudo mais aprofundado, que busque entender melhor o mecanismo através do qual este piretróide modifica a atividade destas células. Neste contexto, este trabalho é continuação lógica e direta daquele apresentado como mestrado (RIGHI., 2003).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SOBRE AS RELAÇÕES ENTRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL E O SISTEMA IMUNE

Após a definição da neuroimunomodulação (ADER et al., 1980; BROOKS et al., 1982), começaram a aparecer mais freqüentemente na literatura evidências experimentais relativas às complexas inter-relações existentes entre os sistemas nervoso, endócrino e imune (JOHNSON et al., 1992; SMITH; BLALOCK, 1981). Segundo Blalock (1984) há uma razão bioquímica lógica para que ocorram interações entre os sistemas imune e neuroendócrino: estes sistemas compartilham de receptores comuns para citocinas, neurotransmissores, hormônios e neuropeptídeos. Além disso, produtos originalmente tidos como específicos para cada um destes sistemas coexistem em tecidos linfóides, endócrino e nervoso. Assim, por exemplo, há citocinas sendo produzidas no SNC e também hormônios, tais como ACTH e TSH, sendo sintetizados em células linfóides (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996). A partir destas observações, começou a ser delineada a idéia de que não só existem comunicações e relações entre os sistemas neuroendócrino e imune mas, também, que elas ocorrem em dois sentidos, isto é, tanto os mecanismos neuroendócrinos modulam a atividade do SI, quanto este influencia a atividade dos sistemas endócrino e nervoso (ESKANDARI; STERNBERG, 2002).

Sabe-se que citocinas pro – inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-1 e IL-6, atuam no SNC induzindo a ciclooxygenase 2 (COX-2) a sintetizar a prostaglandina E2 (PGE2) que, por sua vez, atua na região anterior do hipotálamo (BLACKWELL; CHRISTMAN, 1997) ativando o eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) e, conseqüentemente, a produção de glicocorticóides (CHROUSOS, 1995).

Grande número de evidências experimentais tem mostrado a relevante relação que existe entre a ocorrência de estresse e a atividade do sistema imune (ADER, FELTEN, COHEN, 1991; BESEDOVSKY; DEL REY, 1996; MILLER, 1998). Assim, já foram relatadas mudanças na função imune celular e na susceptibilidade ao câncer em pessoas que passaram por experiências estressantes (COHEN; HERBERT, 1996; IRWIN et al., 1990). Neste sentido, uma variedade de estressores alteraram a imunidade de animais de laboratório. De fato, um choque elétrico aplicado nas patas, aumentou a susceptibilidade de camundongos ao vírus herpes simplex (KUSNECOV et al., 1992), um estresse sonoro suprimiu a resposta mediada por células B e T em ratos (SOBRIAN et al., 1997), um choque elétrico inescapável nas patas aumentou o número total de células broncoalveolares em ratos OVA-sensibilizados (PORTELA et al., 2001) e diminuiu tanto a atividade de macrófagos como a sensibilidade de ratos ao crescimento do Tumor Ascítico de Erlich (PALERMO-NETO et al., 2003). O efeito do estresse sobre a imunidade, entretanto, depende do tipo de estressor, de sua duração e frequência e, dentre outras variáveis, da habilidade do “sujeito experimental” em controlar e/ou escapar do mesmo.

Neste contexto, já se relatou que a exposição de animais a praguicidas representa uma situação estressante (ABBUD RIGHI; PALERMO-NETO, 2003; SPINOSA et al., 1999). Assim sendo, os praguicidas, além de seus efeitos próprios sobre as pragas e daqueles ditos colaterais que exercem sobre a esfera orgânica, são capazes, também, de ativar o eixo HHA podendo, desta forma, modificar indiretamente a imunidade.

O hipotálamo parece ser o local do cérebro responsável por “vários caminhos” neuroendócrinos que modulam as funções imunes; o principal “desencadeador” do processo imunoregulatório regulado pelo eixo HHA é o Hormônio Liberador de Corticotropina (CRH). O CRH é secretado pelo núcleo paraventricular do hipotálamo, estimula a expressão e liberação do ACTH pela porção anterior da glândula hipófise (SCOTT; DINAN, 1998); este hormônio alcança as adrenais através da circulação sanguínea, induzindo a expressão e a liberação de

glicocorticóides. Deste modo, o produto final desta cascata é o cortisol em humanos e em hamsters, e a corticosterona em outros roedores (LAWRENCE; KIM, 2000). Estes glicocorticóides sabidamente regulam os processos inflamatórios/imunológicos (MCEWEN et al., 1997). Sabe-se que tanto o CRH como o ACTH podem ser também produzidos por células linfóides (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996). Entretanto, é de suma importância ressaltar que o eixo HHA está sujeito à regulação de ambos os hormônios (CRH e ACTH), respondendo também a estímulos provenientes do SNC e da periferia. De fato, o CRH é positivamente regulado, entre outros, pelos sistemas serotoninérgicos, colinérgicos, catecolaminérgicos e gabaérgicos e os glicocorticóides exercem uma retroalimentação negativa sobre o eixo HHA, atuando tanto sobre o hipotálamo como sobre a hipófise (ESKANDARI; STERNBERG, 2002). Por outro lado, como anteriormente citado, interleucinas, como a IL-1 provenientes da periferia, ativam o HHA e liberam o CRH e o ACTH (DUNN, 1995).

A ativação do eixo HHA por agentes externos, como o estresse ou a exposição a praguicidas, como por exemplo alguns piretróides do tipo II, libera ACTH e glicocorticóides (ABBUD RIGHI; PALERMO-NETO, 2003; BOER et al., 1988). Estes hormônios, sabidamente modulam as respostas neurovegetativas ligadas às situações de estresse e de ansiedade (GRAEFF, 1989).

Em adição ao eixo HHA, o SNAS também é ativado em situações de estresse, regulando, entre outras funções, o sistema imune em níveis regionais, locais e sistêmicos (ESKANDARI; STERNBERG, 2002). Neste sentido, órgãos linfóides primários e secundários, incluindo-se aqui a medula óssea, o timo, o baço e os linfonodos, são inervados por terminações nervosas do SNAS (YANG; GLASER, 2002). Por outro lado, células do sistema imune expressam receptores para neurotransmissores como, por exemplo, receptores β_2 adrenérgicos em linfócitos. Estes receptores permitem, então, que eles respondam aos neurotransmissores liberados pela estimulação nervosa autonômica simpática. Neste contexto, mostrou-se que a

noradrenalina e a adrenalina sistêmica inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como, por exemplo, de IL-12, TNF α e interferon γ , e estimulam a produção de citocinas não inflamatórias, como a IL-10. Através deste mecanismo, as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) poderiam causar uma supressão seletiva da imunidade celular (resposta Th1), incrementando a imunidade humoral (resposta Th2) (KASPROWICZ; KOHM; BERTON, 2000).

Os dados da literatura levantam, assim, sólidas evidências comportamentais e bioquímicas que suportam a hipótese de haver uma comunicação direta e bidirecional entre os sistemas nervoso, endócrino e imune. Desta forma, não é difícil de se supor que substâncias que atuem no Sistema Nervoso tenham a capacidade de influenciar as respostas imunes. Neste sentido, diversos pesquisadores de nosso e de outros laboratórios, demonstraram que o uso de BDZ (MASSOCO; PALERMO-NETO, 1999; RIGHI et al., 1999; SCHLUMPF et al., 1990, 1992), assim como de piretróides tipo II (GABBIANELLI et al., 2004; RIGHI., 2003; RIGHI; PALERMO-NETO., 2005), pode interferir com a atividade do sistema imune.

2.1.1 Sobre o Macrófago e Suas Inter-relações

Diversos estudos têm enfatizado a proeminente atividade fagocítica dos macrófagos; entretanto, a importância da atividade secretora destas células só foi reconhecida na década de 70 (TAKEMURA; ZENA, 1984). Os produtos secretados por macrófagos são importantes em diversas funções, tais como imunoregulação (ROSENWASSER; DINARELLO, 1981), morte de micróbios (BAST et al., 1974) e lise das células tumorais (NATHAN; COHN, 1980). Os produtos que eliciam estas funções, no entanto, não são todos secretados por um único macrófago; estas células apresentam distintos padrões de atividade secretora, que dependem de

fatores reguladores provenientes do seu próprio estágio de desenvolvimento e do ambiente no qual estão inseridas (TAKEMURA; ZENA, 1984).

Levando-se em consideração a complexidade dos fenômenos acima descritos, nos quais os macrófagos estão envolvidos, não seria de se estranhar que encontrássemos células similares a elas em diferentes organismos vivos tomados da escala de evolução animal. De fato, evolutivamente, os macrófagos estão entre os mais antigos tipos celulares do reino animal (OTTAVIANI; FRANCESCHI, 1997). Algumas formas primitivas de vida, como os protozoários, exibem células com características similares às de macrófagos dos mamíferos (MURAMATSU, 1993).

Seguindo esta mesma linha de raciocínio, através do emprego de diversas técnicas, como, por exemplo, de imunohistoquímica e de bioquímica, demonstrou-se a presença de moléculas similares à de óxido nítrico sintase (NOs) em macrófagos de invertebrados (CONTE; OTTAVIANI, 1995; FRANCHINI; CONTE; OTTAVIANI, 1995) e a presença de ACTH, β -endorfina e moléculas “citocinas-like” (IL-1; IL-2; IL-6; TNF- α) em macrófagos provenientes de espécies de animais de vários filos (OTTAVIANI et al., 1990).

Moléculas similares às de mediadores clássicos envolvidos com a resposta ao estresse em mamíferos, tais como CRH, ACTH, e aminas biogênicas, estão presentes e/ou são liberadas, também, por macrófagos de invertebrados (OTTAVIANI; FRANCESCHI, 1996; OTTAVIANI et al., 1992). Nos vertebrados, ao contrário do que ocorre nos invertebrados (onde a resposta frente ao estresse é abrigada apenas nos macrófagos), vários órgãos estão envolvidos com a resposta ao estresse, intimamente ligado, conforme anteriormente discutido, à ativação do eixo HHA; entretanto, os mediadores desta resposta são os mesmos, quer em vertebrados ou em invertebrados. Talvez por isso, Ottaviani e Franceschi em 1997 sugeriram ser o macrófago o melhor exemplo de célula imune-neuroendócrina.

A função dos macrófagos é sabidamente regulada pela atividade do eixo HHA, tendo este fato recebido considerável atenção (ZWILLING et al., 1990; ZWILLING et al., 1992; ZWILLING et al., 1993). O eixo HHA regula a função macrofágica através da produção de uma cascata de hormônios em resposta a uma variedade de estímulos, dentre os quais as situações estressantes, que resultam num aumento da produção de corticosteróides pelas adrenais. Esta resposta fisiológica ao estresse, no entanto, é mediada também pelo sistema nervoso simpático (SNS) (ADER; FELTEN; COHEN, 1991; JOHNSON et al., 1992; SOLOMON, 1987). De fato, a ativação do SNS resulta na liberação de adrenalina pela medula da adrenal e de noradrenalina pelas terminações nervosas do Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNAS) em órgãos linfóides secundários (AUTELITANO et al., 1989; FELTEN et al., 1987; PURCELL; GATTONE, 1992) alterando-se desta forma a capacidade funcional dos macrófagos. Diversos trabalhos do nosso e de outros laboratórios têm demonstrado que a exposição a uma situação de estresse, quer na fase pré-natal como na fase adulta, altera a capacidade funcional dos macrófagos (BROWN et al., 1993; FONSECA et al., 2002; JIANG et al., 1990).

Neste contexto, como membros do sistema mononuclear fagocítico, os macrófagos são derivados da medula óssea, circulam no sangue como monócitos e diferenciam-se em macrófagos nos tecidos, sendo denominados de células de Kupffer no fígado, macrófagos alveolares no pulmão, macrófagos peritoneais no peritônio, células da microglia no Sistema Nervoso Central (SNC) e osteoclastos no sistema ósseo (ABBAS, 1997).

Os macrófagos, algumas vezes, ficam relativamente quiescentes como células residentes. Macrófagos residentes são macrófagos teciduais que não encontraram corpos estranhos e têm baixa atividade funcional, caracterizada por baixa secreção de proteinases ou metabólitos reativos de oxigênio. No entanto, quando estes macrófagos encontram corpos estranhos, eles expõem diversas integrinas presentes na membrana celular, que participam do processo de sua ativação; dentre estas, destacam-se os receptores CR3, LFA-1 e ICAM-1 que

reconhecem outras moléculas e componentes de matrizes extracelulares, aumentando a capacidade de espreadimento e fagocitose destas células.

Neste sentido, sabe-se que uma das características dos macrófagos é espreadir-se, *in vitro*, quando em contato com uma lamínula de vidro ou na presença de certos agentes indutores, como íons magnésio, adenosina e algumas proteases (RABINOVITCH; DESTEFANO, 1973); sabe-se também que este fenômeno está relacionado com a fosforilação da fosfolipase A₂ e liberação de ácido aracdônico estimulado pelas glicoproteínas, tais como a fibromectina e vitromectina (ALITALO et al., 1980; CRAWFORD; JACOBSON, 1998). Neste contexto, a fagocitose é um processo de internalização que requer a participação conjunta de inúmeras vias celulares, governadas por múltiplos eventos de sinalização transmembrânicos (COX; GREENBER, 2001; KWIATKOWSKA; SOBOTA, 1999). Mais especificamente, a fagocitose tem início com o reconhecimento da partícula a ser fagocitada pelo imunócito, sendo este reconhecimento processado por receptores específicos presentes na superfície da membrana plasmática, os quais incluem receptores para manose/fucose (MFR) e para as frações Fc da imunoglobulina (IgG) e C3 do complemento (ADEREM; UNDERHILL, 1999). A ativação destes receptores desencadeia um processo de polimerização de filamentos de actina, próximos à membrana plasmática, que culmina com a emissão de pseudópodes e a formação do fagossomo, o qual passa por alterações em sua composição e produz uma organela híbrida, chamada fagolisossomo, que, ao contrário do seu precursor, não tem capacidade de matar patógenos ou de degradar partículas. Entretanto, possui inúmeras propriedades degradativas, tais como baixo pH, enzimas hidrolíticas para digestão de partículas, defensinas e outros peptídeos bactericidas, e a capacidade de gerar compostos oxidativos tóxicos (VEIRA, 2002). Na sequência, fragmentos peptídicos antigênicos oriundos da atividade microbicida do macrófago, são exteriorizados na superfície da membrana pelo complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC II) sendo apresentados às células imunocompetentes.

Nesta situação, os macrófagos passam a ser denominados de ativados (ADAMS; HAMILTON, 1984). Sabe-se não ser necessário a existência de um processo inflamatório para que os macrófagos sejam ativados (HASKARD et al., 1986).

A ativação de macrófagos é um fenômeno complexo que envolve diversos passos; entretanto, parece ser consenso geral entre os pesquisadores categorizá-los como: 1) macrófagos inflamatórios, os quais têm atividade secretora alta, como, por exemplo, de proteinases; porém, não se logrou demonstrar a ocorrência de um aumento da atividade tumoricida ou microbicida dos mesmos; 2) macrófagos ativados, os quais têm em geral uma baixa atividade secretora, como, por exemplo, de proteinases; porém, possuem alta atividade secretora de metabólitos reativos de oxigênio, como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, de relevante atividade tumoricida e microbicida (COHN, 1978; KARNOVSKY; LAZDINS, 1978; NORTH, 1978).

Os macrófagos inflamatórios são estimulados por fatores inflamatórios não específicos, enquanto que os macrófagos ativados são estimulados por fatores imunológicos, via produtos derivados de linfócitos (TAKEMURA; ZENA, 1984). Experimentalmente, macrófagos inflamatórios podem ser obtidos injetando-se “agentes irritantes” em animais, como o tioglicolato. Entretanto, há que ressaltar que macrófagos obtidos a partir do uso de diferentes agentes apresentam diferenças em suas características no relativo ao padrão de substâncias que secretam (WERB; BANDA; JONES, 1980; WERB; CHIN, 1981). A ativação de macrófagos pode ser induzida, ainda, infectando-se os animais com microorganismos como, por exemplo, com micobactérias (Bacilo Calmet Guerin, - BCG), com *Trypanosoma cruzi* ou também com o uso de citocinas produzidas por linfócitos T ativados (em especial, o INF- γ).

Os macrófagos ativados secretam substâncias importantes para a resposta imunológica, dentre as quais os componentes do sistema complemento, as citocinas (em especial, IL-1 e o TNF- α) e, conforme já citado, as espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN).

De fato, quando da transformação de monócitos em macrófagos e na vigência de uma resposta celular a substâncias estimulantes de membrana, observa-se a produção e liberação de vários produtos, dentre eles as espécies reativas de oxigênio (ERO), resultantes de uma seqüência de reações bioquímicas de alto consumo de oxigênio, conhecidas coletivamente como “respiratory burst” (COHN, 1978). Especificamente, o aumento do metabolismo de oxigênio resulta em diversos metabólitos, dentre os quais os mais estudados são o superóxido e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este último é conhecido por ser o principal componente do aparato microbicida dos neutrófilos e, também, de macrófagos ativados. Assim, a mensuração dos níveis de liberação de H_2O_2 , a partir de macrófagos, pode ser considerada como um relevante parâmetro para a avaliação da ativação destes fagócitos (NATHAN; ROOT, 1977; ROOT et al., 1975).

Além das EROS, os macrófagos ativados também secretam espécies reativas de nitrogênio. Dentre estas, o óxido nítrico (NO) tem despertado maior interesse científico pela recente descoberta de seu relevante papel na defesa celular contra infecções virais, parasitárias e bacterianas (KRONCKE; FEHSEL; KOLB-BACHOFEN, 1998) e, também, contra células tumorais (CUI et al., 1994). A este respeito, sabe-se que o NO é também um dos mediadores da inflamação, tendo sido primeiramente descrito como um fator derivado das células endoteliais que causam vasodilatação através da indução de um relaxamento na musculatura do endotélio vascular (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

O NO é um gás solúvel que é produzido não apenas por células endoteliais, mas também por macrófagos e por neurônios específicos presentes no SNC. Tendo uma meia-vida de apenas alguns segundos, o NO age de maneira parácrina nas células alvo através da indução da guanosina cíclica monofosfato (GMP) que, por sua vez, inicia uma série de eventos intracelulares que desencadeiam a resposta (KRONCKE; FEHSEL; KOLB-BACHOFEN, 1998). Sabe-se ser o NO produzido a partir da L-arginina, em uma reação catalizada pela enzima

óxido nítrico sintetase (NOS). Existem 3 tipos diferentes de NOS (endotelial, neuronal e induzível), as quais exibem 2 padrões de expressão. A endotelial (eNOS) e a neuronal (nNOS) são geralmente constitutivas, sendo expressas em baixos níveis e podendo ser ativadas rapidamente por um aumento dos níveis de íons cálcio citoplasmático na presença da calmodulina. O influxo de cálcio para estas células leva a uma rápida produção de NO. A iNOS, em contraste, é induzida quando macrófagos são ativados por citocinas, como, por exemplo, TNF- α ou IFN- γ , fato que ocorre sem que haja a necessidade de um aumento dos níveis intracelulares de cálcio (COTRAN et al., 1999).

Macrófagos estimulados secretam também grandes quantidades de ânion superóxido, radicais hidroxila e oxigênio “singlet” (BADWEY; KARNOSVSKY, 1980; JOHNSTON., 1978; PICK; MIZEL, 1981). Diferentes trabalhos indicam que estas espécies reativas de oxigênio têm participação nos processos de inflamação, morte celular e tecidual, transformação neoplásica, aterosclerose e envelhecimento (HAMMOND et al., 1985; LEY; ARFORS, 1982).

As técnicas mais freqüentemente utilizadas para avaliar a capacidade fagocítica dos leucócitos são aquelas que utilizam como critério o número de células que realizam fagocitose e o número de partículas fagocitadas, sendo estas determinadas microscopicamente (RIGHI, 2003; RIGHI; PALERMO-NETO, 2005; VERHOEF; WALDVOGEL, 1985). No entanto, por tratar-se de um procedimento tedioso e que consome muito tempo, pode levar a resultados que não refletem a real magnitude do fenômeno observado. Desta forma, têm-se utilizado de uma maneira cada vez mais constante a técnica que avalia a fagocitose através de citometria de fluxo. De fato, com o emprego da citometria de fluxo é possível discriminar as populações celulares baseando-se no seu tamanho e granulosidade, bem como obter com extrema fidelidade resultados que expressam o percentual e intensidade de fagocitose por macrófagos, utilizando um número reduzido de células (COSTA, 2004).

Os métodos citométricos também têm sido considerados convenientes e mais práticos para estudar o *burst* oxidativo celular quando comparados com outras técnicas bioquímicas, uma vez que permitem a diferenciação dos eventos oxidativos intra e extracelulares (BASOE et al., 1983). No mesmo sentido, o uso da metodologia citométrica elimina a necessidade de separação previa dos leucócitos, o que é relevante pois esta separação também ativa *per se* o *burst* oxidativo celular (FEARON; COLLINS, 1983).

Neste contexto, o *burst* oxidativo expresso quando da geração de peróxido de hidrogênio por macrófagos e por neutrófilos estimulados pode ser monitorado quantitativamente por citometria de fluxo, usando-se para tal o reagente o 2'7'diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), o *Staphylococcus aureus* marcado com iodeto de propídeo (PI), ou o miristato-acetato de forbol (PMA) (HASUI; HIRABAYASHI; KOBAYASHI, 1989; RAIDAL; BAILEY; LOVE, 1998). Keton e Brandt (1965) descreveram originalmente um método fluorométrico para a mensuração do peróxido de hidrogênio em solução aquosa. Este método baseia-se na oxidação do DCFH-DA não fluorescente, pelo peróxido de hidrogênio e pela peroxidases, o que o transforma em um composto fluorescente, o 2'7'diclorofluoresceína. Sendo polar, o composto fluorescente não pode difundir-se para fora da célula. Por esta razão, é possível detectar a oxidação do DCFH-DA nos macrófagos utilizando-se análises unicelulares por citometria de fluxo. Neste contexto, sabe-se que a oxidação do DCFH-DA é quantitativamente proporcional à concentração gerada de peróxido de hidrogênio (HIRABAYASHI; TANIUCHI; KOBAYASHI, 1985).

Portanto, diante da importância das interações entre os Sistemas Nervoso e Imune, e do envolvimento dos macrófagos neste contexto, fica claro que estados emocionais, como o estresse e a ansiedade (ESKANDARI; STERNBERG, 2002; PERSOONS et al., 1995; TECOMA; HUEY, 1985), bem como substâncias químicas que podem induzir estados de ansiedade e/ou estresse, como por exemplo, os praguicidas (VOCCIA et al., 1999) e dentre

estes, os piretróides tipo II (GABBIANELLI et al., 2004; MADSEN et al., 1996; RIGHI., 2003; RIGHI; PALERMO-NETO., 2005; SANTONI et al., 1999) interferem com a atividade de timócitos, macrófagos, linfócitos e células “*natural killer*” (NK) de animais de laboratório.

2.2 SOBRE OS PIRETRÓIDES E A CIALOTRINA

2.2.1 Piretróides

As piretrinas são compostos naturais derivados de inflorescências secas do *Chrysanthemum* (mais comumente, do *C. cinerariifolium*). Os piretróides foram sinteticamente desenvolvidos a partir das piretrinas com a finalidade de obter-se moléculas com efeitos idênticos contra pragas, porém com maior estabilidade, e com menores efeitos sobre o meio ambiente e sobre os organismos a elas expostos. De fato, os piretróides têm como grande vantagem sobre outros praguicidas, como os organofosforados e os carbamatos, uma alta seletividade praga/mamífero, uma grande eficácia, uma baixa fotoestabilidade e uma alta biodegradabilidade.

Os piretróides são normalmente divididos em duas classes, tomando-se como base a existência de diferenças estruturais e de ação neurofisiológica e toxicológica. Estruturalmente, os piretróides do tipo I, como a permetrina, não contêm um componente α -cianofenoxibenzil, enquanto que os do tipo II, como a cialotrina, a deltametrina e a cipermetrina, contêm um componente α -ciano. Sabe-se que a presença ou ausência do componente α -ciano determina o tipo de síndrome neurotóxica observada em mamíferos e insetos intoxicados por estes inseticidas (GAMMON; LAWRENCE; CASIDA, 1982; SODERLUND et al., 2002). Verschoye e Aldridge, em 1980, verificaram que a intoxicação aguda de ratos, ocasionada por

23 tipos diferentes de piretróides, provocava sinais também diferentes nos animais, em especial quando se tratava de piretróides do tipo I ou do tipo II. Os do tipo I causavam uma síndrome que foi designada como do tipo T (tremor), enquanto que os do tipo II causavam uma síndrome que foi designada de CS (coreotetose e salivação).

Quanto ao mecanismo de ação, foram propostos vários sítios de atuação para os piretróides. Alguns autores (BROWN; NARAHASHI, 1992; MIYAMOTO et al., 1995; SALGADO; NARAHASHI, 1992) afirmam que os piretróides atuam sobre a permeabilidade iônica, em particular, sobre os canais de sódio das membranas das células nervosas. Narahashi (1986) demonstrou que os piretróides prolongam o estágio de abertura desses canais, levando as células a um pós-potencial positivo e a uma supressão do período refratário. Essa alteração promove disparos neuronais repetitivos na presença de um único estímulo.

Ainda com relação aos efeitos dos piretróides em canais iônicos, tem sido estudado a influência dos mesmos sobre os canais de cloro voltagem dependentes. Forshaw et al. (1993) demonstraram que a deltametrina (piretróide tipo II) foi capaz de diminuir, “*in vitro*”, a entrada do íon cloro na célula, através da redução da abertura dos canais de cloro e do aumento da condutância a esse íon. Isso pode resultar numa amplificação das correntes de sódio despolarizantes, causadas pelos piretróide tipo II. Assim, a condutância de cloreto diminuída, mesmo que indiretamente, promoveria um aumento na excitabilidade neuronal por conta da desestabilização do potencial de membrana, prolongando a despolarização do terminal nervoso e, desta forma, potencializando a ação primária em canais de sódio.

Além destes sítios de ação, tem sido discutida a interação dos piretróides com os canais de cálcio voltagem dependentes, que modulam uma série de eventos celulares. Dentre estes eventos, citam-se, por exemplo: a liberação de neurotransmissores, alguns ajustes metabólicos, a proliferação celular e a contração muscular. De fato, sabe-se que a deltametrina (piretróide tipo II) aumenta a amplitude ou frequência das oscilações espontâneas de Ca^{2+} e aumenta a

amplitude da despolarização induzida pelo aumento nos níveis de Ca^{2+} (DUCE et al., 1999).

Conforme salientado, a liberação de neurotransmissores é um evento altamente organizado e dependente do influxo de Ca^{2+} via canais de cálcio voltagem dependentes associados com a membrana plasmática do terminal pré – sináptico (LLINAS, 1982). Neste contexto, diversos pesquisadores mostraram que os piretróides induziam uma liberação de neurotransmissores (BROOKS; CLARK, 1987; DOHERTY et al., 1986, 1987). De fato, estes autores não deixam claro se este efeito é devido a um efeito direto do piretróide sobre os canais de cálcio, uma vez que não se utilizou nenhum bloqueador de canais de cálcio (SHAHER; MEYER., 2004). Neste sentido, sabe-se que a indução da liberação dos neurotransmissores pelos piretróides ocorre apenas na presença de altas concentrações dos mesmos (DOHERTY et al., 1986, 1987) ou requer a presença de outro estímulo despolarizante (BROOKS; CLARK, 1987; CLARK; BROOKS, 1989; SHAHER; MEYER, 2004).

Quanto à ação dos piretróides no receptor de ácido gama-aminobutírico (GABA), Gammon, Lawrence e Casida, em 1982, observaram que o diazepam, fármaco que atua ligando-se à subunidade α (alfa) do complexo receptor ionóforo de GABA (ou receptor GABA_A), foi capaz de aumentar a latência para os efeitos dos piretróides do tipo II (deltametrina e fenvalerato) não sendo, no entanto, capaz de provocar o mesmo efeito em animais expostos aos piretróides do tipo I (permetrina e aletrina). Observaram, ainda, que o fenobarbital, droga que também atua no receptor GABA_A , porém, no sítio de ligação para a picrotoxina, foi menos eficaz como anticonvulsivante nas crises convulsivas induzidas pelos piretróides, e menos seletiva, já que seu uso retardou o início, mas não impediu as manifestações neurotóxicas tanto de piretróides do tipo I, como daqueles do tipo II. Segundo estes autores, os efeitos observados sugerem que os piretróides tipo II (que causam a síndrome CS), poderiam estar agindo como antagonistas de receptores benzodiazepínicos centrais, isto é, acoplados ao complexo GABA_A .

Essa possível ação dos piretróides nos receptores GABA_A, mesmo sítio de ligação para os benzodiazepínicos, fez com que diversos pesquisadores procurassem estudar *in vivo*, as possíveis ações dos piretróides em Receptores Benzodiazepínicos Periféricos (PBRs) (DEVAUD; MURRAY, 1986). De fato, fármacos como os benzodiazepínicos, atuam quer em GABA_A, quer em PBR (PAPADOPOULOS, 1993). A ação destes praguicidas em PBR de roedores foi similar à do Ro5-4864, um agonista destes receptores. Por outro lado, o uso do PK11195, um antagonista de PBR, antagonizou as atividades da deltametrina, da permetrina e do PTZ (BENAVIDES et al., 1984).

2.2.2 Cialotrina

A cialotrina, um piretróide do tipo II, é um inseticida e acaricida utilizado como princípio ativo de vários produtos veterinários aplicados topicamente (entende-se por aplicação tópica aquela feita através de formulações *Pour-on* ou *Spray*). Além de ser largamente utilizada na agricultura, a cialotrina e, também, a Lambda-cialotrina, têm importantes funções em programas de saúde pública, pois os piretróides representam a primeira escolha dentre os inseticidas a serem usados na prevenção de doenças transmitidas por insetos, e também para uso “indoor” (EPA, 2000; FAO/WHO, 2000).

A cialotrina técnica é um líquido viscoso de coloração amarelada tendendo para o marrom, e que contém mais de 90% da substância ativa, a qual consiste de 4 isômeros, que compreende 2 pares de enantiômeros, A e B, na proporção de 60:40; sendo que cada par existe em quantidades iguais. Sua fórmula molecular é C₂₃H₁₉ClF₃NO₃. Conforme já discutido, a cialotrina é caracterizada pela presença de um grupo alfa-ciano em sua estrutura tendo como principal mecanismo de ação a alteração reversível da permeabilidade dos canais de sódio da membrana neuronal (ALDRIDGE, 1990).

Estudos de farmacocinética conduzidos em ratos e usando cialotrina radiomarcada, administrada através de gavagem (diluída em óleo de milho) nas doses de 1 ou 25 mg/kg, demonstraram que aproximadamente 30 a 40% da mesma era recuperada na urina, e que uma grande parte dela, aparecia nas fezes. Verificou-se, ainda, neste trabalho que estas porcentagens de excreção eram afetadas pela dose e pelo veículo. Finalmente, mostrou-se que o pico de concentração plasmática da cialotrina (aproximadamente 0,6 e 6 µg/ml após administração oral de 1 e 25 mg/kg, respectivamente), foi alcançado 7 horas após a administração; 48 horas após a mesma, este nível estava reduzido para menos de 10% (FAO/WHO, 2000).

Em estudos ligados à avaliação de toxicidade aguda realizados com ratos, observou-se o aparecimento da síndrome CS (anteriormente descrita) após o uso de cialotrina (BARNES; VERSCHOYLE, 1974; RAY, 1991). Ainda, em estudos de toxicidade aguda, tentou-se definir as Doses Letais 50% (DL₅₀) deste praguicida em ratos, considerando-se diversas vias de aplicação. Assim, em FAO/WHO (2000), encontra-se uma DL₅₀ de 243 mg/kg e 144 mg/kg de peso, para a cialotrina diluída em óleo de milho e administrada oralmente para ratos machos e fêmeas, respectivamente. Outros autores (vide FAO/WHO, 2000) encontraram para a cialotrina, diluída em óleo de oliva e administrada também oralmente, uma DL₅₀ de 51 mg/kg e 65 mg/kg de peso, respectivamente para ratos machos e fêmeas,

Em estudos ligados à toxicidade crônica conduzidos com ratos, utilizando-se doses de 0, 5, 10, 20 e 250 mg/kg de cialotrina fornecida através da dieta, (FAO/WHO, 2000) observou-se que apenas a maior dose produziu um decréscimo na ingestão de alimentos, na conversão alimentar e no ganho de peso. A dose que não produziu nenhum efeito (NOEL) estabelecida para este estudo foi de 20 mg/kg (2 mg/kg de peso/dia).

Em estudos de toxicidade crônica com doses de 0, 5, 25, 100, 500, ou 2000 mg/kg de cialotrina, fornecidas na dieta dos camundongos (FAO/WHO, 2000), observou-se que altas doses de cialotrina provocavam morte, e que, após o tratamento com 2000 mg/kg, os animais

apresentavam locomoção anormal, postura curvada, decréscimo de peso e aumento da frequência respiratória. Foram observadas, também, mudanças hematológicas nos animais que receberam a maior dose; um decréscimo da contagem total de leucócitos (leucopenia), acompanhado de uma baixa contagem de linfócitos (linfopenia) e uma alta contagem de neutrófilos (neutrofilia). Nesse mesmo estudo, realizaram-se exames histopatológicos, constatando-se uma atrofia da polpa vermelha do baço (em dois de três animais que receberam a dose de 2000 mg/kg), alteração que poderia significar a ocorrência de mudanças imunológicas; de fato, o baço é um dos principais órgãos envolvidos com o sistema imune. A NOEL neste estudo foi de 5 mg/kg (0,63 mg/kg de peso /dia em machos).

2.3 SOBRE A CIALOTRINA, ESTRESSE E SISTEMA IMUNE

Abbud Righi e Palermo-Neto em 2003, demonstraram que a exposição de animais adultos à cialotrina na dose de 3,0 mg/kg representava uma situação estressante, medida tanto comportalmente como bioquimicamente através da determinação dos níveis séricos de corticosterona. Estas alterações, indicativas de estresse quando da exposição ao piretróide tipo II, verificadas por esses autores, corroboraram com aquelas encontradas por Boer et al. (1988). Estes pesquisadores relataram que a administração intravenosa de baixas doses (0,05; 0,15 e 0,45 mg/kg) de deltametrina (piretróide tipo II) aumentava, de uma maneira dose dependente, tanto a concentração plasmática de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) como aquela de corticosterona.

Righi (2003) avaliou o efeito imunotóxico da administração de cialotrina em ratos; a cialotrina foi administrada por via oral durante 7 dias consecutivos, em uma dose dita ansiogênica (3,0 mg/kg) e outra que não produziu alteração comportamental (1,0 mg/kg),

buscando verificar a influência deste tratamento sobre a resposta imune inata medida através da atividade de macrófagos. As duas doses induziram um decréscimo significativo e dose-dependente do índice de espraimento e de fagocitose, bem como da produção de óxido nítrico efetuados pelos macrófagos peritoneais. Como a dose de 1,0 mg/kg de cialotrina produziu um aumento, porém, não significativo dos níveis de corticosterona e não induziu ansiedade (medida comportalmente) nos animais, outro mecanismo de ação - que não os níveis séricos de corticosterona - deveria então, justificar os efeitos da cialotrina. Alguns candidatos para estas ações seriam: 1- uma ativação do SNAS pela cialotrina; 2 – uma ação da cialotrina em receptores benzodiazepínicos periféricos (PBR) e/ou em canais de cálcio presentes na membrana de macrófagos e 3 – uma ação indireta via corticosterona; neste último caso, os macrófagos seriam mais sensíveis que o SNC às alterações séricas dos níveis de glicorticóides.

Neste sentido, é importante lembrar, como já comentado, serem alguns piretróides capazes de atuar nos receptores GABA_A (GAMMON; LAWRENCE; CASIDA, 1982), mesmo sítio de ligação dos benzodiazepínicos, como o diazepam.

Neste contexto, sabe-se que os efeitos dos benzodiazepínicos são mediados por dois tipos de sítios ligantes CBR – receptores benzodiazepínicos centrais e nos PBR presentes em órgãos ou tecidos ditos periféricos e também no SNC. Os CBRs têm alta afinidade e estão acoplados aos receptores GABA_A e aos canais de cloreto, facilitando a transmissão gabaérgica (COSTA; GUIDOTTI; TOFFANO, 1978). Os PBRs, são compostos por, pelo menos, três subunidades: um local onde se ligam as isoquinolonas, com massa molecular de 18 kDa; um canal iônico voltagem dependente (VDAC), com massa molecular de 32kDa, ao qual se ligam os benzodiazepínicos (BZDs); e um carreador nucleotídeo adenino, com massa molecular de 30 kDa, ao qual também se ligam os BDZs. Este complexo (PBR) está localizado externa e internamente às membranas mitocondriais (PAPADOPOULOS et al., 1994).

Diversas funções têm sido atribuídas aos PBRs, incluindo-se aqui uma função na proliferação celular (CARMEL et al., 1999), no fluxo de cálcio (PYTHON et al., 1993), na imunidade celular (LEFANT; HAUMONT; ZAVALA, 1986; MASSOCO; PALERMO-NETO; 1999; RIGHI et al., 1999) e na esteroidogênese (PAPADOPOULOS, 1993). A biossíntese de esteróides em tecidos esteroidogênicos começa com a conversão enzimática do precursor colesterol à pregnenolona. Esta reação é catalizada pela enzima P-450_{scc}, tendo como fator limitante da mesma o transporte do colesterol (que está armazenado nas células) através do espaço aquoso intermembrana da mitocôndria para a membrana mitocondrial interior e o P-450_{scc}. Alguns estudos relacionados com a esteroidogênese mostraram que os PBRs modulam a produção de esteróides por facilitar a translocação do colesterol de fora pra dentro da mitocôndria (PAPADOPOULOS, 1993).

Um trabalho recente sugere que os PBRs e uma proteína regulatória esteroidogênica (StAR) trabalhem juntos no transporte do colesterol para dentro da mitocôndria (SRIDARAN et al., 1999). Diversos foram os estudos realizados em nossos laboratórios, mostrando o possível envolvimento dos PBRs com a esteroidogênese e com a atividade de células do sistema imune. Assim, Massoco e Palermo-Neto (1999) relataram que o diazepam, na dose de 1,5 mg/kg, além de aumentar os níveis séricos de corticosterona em camundongos Balb/c, inibiram a atividade de macrófagos peritoneais, provavelmente, por atuar em receptores PBR presentes nos mesmos e/ou em tecidos esteroidogênicos. Estes achados, de alguma maneira, corroboraram com outros por nós encontrados em outro contexto (RIGHI et al., 1999). Verificamos que o diazepam, administrado na dose de 1,0; 2,0 e 3,0 mg/kg em hamsters experimentalmente inoculados com *Mycobacterium bovis*, promoveu não apenas um aumento na mortalidade, como também aumento do número de colônias de bacilos recuperados de animais inoculados, e da área de granulomas desenvolvidos por estes no fígado e nos pulmões. Observamos também, nestes animais, um aumento dos níveis circulantes de cortisol. Assim, o diazepam por atuar

diretamente nos PBRs presentes em células do sistema imune, como macrófagos e linfócitos ou, indiretamente, por aumentar os níveis de glicocorticóides provavelmente por ativar os PBRs das glândulas adrenais, estaria diminuindo a imunidade dos animais. Seria este o mecanismo de ação da cialotrina pela qual diminui a atividade de macrófagos? Mas se assim o for, porque a dose de 1,0 mg/kg de cialotrina, que não modificou os níveis séricos de corticosterona, foi capaz de diminuir a atividade de macrófagos (RIGHI., 2003)?

De tudo quanto foi exposto, cabem ainda outras questões: poderiam os piretróides, em especial a cialotrina, atuar também em PBR presentes em células imunes, como, por exemplo, em macrófagos? Aumentariam a atividade do SNAS? Modificariam a atividade dos macrófagos por liberarem Noradrenalina das terminações nervosas simpáticas localizadas em tecidos linfóides? Em outras palavras, que ações justificariam os efeitos da cialotrina sobre os macrófagos?

Estas e outras questões que merecem elucidações, constituem os objetivos do presente trabalho – uma seqüência lógica de nossa dissertação de Mestrado - e que será centrado nos efeitos observados após a exposição aguda e/ou repetida (7dias) a uma formulação comercial que contém este praguicida.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- ✓ Buscar o possível mecanismo de ação através do qual a cialotrina (piretróide do tipo II) modifica a atividade de macrófagos peritoneais de ratos.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o efeito estressor da cialotrina através da mensuração da expressão de c-fos no núcleo paraventricular do hipotálamo e no baso lateral da amígdala.
- ✓ Avaliar se a ativação do eixo HHA, pela administração da cialotrina – via aumento dos níveis de corticosterona sérica, é o fator responsável pela interferência deste piretróide com a atividade de macrófagos peritoneais.
- ✓ Avaliar os efeitos da cialotrina sobre os níveis e taxa de renovação de noradrenalina no hipotálamo e no estriado.
- ✓ Avaliar o envolvimento do SNAS com as ações da cialotrina na atividade de macrófagos peritoneais.
- ✓ Avaliar a possibilidade de uma ação direta da cialotrina sobre os macrófagos peritoneais.
- ✓ Avaliar a possibilidade de uma ação direta da cialotrina sobre os macrófagos peritoneais via ativação de PBRs.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos, com idade variando de 70 a 80 dias e peso corporal entre 180 e 220 g (no início dos experimentos). Os animais, provenientes do Biotério Central do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), SP, foram utilizados em conformidade com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório do Departamento de Patologia da FMVZ – USP e da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia –USP, Processo número: 571/2004.

Os animais foram alojados em caixas plásticas de polipropileno, medindo 41 x 34 x 16 cm (5 ratos por caixa), devidamente acondicionadas em sala cuja temperatura e umidade foram mantidas aproximadamente constantes (entre 22 e 25°C e 65 a 70 %, respectivamente) por meio de aparelhos de ar condicionado, ventilação e sistema de exaustão, sendo a iluminação artificial fornecida em um ciclo de claro-escuro de 12 horas, iniciando-se a fase clara às 7:00 horas.

Água e comida (ração para roedores - Nuvilab CR1[®]) foram fornecidas “*ad libitum*” aos animais, os quais 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 (dos grupos experimentais e dos controles) foram manuseados diariamente, a fim de se evitar, ao máximo, a ocorrência de possíveis situações estressantes decorrentes do manejo, durante a fase experimental. Ao final do período de adaptação, todos os ratos foram pesados para controle de peso e/ou para o cálculo dos volumes das drogas a serem injetadas, de acordo com as doses preconizadas nos experimentos.

4.2 FÁRMACOS E REAGENTES

6-OHDA (Sigma® - 2,4,5-trihydroxyphenethylamine): Destrói os terminais noradrenérgicos, “depletando” os níveis de Noradrenalina)

Azul de Tripán (Gibco®): corante utilizado para verificar a viabilidade celular

Cialotrina: Foi utilizada uma formulação comercial de cialotrina (Grenade® Coopers Brasil LTDA - 45gr/1L; 92,7 % de pureza do princípio ativo). Este medicamento consiste de 4 isômeros de cialotrina, que compreende 2 pares de enantiômeros, A e B, em uma proporção 60:40; para cada par, os enantiômeros estão em quantidades iguais

O Grenade® e o veículo do mesmo foram gentilmente cedidos pelo laboratório Coopers Ltda – Subsidiária da Schering-Plough Animal Health). As análises foram realizadas 24 horas após a última administração da cialotrina e/ou veículo

DCFH-DA [2’7’Diclorohidrofluoresceína Diacetato (Molecular Probes®)]: Fluocromo utilizado na técnica de citometria de fluxo para mensuração de burst oxidativo

EDTA [Etilenodiamina-tetra-acético (sigma®)]: Utilizado na técnica de fagocitose por citometria de fluxo, com o objetivo de interromper a reação após o período de incubação das amostras, bem como para reduzir o número de bactérias aderidas à superfície celular.

Iodeto de propídeo [PI (sigma®)]: fluorocromo empregado na técnica de citometria de fluxo para a conjugação da bactéria *Staphylococcus aureus*, no ensaio da fagocitose.

Metirapona: bloqueador da síntese de corticosterona.

Mifepristone [RU 486 (sigma®)]: antagonista dos receptores de glicocorticóides

NaCL [Cloreto de sódio (labsynth®)]: utilizado no preparo da solução salina

NaNO₂ [Nitrito de sódio (synth®)]: Utilizado para o preparo da curva padrão na técnica que quantifica a produção de NO, através da liberação de seu metabólito estável, o nitrito (NO₂⁻)

PBS [*Phosphate-Buffered Saline* (pH=7,2-7,4)]: solução tamponada com fosfato utilizada nas técnicas do *burst* oxidativo, fagocitose e NO.

PBS glicosado: solução utilizada na técnica de conjugação da bactéria *Staphylococcus aureus*

PMA [*Miristrato-Acetato de Forbol* (ICN Biomedical®)]: estímulo para a geração de burst oxidativo

PK 11195 (Sigma®): Ligante de receptores benzodiazepínicos periféricos

Reagente de Griess (Sulfanilamida 50% e etilenodiamina 50% - Synth®): corante que indica a produção de NO pelo ensaio colorimétrico (ELISA), através da detecção de NO₂⁻.

RO 5-4864 (Sigma®): Ligante de receptores benzodiazepínicos periféricos

RPMI 1640 (Gibco®): meio utilizado para a cultura de macrófagos na técnica de NO. Além disso, foi também empregado como diluente para as diferentes concentrações de NaNO₂ no preparo da curva padrão

Solução salina a 0,85%: empregada como veículo na técnica de conjugação da bactéria *Staphylococcus aureus*

Solução salina 0,9%: utilizada como veículo para a diluição da 6-OHDA e solução dada aos animais adrenalectomizados com finalidade de reposição

Solução salina 0,9% com Tween 12%: utilizada como veículo para a diluição do RU486

Soro Fetal Bovino 5% (Gibco®): nutriente empregado para o enriquecimento do RPMI

***Staphylococcus aureus* (cepa ATCC 25923 - DIFCO®)**: Bactéria marcada com iodeto de propídeo (PI) (Sigma) que foi utilizada para analisar a atividade fagocítica realizada por macrófagos peritoneais

Tween 80 (Sigma®): Utilizado na diluição de RU486 e da cialotrina nos experimentos *in vitro*

Vacina Onco BCG [Bacilo de Calmette-Guérin (Instituto Butantã de São Paulo, Brasil)]: Empregado para a ativação dos macrófagos peritoneais.

4.3 PREPARO DOS REAGENTES E ESTÍMULOS UTILIZADOS NAS TÉCNICAS QUE AVALIAM A ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS.

4.3.1 Reagentes

PBS – (*Phosphate-Buffered Saline* com pH=7,2-7,4) – solução estoque 10x concentrada

- Na ₂ HPO ₄ H ₂ O	42,96g
- NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	3,6g
- NaCL	82,0g
- H ₂ O destilada q.s.p.	1000ml

PBS 1x

Solução obtida a partir de 100 ml da solução estoque de PBS (10x concentrada) com volume final ajustado para 1.000ml de H₂O destilada.

PBS Glicosado

- PBS 10x	100 ml
- Glicose	0,9g
- Gelatina	1,0g
- H ₂ O destilada q.s.p.	1000 ml

Solução Salina 0,85 % e 0,9 %

Para as respectivas soluções foram diluídos em 1000 ml de H₂O destilada: 8,5g e 9,0 g de NaCL. Apenas a solução salina 0,85% foi esterilizada, em virtude de sua utilização no procedimento de conjugação da bactéria *Staphylococcus aureus*. Após o preparo, ambas as soluções foram mantidas em geladeira a 4°C.

Solução Salina 0,9 % com Tween 12 %

Para esta solução, 88 ml de solução salina 0,95 foram completados com Tween 80 para um volume final de 100ml de solução.

DCFH-DA 25mM (Solução estoque)

Foram pesados e diluídos em 2 ml de etanol absolutos 28,35 g do fluorocromo. Esta solução foi acondicionada em frasco âmbar, por ser fotossensível, e mantida até o momento de uso em freezer a - 20°C.

Solução de DCFH-DA

Durante os ensaios, 100µl de DCFH-DA (solução estoque) foram diluídos em 8,2 ml de PBS (1x), sendo o volume final de solução obtido o suficiente para contemplar 10 animais. Neste sentido, a diluição do fluorocromo foi ajustada de acordo como número de animais de cada experimento.

Solução de EDTA 3mM

Para o preparo desta solução, 1,12g de EDTA foram diluídos em 1000 ml de PBS (1x). O preparo desta solução foi realizado sempre no dia do experimento.

4.3.2 Estímulos para avaliação dos macrófagos por citometria de fluxo

Solução de PMA

A partir da solução estoque de PMA, na concentração de 100 ng/ 100µl, pegou-se um volume de 1µl desta solução e completou-se o mesmo para 999 µl de PBS (1x). Fez-se o ajuste de volume destas soluções de acordo com o número de animais a serem utilizados nos ensaios.

4.4 PROCEDIMENTO PARA OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS DA CAVIDADE PERITONEAL

4.4.1 Preparo do Onco-BCG

Para o preparo, transferiu-se a vacina Onco-BCG do flaconete em que é fornecida para tubos de propileno; após transferência, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 1.200 rpm. Após a centrifugação, os tubos foram incubados em banho-maria a uma temperatura de 60°C por 30 minutos, para inativação da cepa. Após incubação, os tubos foram mantidos em freezer a -20°C até o momento do uso.

4.4.2 Ativação dos macrófagos peritoneais pelo onco-BCG

Em todos os experimentos, a substância utilizada para ativar os macrófagos da cavidade peritoneal foi o Onco-BCG, uma substância classicamente reconhecida como tendo esta capacidade ativadora (RAPPOLEE; WERB, 1990). O Onco-BCG foi inoculado intraperitonealmente (i.p.) em ratos, por duas vezes, com intervalo de 5 dias entre as aplicações, na concentração de 40mg/5ml (0,50 ml/animal na primeira aplicação e 0,25 ml/animal na segunda). Mostrou-se em nosso laboratório, ser este esquema de tratamento o mais efetivo para ativação de macrófagos peritoneais (STANKEVICIUS., 2004). Foram tomados os devidos cuidados para a adequada refrigeração do BCG, desde quando retirado do freezer, até o momento de uso.

4.4.3 Colheita de células da cavidade peritoneal

Após eutanásia, realizada por anestesia profunda em câmara saturada com CO₂, os animais foram colocados em decúbito dorsal; uma pequena incisão foi então feita na pele da região abdominal dos mesmos sendo esta tracionada para que o abdômen ficasse exposto, tomando-se o cuidado de não rompê-lo. Com o auxílio de uma agulha de calibre 30 x 7 mm acoplada a uma seringa de 10 ml, foram injetados 10 ml de PBS na cavidade abdominal. Após realização de massagem vigorosa nesta cavidade, o lavado resultante foi aspirado através da mesma seringa e agulha, sendo colocados em tubos de propileno, previamente identificados; que foram mantidos em banho de gelo durante todo o procedimento experimental.

4.4.4 Quantificação e teste de viabilidade das células peritoneais

Após obtenção do lavado peritoneal foram retiradas 10µl da suspensão celular, sendo adicionados a esta 90µl de Azul de Tripan em um *eppendorf*, de forma tal a permitir tanto a quantificação como a viabilidade celular. Para tanto, foi realizada a quantificação do número total de macrófagos em câmara de Neubauer, onde foram contadas as células contidas nos quatro quadrantes externos, ou quadrados “brancos”. As células que adquiriram a coloração azul pelo Azul de Tripan foram contadas e consideradas como inviáveis. O número de células presentes na suspensão foi ajustado para 2×10^6 por ml de solução. Somente foram utilizadas suspensões celulares com viabilidade superior a 90%.

4.4.5 Microscópio óptico

Foi utilizado um microscópio óptico (NIKON - Binocular) para efetuar a contagem de células (macrófagos) e núcleo fos positivos. Pode-se, assim, ajustar o número de células necessárias para cada experimento em que se avaliou a atividade de macrófagos.

4.5 MÉTODOS

4.5.1 Observações clínicas

Foi utilizado o teste observacional descrito por Irwin (1968) para realização do “*screening*” farmacológico/toxicológico; através deste teste, pode-se ter uma rápida idéia da toxicidade do composto testado, seus principais efeitos comportamentais, sua duração e, o mais importante, pode-se estimar as doses a serem usadas em maiores detalhes nos testes subseqüentes.

Os animais dos grupos tratados ou não com cialotrina, foram observados diariamente e a cada 24 horas (entre 9:00 – 10:00 hs), imediatamente após cada tratamento, para verificar a presença ou não dos seguintes sinais de intoxicação: mortalidade, sedação, excitação, estereotipia, agressividade, piloereção, salivação, tônus muscular, tremores, convulsões, reatividade ao toque, sono, incoordenação motora, respiração e características das fezes. Cada sinal foi avaliado observando-se os comportamentos espontâneos dos ratos em sua própria caixa de moradia ou através de manipulações padronizadas, como, por exemplo, pressão bilateral sob o flanco do animal (tônus muscular). Mediu-se o peso corporal de todos os animais imediatamente antes dos tratamentos e nos dias experimentais 1, 3, 5 e 7.

4.5.2 Imuno-histoquímica para *c-fos*

Em resposta a diversos estímulos farmacológicos e fisiológicos a proteína *c-fos* expressa-se rapidamente em diferentes locais do cérebro; incluem-se, entre os estímulos que a induzem, fatores de crescimento, neurotransmissores, choques eletroconvulsivos, desafios osmóticos e

estresse. Neste sentido, sabe-se que o núcleo paraventricular hipotalâmico e o baso lateral da amígdala são áreas que expressam *c-fos* em resposta a estímulos estressores (BASSO et al., 2004; BRISKI; GILLEN, 2001). Portanto, foi realizado neste trabalho a quantificação da expressão de *c-fos* nestas áreas com o objetivo de inferir um possível efeito estressor produzido pela cialotrina em ratos.

A reação de imuno-histoquímica para *c-fos* foi efetuada segundo descrito por Basso et al. (2004). Basicamente, os ratos foram anestesiados profundamente com uma associação de cetamina e xilazina para a realização de uma perfusão sistêmica por meio de uma cânula que foi introduzida na artéria aorta com 200 ml de salina tamponada (PBS 0,1 M) e, em seguida com 800 ml de fixador (paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PB) 0,1 M). Imediatamente após, foi realizada a retirada dos encéfalos, os quais permaneceram no mesmo fixador por no mínimo 5 horas sendo, em seguida, “crioprotégidos” por 24 horas em solução de sacarose a 30% em tampão fosfato. Os cérebros foram cortados por congelação (30 µm de espessura), sendo os cortes coletados em tampão fosfato. A seguir, estes cortes foram lavados em PB 0,1 M (3 vezes por 10 minutos) e incubados por 12 horas com anticorpo anti-fos (Ab-5, calbiochem, San Diego, CA) na diluição de 1:1000 em PB com 0,3% de Triton X-100 e 5% de soro normal de cabra. Antes da incubação por 1 hora com o anticorpo secundário biotilado (diluição de 1:200), os cortes foram novamente lavados (3 vezes por 10 minutos). À incubação com o anticorpo secundário (Jackson, West Grove, PA), seguiu-se a incubação com avidina (1:100) e complexo botina-peroxidase (Vectastain Kit, Vector, Burlingame) (1:100) por 1 hora. Em seguida, procedeu-se à revelação com H₂O₂ utilizando-se a diaminobenzidina como cromógeno. Como controles negativos da reação, algumas seções cérebro foram incubadas ou com soro normal de coelho ou na ausência do anticorpo primário. Ambos os procedimentos aboliram completamente a marcação para *fos*. Após terminada a reação, os cortes foram montados em lâminas silanizadas e desidratados. Estes cortes foram, então, contra corados com Giemsa. A localização de corpos

celulares contendo a proteína *fos* em regiões específicas do SNC foi realizada através de microscopia convencional de luz e sua quantificação realizada por meio de análise de imagens auxiliada por computador. A análise de imagens foi feita por meio do *software Image Pro-Plus* (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Para a estimativa do número de células *fos* positivas foram utilizados quatro cortes por animal de cada uma das áreas analisadas. Em cada corte, a área a ser analisada foi delineada de acordo com referências anatômicas e coordenadas estereotáticas. As coordenadas estereotáticas aproximadas das seções utilizadas na contagem de células *fos* positivas foram: núcleo paraventricular do hipotálamo (NPH) bregma $-1,80$ mm e baso lateral da amígdala (BLA) bregma $-2,10$ mm (FRANKLIN; PAXINOS, 1998). A média do número de células marcadas dos dois lados foi utilizada para representar o número de neurônios positivos para *fos* em cada corte, e os animais de cada grupo experimental foram comparados usando-se a média do número de células marcadas em todas as seções analisadas de cada região.

4.5.3 Adrenalectomia

Após tricotomia e assepsia da região dorsal dos animais com álcool iodado, os mesmos foram anestesiados através de uma injeção intraperitoneal de uma associação de cetamina (50,0 mg/Kg) + xilazina (50,0 mg/Kg); inalação de éter etílico foi também usada para manutenção da anestesia. Uma pequena incisão cirúrgica foi, então, feita na pele e no músculo das regiões dorsais laterais direita e esquerda dos animais, na altura da última costela. As adrenais direita e esquerda foram, então, isoladas e retiradas totalmente com auxílio de pinças, sendo o plano muscular e a pele suturadas a seguir. Os animais adrenalectomizados bi-lateralmente foram mantidos com dieta

normal, porém, foi utilizada uma solução de cloreto de sódio 0,9% como água de bebida. Os experimentos foram realizados 7 dias após a adrenalectomia. Os animais falso-operados (“Sham”) passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico, exceto que as adrenais não foram removidas.

Terminados os experimentos, os animais operados foram submetidos a necropsia, com o intuito de verificar a presença de resquícios de adrenais.

4.5.4 Manipulação dos níveis séricos de glicocorticóides

Com a finalidade de manipular os níveis séricos de corticosterona, realizou-se a manipulação dos glicocorticóides através da administração da Metirapona (bloqueador da síntese de corticosterona), por via oral, em duas doses diárias (12h/12h) de 30 mg/kg, por 5 dias consecutivos (SANNOMIYA et al., 1985) e o RU 486 - (antagonista dos receptores de glicocorticóides) - na dose única de 10 mg/kg, via subcutânea (PHILIBERT, 1984).

4.5.5 Dosagem de noradrenalina e metabólitos (MHPG e VMA)

Os animais foram submetidos a eutanásia através de secção cervical, sendo os cérebros rapidamente retirados e lavados com solução salina gelada (4°C). Imediatamente após, cada cérebro foi dissecado sobre placa de petri rodeado por pedras de gelo seco, formando assim um micro-ambiente o mais frio possível. Os dois estriatos e o hipotálamo foram retirados, pesados e

congelados a -80°C num tempo máximo de 3 minutos, onde permaneceram por no máximo 2 meses.

Os tecidos cerebrais foram homogeneizados por sonicação (caneta sonicadora), durante 2 ou 3 minutos sobre uma cuba de gelo seco, com solução de ácido perclórico 0,1 M contendo 0,02% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, EDTA dissódico e uma concentração conhecida de DHBA, utilizado como padrão interno para as dosagens de monoaminas. O DHBA (3,4 diidroxibenzilamina) foi escolhido como padrão interno por ter as mesmas características físico-químicas que as monoaminas dosadas.

As concentrações de noradrenalina e seus metabólitos (MHPG e VMA), foram determinados no hipotálamo e no estriado, utilizando-se para tal o método previamente descrito (FELICIO et al., 1996), que emprega a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), sendo o cromatógrafo acoplado a um detector eletroquímico (HPLC-ED; Shimadzu Modelo 6A). A técnica utilizada é a de cromatografia em fase reversa com pareamento iônico, a qual fundamenta-se na cromatografia de partição ou absorção.

No preparo da fase móvel utilizada na quantificação das monoaminas e seus metabólitos, foi utilizado um sistema isocrático constituído de fosfato dissódico (7,16 g/l), ácido cítrico (4,20 g/l), EDTA (40 mg/l), ácido heptanossulfônico (556 mg/l) e metanol (80 ml/l). O pH desta solução foi acertado para 3,0 com auxílio de ácido ortofosfórico. Esta solução foi então filtrada em um sistema a vácuo e deareado por 30 minutos com fluxo de hélio antes de ser instalada no cromatógrafo. Após sua instalação no sistema cromatográfico, ela ainda permaneceu por uma noite (*overnight*) circulando em sistema fechado para estabilização do aparelho, com fluxo constante de 1,2 ml/min. O detector eletrolítico foi mantido com potencial de + 0,83V no eletrodo de trabalho. A temperatura para amostragem no cromatógrafo foi mantida em 25°C .

A noradrenalina e seus metabólitos (MHPG e VMA) foram reconhecidos através do tempo de retenção na coluna cromatográfica, comparando-se com os padrões de concentrações

conhecidas, sendo que o limite de detecção foi de 0,02 ng e a taxa de recuperação foi maior do que 90%. Para o estabelecimento da precisão intra-ensaio do método cromatográfico foram calculados os coeficientes de variação (CV%) de diferentes concentrações das substâncias analisadas e foram consideradas adequados valores com CV% inferiores a 15%. O tempo total de cada amostra foi de 15 minutos

4.5.6 Simpatectomia química

Com a finalidade de realizar a simpatectomia química, a 6-OHDA foi administrada em ratos adultos, por 4 vezes consecutivas, sendo que as 3 primeiras aplicações foram feitas com intervalo de 48 horas; a primeira administração foi de 40 mg/kg e as outras duas foram de 60 mg/kg. Quatorze (14) dias após a primeira aplicação de 6-OHDA, foi feita a quarta e última administração de 40 mg/kg. Este protocolo foi relatado como sendo capaz de minimizar a toxicidade da 6-OHDA e de otimizar a “depleção” de NE ao mesmo tempo que retarda o “re-aparecimento” das fibras noradrenérgicas, sendo amplamente utilizado para verificar o envolvimento do SNS em doenças (BREIVIK et al., 2005; LORTON et al., 1990).

4.5.7 Citometria de fluxo

Foi utilizado um citômetro de fluxo (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA, USA) acoplado a um computador (Macintosh Apple, CA, USA). Dados de 10.000 eventos, de cada amostra, foram colhidos e analisados pelo software Cell Quest Pro (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA, USA).

Em linhas gerais, populações celulares conduzidas através de um sistema fluídico contínuo são interceptadas por uma fonte luminosa a laser, gerada pela excitação de um laser argônio (488 nm de excitação). A transmissão ou a refração de luz pelas células é captada por meio de quatro detectores: *Forward Scatter* (FSC), o qual é sensível à dispersão frontal da luz; *Side Scatter* (SSC) o qual é sensível à dispersão lateral da luz, bem como dois detectores fluorescentes (FL1 e FL2). Os detectores FSC e SSC foram ajustados para acomodar populações heterogêneas de células presentes na amostra. Para a avaliação celular, uma tensão de 100-200V foi empregada para o FSC, com o objetivo de remover pequenas partículas, incluindo bactérias livres e restos celulares.

Populações celulares discretas foram então reconhecidas com base nos parâmetros FSC/SSC (Figura 1) e registradas eletronicamente (*FAC – Scan*, Becton-Dickinson Immunocytometry Systems). Os dados de fluorescência foram colhidos em escala logarítmica. A fluorescência do DCFH foi medida em 530 ± 30 nm (detector FL1) e a fluorescência do *S. aureus*, marcado com o iodeto de propídeo, foi medida em 585 ± 42 nm (detector FL2).

Figura 1 - Citograma de leucócitos peritoneais de ratos. R1 = linfócitos; R2 = monócitos e R3 = macrófagos. (esquema gentilmente cedido por Costa., 2004)

4.5.8 Conjugação da bactéria *Staphylococcus aureus* com iodeto de propídeo.

Esta técnica tem como princípio marcar a bactéria *Staphylococcus aureus* com iodeto de propídeo, fluorocromo que ao ser excitado por uma fonte emissora de laser ($\lambda=488\text{nm}$) emite fluorescência laranja e que possibilita, assim, sua leitura no citômetro. A intensidade de fluorescência captada pelo detector FL2, permite avaliar o percentual de fagocitose e ainda, analisar a intensidade da resposta pelo número de bactérias fagocitadas pelo macrófago. Por outro lado, em FL1, a intensidade de fluorescência detectada é indicativa de *burst* oxidativo induzido pela fagocitose. O protocolo utilizado para a conjugação da bactéria com o fluorocromo iodeto de propídeo, foi aquele descrito por Hasui et al. (1989) que consiste do seguinte procedimento:

- ✓ Cultivar bactérias viáveis em agar sangue por 48 horas.

- ✓ Colocar as colônias de bactérias em tubos de ensaio estéreis, em um fluxo laminar próprio para bactérias.
- ✓ Ressuspendê-las em NaCL 0,85% e centrifugá-las por 10 minutos a 1124g.
- ✓ Inativa-las em banho-maria a 60°C por 30 minutos.
- ✓ Lavar 3x com NaCL 0,85% e após cada lavagem, centrifugá-las por 10 minutos a 1124g.
- ✓ Ajustar a concentração das bactérias de modo que sua leitura no espectrofotômetro (UV/visível), num comprimento de onda de 620nm, esteja entre 2,4 e 2,7. Estes valores são aqueles equivalentes a uma turbidez de n°. 8 na escala de Mc Farland. Para a leitura no citômetro é necessário que as bactérias estejam nesta concentração.
- ✓ Preparar uma solução de iodeto de propídeo a 5%.
- ✓ Centrifugar nas mesmas condições, desprezar o sobrenadante e adicionar 25µl da solução de iodeto de propídeo a 5%.
- ✓ Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos, no escuro.
- ✓ Lavar a bactéria marcada 3x com NaCL 0,85% e centrifugá-las novamente por 10 minutos a 1124g.
- ✓ Ressuspender a bactéria em 5 ml de PBS glicosado (livre de Ca^{+2} e Mg^{+2}).
- ✓ Distribuir em tubos de microcentrífuga de 2 ml, proteger da luz e congelar a -80°C.
- ✓ Descongelar e homogeneizar imediatamente antes do uso.

Importante salientar que, para evitar contaminações após as bactérias terem sido mortas, todo o procedimento acima descrito foi realizado em um fluxo laminar e todas as soluções utilizadas estavam estéreis.

4.5.9 Medida do burst oxidativo e da fagocitose

Foi empregado o método proposto por Hasui et al. (1989). Nesta técnica foram utilizadas 5 amostras iguais de macrófagos peritoneais, obtidas de um mesmo animal. Estas alíquotas contendo 2×10^5 células/100µl foram incubadas em banho-maria a 37°C, durante 30 minutos, conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1 - Reagentes utilizados para avaliação do burst oxidativo e fagocitose de macrófagos peritoneais através da técnica de citometria de fluxo. Estes reagentes foram incubados com 2×10^5 células/100µl (PBS) em banho-maria a 37°C durante 30 minutos

Reagentes	A	B	C	D	E
PBS	1000µL	800µL	700µL	900µL	700µL
DCFH-DA		200µL	200µL		200µL
PMA			100µL		
<i>S. aureus</i>				100µL	100µL

Tubos: A(branco); B(burst oxidativo espontâneo); C e E (burst oxidativo induzido pelo PMA e *S. aureus*) e E (percentual e intensidade de fagocitose).

Após o período de incubação, foram interrompidas as reações nos tubos que continham a bactéria (tubos D e E) com 2 ml de EDTA gelado (3mM); posteriormente, todas as amostras foram centrifugadas a 259g, durante 10 minutos. O *pellet* de células obtido foi ressuspenso em 500µl de PBS, procedendo-se a leitura das amostras. A magnitude da resposta oxidativa e da fagocítica foi avaliada usando-se a citometria de fluxo.

4.5.10 Procedimento para a quantificação do óxido nítrico (NO) através da produção de nitrito (NO_2^-)

O peróxido de hidrogênio, o nitrito (NO_2^-) e outras espécies de radicais livres, como o NO e o N_2O , são produtos inorgânicos secretados pelos macrófagos; embora a produção destes dois últimos ainda não tenha sido determinada, elas podem ser, a menos teoricamente, inferidas através da medida dos níveis de NO_2^- (DING; NATHAN; STUEHR; 1988). A técnica utilizada para medir a produção de óxido nítrico no presente experimento foi descrita por Ding; Nathan e Stuehr (1988). Esta técnica consiste na determinação indireta de NO, via dosagem de seu metabólito NO_2^- , que é uma molécula estável nas condições em que os experimentos foram realizados.

Após o procedimento descrito no item 4.4, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 1 ml de meio de cultura RPMI, enriquecido com soro fetal bovino estéril. Então, 100µl desta suspensão foram “plaqueados” em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas a 37°C, com 5 % de CO_2 . Após a retirada da placa da estufa, transferiram-se 50µl do sobrenadante de células para outra placa. Nesta nova placa, a primeira coluna foi totalmente preenchida com 50 µl de RPMI, sendo esta coluna denominada de branco (*blanc*). Nas 2^a., 3^a., 4^a. e 5^a. colunas foram colocadas, em quadruplicadas, 50µl de concentrações conhecidas de nitrito de sódio, a saber: 5; 10; 30; 60; 90; 120; 150 e 180 µmoles de nitrito de sódio diluídos em RPMI, de modo a permitir a obtenção de uma curva padrão. Após a transferência do sobrenadante com as células, foram adicionados 50 µl do reagente de Griess a todos os poços da nova placa.

A produção de NO_2^- foi determinada em um leitor de Elisa no comprimento de onda de 540 nm. Os resultados obtidos após a leitura foram expressos em densidade óptica (D.O), sendo

transformados em nmoles de nitritos liberados por 2×10^6 células peritoneais, mediante equação de regressão linear com base na curva padrão. Como a produção de NO_2^- foi medida em octoplicada para cada animal, a média dos valores encontrados foi tomada como indicativa da medida desta concentração.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Antes de aplicar-se a análise estatística destinada a possibilitar a interpretação dos resultados obtidos, verificou-se, através do teste de Bartlett, qual tipo de teste - paramétrico ou não paramétrico - seria o mais adequado para cada situação experimental.

Em sendo os dados obtidos paramétricos, como foi o caso dos experimentos 2 a 14 descritos a seguir, empregou-se a análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey – Kramer de comparações múltiplas, para avaliação dos contrastes. Os dados obtidos no experimento 6, relativos à produção de óxido nítrico, não eram paramétricos; portanto, para análise deste parâmetro, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas.

Todas as análises estatísticas foram feitas com o auxílio do programa GraphPad Instat versão 3.0 para Mac OS X, sendo considerados significantes todas as análises em que se obteve um $p \leq 0,05$. Os resultados obtidos nos diferentes experimentos foram todos representados pela média $\pm$ SD.

6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

6.1 OBSERVAÇÕES CLÍNICAS: SINAIS

Por se tratar de uma substância reconhecidamente tóxica (cialotrina) e por estar utilizando um novo lote do produto Grenade[®], repetiram-se os testes observacionais, anteriormente realizados (ABBUD RIGHI; PALERMO-NETO., 2003), e descritos por Irwin (1968) para o “*screening*” farmacológico/toxicológico.

Experimento 1 – Observações clínicas: sinais

Foram utilizados 30 ratos Wistar, divididos ao acaso em 3 grupos iguais de 10 animais cada: 2 grupos experimentais e 1 controle. Os animais dos grupos experimentais receberam por via oral (gavage), durante 7 dias consecutivos, diferentes doses de cialotrina, respectivamente: E1 = 1mg/kg e E2 = 3mg/kg. Os animais do grupo controle (C) receberam, pela mesma via, idêntico volume do veículo da cialotrina, presente no produto acabado Grenade[®]. Os animais dos diferentes grupos foram observados diariamente e a cada 24 horas (entre 9:00 – 10:00 hs), imediatamente após cada tratamento, para verificação de presença ou não dos sinais de intoxicação descritos no item 4.5.1.

Resultados

A administração da cialotrina nas doses de 1,0 e 3,0 mg/kg de peso vivo, durante 7 dias consecutivos, não induziu qualquer sinal de intoxicação nos ratos. De fato, não foram observadas

quaisquer diferenças entre os animais dos grupos C, E1 e E2 no que diz respeito aos diferentes itens observacionais que foram utilizados para a análise de toxicidade descritos no item 4.5. (dados não mostrados).

Neste sentido, não foram encontrados também diferenças de peso entre os animais dos diferentes grupos. As médias dos pesos dos animais dos diferentes grupos no último dia de tratamento foram: C = $269,3 \pm 14,7$; E1 = $272,3 \pm 9,6$ e E2 = $273,1 \pm 12,3$.

Apesar destas doses não terem induzido sinais de intoxicação, a dose de 3,0 mg/kg de cialotrina produziu alterações comportamentais em ratos avaliados no campo aberto, labirinto em cruz elevado e interação social. De fato, a administração de 3,0 mg/kg de cialotrina por 7 dias em ratos, foi capaz de reduzir o percentual de tempo gasto na exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado e reduzir o tempo gasto em interação social, indicando um maior nível de ansiedade, sendo estas alterações similares àsquelas induzidas pela administração de picrotoxina. A NOEL (“No Effect Level”) encontrada para as avaliações comportamentais foi de 1,0 mg/kg de cialotrina (ABBUD RIGHI; PALERMO-NETO, 2003).

6.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CIALOTRINA NA DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE C-FOS NO NÚCLEO PARAVENTRICULAR HIPOTALÂMICO E BASO LATERAL DA AMIGDALA

Observadas as alterações de comportamento induzidas pela administração da cialotrina, e lembrando-se que este tratamento leva a uma aumento dos níveis de corticosterona (ABBUD RIGHI; PALERMO-NETO, 2003), tornou-se natural investigar possíveis áreas do Sistema Nervoso Central que estariam a elas relacionadas. Uma vez que está bem estabelecido que a expressão de *c-fos* pode ser empregada como marcador da ativação neuronal (DRAGUNOV; FALL, 1989; SAGAR; SHARP; CURRAN, 1988) e que sabe-se serem os núcleos paraventricular hipotalâmico e o baso lateral da amigdalá áreas que expressam *c-fos* em resposta a estímulos

estressores (BRISKI; GILLEN, 2001), decidimos avaliar o número de neurônios positivos para fos nestas duas áreas específicas após o tratamento por 7 dias consecutivos com 1,0 e 3,0 mg/kg de cialotrina.

Experimento 2 - Quantificação da distribuição da expressão de *c-fos* nos núcleos paraventricular hipotalâmico e baso lateral da amígdala, após administração por 7 dias consecutivos de cialotrina nas doses de 1,0 e 3,0 mg/kg.

30 ratos foram divididos ao acaso em 3 grupos iguais, sendo 2 grupos experimentais e 1 controle (E1, E2 e C). Os animais dos grupos experimentais receberam por via oral (gavage), durante 7 dias consecutivos, diferentes doses de cialotrina, respectivamente: E1 = 1,0 mg/kg; E2 = 3,0 mg/kg. Os animais do grupo controle (C) receberam, pela mesma via, idêntico volume do veículo da cialotrina. Após 24 horas da última administração de cialotrina ou do veículo desta, realizou-se o procedimento de imunohistoquímica para avaliação de *c-fos* no núcleo paraventricular hipotalâmico e no baso lateral da amígdala, conforme descrito no item 4.5.2.

Resultados

A figura 2 ilustra e a tabela 2 mostra que a administração de 3,0 mg/kg de cialotrina por 7 dias consecutivos foi capaz de provocar a ativação das células do núcleo paraventricular do hipotálamo, mas não das células do baso lateral da amígdala (figura 4). Observa-se, ainda, através da figura 2 e da tabela 2, que a dose de 1,0 mg/kg de cialotrina por 7 dias consecutivos não produziu quaisquer alterações na expressão de *c-fos* nesta região.

Figura 2 - Expressão de c-fos no núcleo paraventricular do hipotálamo do cérebro de ratos tratados ou não com cialotrina. Os dados representam as médias $\pm$ SD. 10 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. teste Anova seguido de Tukey Kramer. C= Controle; E1=1,0 mg/kg de cialotrina; E2=3,0 mg/kg de cialotrina

Tabela 2 - Efeitos da administração oral de cialotrina durante 7 dias consecutivos sobre a expressão de c-fos no núcleo paraventricular do hipotálamo. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão.

Grupos ¹	C (N=10)	E1 (N=10)	E2 (N=10)
Número de núcleos fos positivos	1,75 $\pm$ 1,25	2,75 $\pm$ 0,95	20,75 $\pm$ 6,50*

¹ C= controle; E1= 1,0mg/kg de cialotrina; E2 = 3,0mg/kg de cialotrina.
Anova seguida do teste de Tukey-Kramer, * $p < 0,05$ em relação ao grupo C.

A figura 3 ilustra três cortes transversais dos cérebros, em áreas correspondentes ao núcleo paraventricular do hipotálamo. Pode-se observar a grande quantidade de células marcadas para fos nos animais tratados com 3,0 mg/kg de cialotrina (Figura 3C) em relação àsquelas do grupo controle (Figura 3A) ou do grupo tratado com 1,0 mg/kg de cialotrina (Figura 3B).

Figura 3 - Fotomicrografia de secções coronais de cérebro mostrando marcação para a proteína fos em neurônios do NPH (área demarcada pela linha pontilhada) de ratos tratados ou não com cialotrina. (A) animais do grupo controle, (B) e (C) animais tratados com 1,0 e 3,0 mg/kg de cialotrina, respectivamente

A figura 4 ilustra três cortes transversais dos cérebros, em áreas correspondentes ao baso lateral da amígdala. Observa-se que não houve marcação para c-fos independentemente do tratamento

Figura 4 - Fotomicrografia de secções coronais de cérebro mostrando ausência de marcação para a proteína fos em neurônios do baso lateral da amígdala (área demarcada pela linha pontilhada) de ratos tratados ou não com cialotrina. (A) animais do grupo controle, (B) e (C) animais tratados com 1,0 e 3,0 mg/kg de cialotrina, respectivamente

6.3 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CIALOTRINA, SOBRE A ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS ATIVADOS POR DUAS DOSES DE ONCO-BCG E AVALIADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Considerando-se as alterações de atividade de macrófagos peritoneais induzidas pela administração da cialotrina, por nós descritas, tais como redução no percentual de espraçamento e fagocitose de partículas de zimozan e diminuição da liberação de óxido nítrico efetuado por macrófagos, ativados por duas doses de 0,25 ml de Onco-BCG, intervalada por 7 dias, (Righi, 2003), pareceu-nos relevante realizar um estudo que comprovasse a interferência da cialotrina sobre a atividade de macrófagos peritoneais, usando-se de outra metodologia mais sensível. Assim, buscou-se avaliar mais especificamente a fagocitose de *S. aureus* realizada por macrófagos peritoneais usando-se citometria de fluxo, quantificando-se, também, a produção de nitrito através de método de Ding et al. (1988).

Experimento 3 - Avaliação da atividade de macrófagos peritoneais de ratos após ativação por duas doses de Onco-BCG e tratamento com 1,0 e 3,0 mg/kg de cialotrina, durante 7 dias consecutivos, através de citometria de fluxo.

Foram utilizados 30 ratos, divididos ao acaso em 3 grupos iguais: 1 grupo controle (C) e 2 grupos experimentais (E1 e E2). Os animais dos grupos experimentais receberam por via oral (gavage) e durante 7 dias consecutivos, duas doses de cialotrina, respectivamente: E1 = 1mg/kg; E2 = 3mg/kg. Os animais do grupo controle foram tratados, pela mesma via, com idêntico volume do veículo da cialotrina. Para ativar os macrófagos da cavidade peritoneal, os animais de todos os grupos, receberam pela via i.p. duas dose de Onco-BCG, sendo a primeira dose de 0,5ml e a segunda de 0,25 ml, realizada 5 dias após a primeira administração, conforme descrito no item 4.4.2. As administrações de cialotrina e/ou do veículo desta iniciaram-se no dia da primeira

administração de BCG. A avaliação da atividade de macrófagos peritoneais através das técnicas de citometria de fluxo (item 4.5.7) foi feita 2 dias após a segunda dose de BCG. Para tanto, as células peritoneais foram colhidas e contadas, como descrito nos item 4.4. A figura 5 ilustra este procedimento experimental.

Figura 5 - Procedimento experimental usado para avaliar os efeitos da administração da cialotrina sobre a atividade de macrófagos peritoneais de ratos, ativados pelo Onco-BCG

Resultados

A tabela 3 mostra e as figuras 6 e 7 ilustram os efeitos da cialotrina (1mg/kg e 3 mg/kg) sobre a atividade de macrófagos peritoneais ativados por BCG.

Tabela 3 - Efeitos da administração oral de cialotrina durante 7 dias consecutivos sobre a atividade de macrófagos peritoneais ativados por BCG e medida por citometria de fluxo. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão

Parâmetros	Grupos ¹		
	C	E1	E2
%células realizando fagocitose	31,7 $\pm$ 3,71	25,5 $\pm$ 2,78*	25,19 $\pm$ 1,77*
Intensidade de fagocitose	26,77 $\pm$ 2,36	25,66 $\pm$ 0,79	24,22 $\pm$ 1,60*
Burst Oxidativo (<i>S.aureus</i>)	7,2 $\pm$ 1,2	7,0 $\pm$ 1,5	6,9 $\pm$ 1,7
Burst Oxidativo (PMA)	12,2 $\pm$ 0,9	11,8 $\pm$ 1,3	12,1 $\pm$ 0,7

¹C= controle; E1= 1,0 e E2= 3 mg/kg de cialotrina presente no produto Grenade®. N= 10 animais/grupo. *p<0,05 em relação ao grupo controle. Anova seguido do teste de Tukey-Kramer.

Figura 6 - Efeitos da administração de cialotrina sobre a porcentagem de fagocitose de macrófagos peritoneais, ativados por BCG e avaliada por citometria de fluxo. Os dados representam as médias $\pm$ SD de 10 animais/ grupo. *p<0,05 comparado ao grupo controle (teste Anova seguido de Tukey Kramer). C= Controle; E1=1,0 mg/kg; E2=3,0 mg/kg de cialotrina

Figura 7 - Efeitos da administração de cialotrina sobre a intensidade de fagocitose de macrófagos peritoneais, ativados por BCG e avaliada por citometria de fluxo. Os dados representam as médias $\pm$ SD de 10 animais/ grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste Anova seguido de Tukey Kramer). C= Controle; E1=1,0 mg/kg; E2=3,0 mg/kg de cialotrina

A análise estatística dos dados de fagocitose mostrou a existência de uma diferença estatisticamente significativa entre os dados dos grupos tratados com as duas doses de cialotrina e os do grupo controle. Pode-se perceber que houve uma diminuição no percentual de células que efetuaram a fagocitose, nos animais dos grupos que receberam a cialotrina nas doses de 1,0 e 3,0 mg/kg quando comparados àqueles do grupo que recebeu o veículo ($F(2,27) = 16,351$; $p < 0,001$); entretanto, no que diz respeito à intensidade de fagocitose, observamos que apenas o tratamento com 3,0 mg/kg de cialotrina foi capaz de diminuir este parâmetro quando comparado ao grupo de animais que recebeu o veículo ($F(2,27) = 5,576$; $p < 0,05$). Observamos, ainda, que o tratamento com as duas doses de cialotrina não foi capaz de alterar o *burst* oxidativo induzido pelo PMA e pela bactéria. Portanto, verificamos que a administração de cialotrina durante 7 dias consecutivos diminuiu a fagocitose (avaliada por citometria de fluxo) de macrófagos ativados por BCG, entretanto, este mesmo tratamento não foi capaz de alterar o *burst* oxidativo, também medido por citometria de fluxo.

Experimento 4 - Avaliação da produção de nitrito (NO_2^-) realizada por macrófagos peritoneais de ratos após ativação por Onco-BCG e tratamento com 1,0 e 3,0 mg/kg de cialotrina, durante 7 dias consecutivos.

Foram utilizados 30 ratos, divididos ao acaso em 3 grupos iguais: 1 grupo controle (C) e 2 grupos experimentais (E1 e E2). Os animais dos grupos experimentais receberam por via oral (gavage), durante 7 dias consecutivos, duas doses de cialotrina, respectivamente: E1 = 1mg/kg; E2 = 3mg/kg. Os animais do grupo controle foram tratados, pela mesma via, com idêntico volume do veículo da cialotrina. Para ativar os macrófagos da cavidade peritoneal, os animais de todos os grupos, receberam pela via i.p. duas doses de Onco-BCG: a primeira dose de 0, 5ml e a segunda dose de 0,25 ml, 5 dias após a primeira administração, conforme descrito no item 4.4.2. As administrações de cialotrina e/ou do veículo desta iniciaram-se no dia da primeira administração de BCG. Avaliação da produção de nitrito (NO_2^-) (item 4.5.10) foi feita 2 dias após a segunda dose de BCG, conforme especificado em 4.4.2. Para tanto, as células peritoneais foram colhidas e contadas, como descrito nos item 4.4.3 e 4.4.4. A figura 4 ilustra este procedimento experimental.

A tabela 4 mostra e a figura 8 ilustra os efeitos da cialotrina (1,0 e 3 mg/kg) sobre a produção de nitrito (NO_2^-) realizada por macrófagos peritoneais de ratos, após ativação por BCG.

Tabela 4 - Efeitos da administração oral de cialotrina durante 7 dias consecutivos sobre a produção de nitrito (NO_2^-) por macrófagos peritoneais de ratos após ativação por BCG. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão ($\mu\text{mol}/2 \times 10^6$ células)

Grupos ¹	Número de animais	NO_2^-
C	10	104,32 $\pm$ 11,34
E1	10	81,26 $\pm$ 13,90 ⁺
E2	10	59,81 $\pm$ 25,79 ^{*#}

¹ C= controle; E1= 1,0 e E2= 3,0 mg/kg de cialotrina

*p<0,001 e ⁺ p<0,01 em relação ao grupo controle; [#] p<0,01 em relação ao grupo E1. ANOVA seguido do teste de Tukey-kramer.

Figura 8 - Efeitos da administração de cialotrina sobre a produção de nitrito (NO_2^-), por macrófagos peritoneais de ratos, ativados por BCG. Os dados apresentam a média $\pm$ desvio padrão. C= controle; E1= 1,0 e E2= 3,0 mg/kg de cialotrina. N=10 animais/grupo * p<0,001 e ⁺ p<0,01 em relação ao grupo controle; [#] p<0,01 em relação ao grupo E1. ANOVA seguido do teste de Tukey-kramer

A análise dos dados mostrou que a administração de cialotrina produziu uma diminuição dose dependente da produção de nitrito efetuada pelos macrófagos ativados por BCG ($F(2,26)=23,189$; $p<0,0001$).

6.4 PARTICIPAÇÃO DO EIXO HHA NOS EFEITOS DA CIALOTRINA. ENVOLVIMENTO DA CORTICOSTERONA

6.4.1 Parte I – Adrenalectomia

Observadas as alterações de atividade de macrófagos peritoneais induzidas pela administração da cialotrina e sabendo-se que a administração de 3,0 mg/kg de cialotrina, por 7 dias consecutivos, aumenta os níveis séricos de corticosterona (RIGHI; PALERMO-NETO, 2003), tornou-se relevante realizar um estudo que elucidasse a participação da corticosterona nestes dados, especialmente no que diz respeito à fagocitose e à produção de óxido nítrico (NO). De fato, sabe-se que os macrófagos têm receptores de superfície para glicocorticóides (AUGER; ROSS, 1991) que, se ativados, modulam estas respostas.

Experimento 5 - Avaliação da atividade de macrófagos peritoneais de ratos adrenalectomizados, após a administração oral de cialotrina nas doses de 1,0 e 3,0 mg/kg, por 7 dias consecutivos.

Foram utilizados 40 ratos; destes, 30 animais foram adrenalectomizados conforme descrito no item 4.5.3 e divididos após e ao acaso em 3 grupos iguais, sendo 2 grupos experimentais e 1 controle (E1, E2 e C2); os 10 ratos restantes foram manipulados cirurgicamente conforme descrito no item 4.5.3, sem a retirada das adrenais. Este grupo de animais constituiu o controle falso operado (C1), não recebendo qualquer tipo de tratamento. Após 7 dias do procedimento cirúrgico, os animais dos grupos experimentais (E1 e E2) receberam por via oral (gavage) e durante 7 dias consecutivos, E1 = 1,0 mg/kg; E2 = 3,0 mg/kg

de cialotrina, respectivamente. Os animais do grupo controle (C2) receberam, pela mesma via e tempo, idêntico volume do veículo da cialotrina. Para ativar os macrófagos da cavidade peritoneal, os animais de todos os grupos receberam pela via i.p. duas doses de Onco-BCG, conforme descrito no item 4.4.2. O dia da 1ª injeção de Onco-BCG foi considerada como dia 1 do experimento. As administrações de cialotrina e/ou do veículo desta iniciaram-se no dia da primeira administração de BCG. No quinto dia após a primeira administração do inóculo (BCG) os animais dos 4 grupos receberam a segunda dose de BCG. A avaliação da atividade de macrófagos peritoneais, através das técnicas de determinação da fagocitose de *S. aureus* efetuada por macrófagos peritoneais, avaliada por citometria de fluxo (item 4.5.7), e da quantificação da produção de nitrito (item 4.5.10), foi feita 2 dias após a segunda dose de BCG. Para tanto, as células peritoneais foram colhidas e contadas, como descrito nos itens 4.4.3 e 4.4.4.

Após este procedimento, buscou-se verificar nos animais adrenalectomizados, através de necropsia e histologia, a presença de resquícios das adrenais; caso fossem encontrados, os dados experimentais obtidos destes animais seriam descartados.

Resultados

A tabela 5 mostra e as figuras 9 e 10 ilustram os efeitos de duas doses de cialotrina (1mg/kg e 3 mg/kg) sobre a fagocitose de macrófagos peritoneais de ratos adrenalectomizados ou não, após ativação por BCG.

Tabela 5 - Efeitos da administração oral de cialotrina durante 7 dias consecutivos sobre a atividade de macrófagos peritoneais após ativação por BCG e medidos por citometria de fluxo em ratos adrenalectomizados. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão.

Parâmetros	Grupos ¹			
	C1	C2	E1	E2
% de fagocitose	32,7 $\pm$ 3,66	33,0 $\pm$ 4,21	31,08 $\pm$ 2,44	29,00 $\pm$ 1,36 [#]
Intensidade de fagocitose	26,62 $\pm$ 0,90	27,04 $\pm$ 1,25	26,38 $\pm$ 1,44	25,15 $\pm$ 0,77*

¹**C1**= Falso operado; **C2**= adrenalectomizado mais veículo da cialotrina; **E1**= adrenalectomizado mais 1,0 mg/kg de cialotrina e **E2**= adrenalectomizado mais 3 mg/kg de cialotrina. N= 10 animais/grupo. [#]p<0,05 em relação ao grupo C1 e C2. Anova seguido do teste de Tukey-Kramer.

Figura 9 - Efeitos da administração de cialotrina sobre a porcentagem de fagocitose de macrófagos peritoneais após ativação por BCG; a avaliação foi feita por citometria de fluxo em ratos adrenalectomizados. Os dados representam as médias $\pm$ SD. 10 animais/ grupo. *p<0,05 comparado aos grupos C1 e C2. Teste Anova seguido de Tukey Kramer. **C1**= Falso operado; **C2**= adrenalectomizado mais veículo da cialotrina; **E1**= adrenalectomizado mais 1,0 mg/kg e **E2**= adrenalectomizado mais 3 mg/kg de cialotrina

Figura 10 - Efeitos da administração de cialotrina sobre a intensidade de fagocitose de macrófagos peritoneais após ativação por BCG; a avaliação foi feita por citometria de fluxo em ratos adrenalectomizados. Os dados representam as médias $\pm$ SD. 10 animais/ grupo. * $p < 0,05$ comparado aos grupos C1 e C2. teste Anova seguido de Tukey Kramer. **C1**= Falso operado; **C2**= adrenalectomizado mais veículo da cialotrina; **E1**= adrenalectomizado mais 1,0 mg/kg e **E2**= adrenalectomizado mais 3 mg/kg de cialotrina

A análise estatística dos dados relativos ao percentual de fagocitose mostrou a existência de uma diferença significativa entre grupos tratados com as duas doses de cialotrina e os do grupo controle. Pode-se perceber que houve uma diminuição no percentual de fagocitose dos animais dos grupos que receberam a cialotrina na dose de 3,0 mg/kg quando comparados àqueles do grupo que recebeu o veículo desta, ($F(3,36) = 3,442$; $p < 0,05$); o mesmo aconteceu no que diz respeito à intensidade de fagocitose; observou-se que apenas o tratamento com 3,0 mg/kg de cialotrina foi capaz de diminuir este parâmetro quando comparados ao avaliado nos animais do grupo que recebeu o veículo ($F(3,36) = 5,154$; $p < 0,05$). Portanto, verificamos que a administração de cialotrina, durante 7 dias consecutivos, diminuiu a fagocitose (avaliados por citometria de fluxo) de macrófagos ativados por BCG apenas após a dose de 3 mg/kg também em ratos adrenalectomizados.

A tabela 6 mostra os efeitos de duas doses de cialotrina (1mg/kg e 3 mg/kg), sobre a produção de nitrito (NO_2^-) por macrófagos peritoneais de ratos adrenalectomizados ou não após ativação por BCG.

Tabela 6 - Efeitos da administração oral de cialotrina durante 7 dias consecutivos, sobre a produção de nitrito (NO_2^-) por macrófagos peritoneais após ativação por BCG, em ratos adrenalectomizados. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão ($\mu\text{mol}/2 \times 10^6$ células)

Grupos ¹	Número de animais	NO_2^-
C1	10	$86,5 \pm 17,13$
C2	10	$89,4 \pm 18,78$
E1	10	$71,04 \pm 16,914$
E2	10	$75,45 \pm 18,24$

¹ C1= Falso operado; C2= adrenalectomizado mais veículo da cialotrina; E1= adrenalectomizado mais 1,0 mg/kg e E2= adrenalectomizado mais 3 mg/kg de cialotrina. ANOVA seguido do teste de Tukey-kramer.

A análise estatística dos dados de produção de óxido nítrico mostrou inexistência de diferenças estatisticamente significantes entre os resultados dos grupos tratados com duas doses de cialotrina e aqueles obtidos nos animais dos grupos controles ($F(3,36) = 2,424$, $p < 0,05$). Portanto, verificamos que a adrenalectomia reverteu os efeitos do tratamento com cialotrina sobre a produção de óxido nítrico realizada por macrófagos peritoneais.

6.4.2 Parte II - Manipulação dos níveis séricos de glicocorticóides

Com a finalidade de confirmar os dados obtidos no ensaio de adrenalectomia, e também para avaliar a possibilidade de que eventuais níveis de corticosterona circulantes após adrenalectomia estivessem atuando, foi feita a manipulação farmacológica dos glicocorticóides. Para tanto, usou-se um inibidor de síntese (metirapona) e de um antagonista dos receptores de corticosterona (RU 486).

Experimento 6 - Avaliação da atividade de macrófagos peritoneais de ratos tratados ou não com um inibidor da síntese (Metirapona) associado a um antagonista de receptores de corticosterona (RU 486), após a administração por 7 dias consecutivos de cialotrina, nas doses de 1,0 e 3,0 mg/kg.

40 ratos foram divididos ao acaso em 4 grupos iguais, sendo 2 grupos experimentais e 2 controles (E1, E2, C1 e C2). Os animais dos grupos C2, E1 e E2 foram tratados com metirapona e RU 486, conforme descrito no item 4.5.4. Os animais do grupo C1 receberam os veículos da metirapona e do RU 486 nos mesmos momentos. Os animais dos grupos experimentais receberam por via oral (gavage), durante 7 dias consecutivos, duas doses de cialotrina, respectivamente: E1 = 1,0 mg/kg; E2 = 3,0 mg/kg. Os animais do grupo controle (C1 e C2) receberam, pela mesma via, idêntico volume do veículo da cialotrina. Para ativar os macrófagos da cavidade peritoneal, os animais de todos os grupos receberam pela via i. p., duas doses de Onco-BCG, conforme descrito no item 4.4.2. O dia da 1ª injeção de Onco-BCG foi considerado como dia 0 do experimento, conforme mostra a figura 10. A administração da cialotrina e/ou do veículo da mesma iniciou-se no dia 0 e o tratamento com metirapona iniciou-se no dia 1 e terminou no dia 6. No dia 5, foi administrado a segunda dose de BCG e, no dia 6, foi administrado o RU 486. No dia 7, foi feita a

avaliação da atividade de macrófagos peritoneais através das técnicas de determinação da fagocitose de *S. aureus* efetuada por macrófagos peritoneais, avaliada por citometria de fluxo (item 4.5.7), e da quantificação da produção de nitrito (item 4.5.10). O soro dos animais dos diferentes grupos foi coletado para posterior quantificação dos níveis séricos de corticosterona. A figura 11 ilustra este procedimento experimental.

Figura 11 - Procedimento experimental utilizado no experimento 6

Resultados

A tabela 7 mostra e as figuras 12 e 13 ilustram os efeitos da cialotrina (1,0 mg/kg e 3,0 mg/kg) sobre fagocitose de macrófagos peritoneais de ratos, após ativação por BCG e tratamento com metirapona mais RU486.

Tabela 7 - Efeitos da administração oral de cialotrina durante 7 dias consecutivos sobre a atividade de macrófagos peritoneais de ratos (ativados por BCG) e medida após tratamento com metirapona mais RU486. A medida foi feita por citometria de fluxo. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão

Parâmetros	Grupos ¹			
	C1	C2	E1	E2
% de fagocitose	32,1 $\pm$ 2,88	31,8 $\pm$ 4,34	28,97 $\pm$ 1,57	28,09 $\pm$ 1,29*
Intensidade de fagocitose	26,34 $\pm$ 1,26	26,39 $\pm$ 0,83	25,76 $\pm$ 1,34	24,44 $\pm$ 1,59*

¹C1= Veículo da cialotrina mais veículo da metirapona e do RU486; C2= veículo da cialotrina mais metirapona e RU486; E1= 1,0 mg/kg de cialotrina mais metirapona e RU486 e E2= 3 mg/kg de cialotrina mais metirapona e RU486. N= 10 animais/grupo. *p<0,05 em relação ao grupo C1 e C2. Anova seguido do teste de Tukey-Kramer.

Figura 12 - Efeitos da administração de cialotrina sobre a porcentagem de fagocitose de macrófagos peritoneais de ratos após ativação por BCG e medida após tratamento com metirapona e RU 486; a avaliação foi feita por citometria de fluxo. Os dados representam as médias $\pm$ SD. 10 animais/ grupo. *p<0,05 comparado aos grupos C1 e C2. Teste Anova seguido de Tukey Kramer. C1= Veículo da cialotrina mais veículo da metirapona e do RU486; C2= veículo da cialotrina mais metirapona e RU486; E1= 1,0 mg/kg de cialotrina mais metirapona e RU486 e E2= 3 mg/kg de cialotrina mais metirapona e RU486

Figura 13 - Efeitos da administração de cialotrina sobre a intensidade de fagocitose de macrófagos peritoneais de ratos após ativação por BCG e medida após tratamento com metirapona e RU 486; a avaliação foi feita por citometria de fluxo. Os dados representam as médias $\pm$ SD. 10 animais/ grupo. * $p < 0,05$ comparado aos grupos C1 e C2. Teste Anova seguido de Tukey Kramer. **C1**= Veículo da cialotrina mais veículo da metirapona e do RU486; **C2**= veículo da cialotrina mais metirapona e RU486; **E1**= 1,0 mg/kg de cialotrina mais metirapona e RU486 e **E2**= 3 mg/kg de cialotrina mais metirapona e RU486

A análise estatística dos dados de percentual de fagocitose de macrófagos ativados provenientes de ratos tratados com inibidor da síntese e antagonista de receptores para corticosterona mostrou a existência de uma diferença significativa entre os dados dos grupos tratados com duas doses de cialotrina e aqueles dos grupos controles (C1 e C2). Pode-se perceber que houve uma diminuição no percentual de fagocitose dos animais dos grupos que receberam a cialotrina na dose de 3,0 mg/kg quando comparados àqueles do grupo que receberam o veículo desta, ($F(3,36) = 5,152$; $p < 0,05$); o mesmo aconteceu no que diz respeito a intensidade de fagocitose. Observamos que apenas o tratamento com 3,0 mg/kg de cialotrina foi capaz de diminuir este parâmetro quando comparados ao grupo que recebeu o veículo da cialotrina ($F(3,36) = 4,960$; $p < 0,05$). Portanto, verificamos que a administração de 3,0 mg/kg cialotrina, durante 7 dias consecutivos, também diminui a fagocitose de macrófagos ativados por BCG provenientes de ratos tratados com inibidor da síntese e antagonista de receptores para corticosterona.

A tabela 8 mostra os efeitos da cialotrina (1mg/kg e 3 mg/kg) sobre a produção de NO de macrófagos peritoneais de ratos, após ativação por BCG e tratamento com metirapona mais RU486.

Tabela 8 - Efeitos da administração oral de cialotrina durante 7 dias consecutivos sobre a produção de NO por macrófagos peritoneais de ratos após ativação por BCG e medida após tratamento com metirapona e RU486 Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão ($\mu\text{mol}/2 \times 10^6$ células)

Grupos ¹	Número de animais	NO ₂ ⁻
C1	10	64,08 $\pm$ 48,124
C2	10	61,22 $\pm$ 22,54
E1	10	36,71 $\pm$ 8,544
E2	10	75,85 $\pm$ 38,26

¹ **C1**= Veículo da cialotrina mais veículo da metirapona e do RU486; **C2**= veículo da cialotrina mais metirapona e RU486; **E1**= 1,0 mg/kg de cialotrina mais metirapona e RU486 e **E2**= 3 mg/kg de cialotrina mais metirapona e RU486 Teste não paramétrico -Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

A análise estatística dos dados de produção de óxido nítrico mostrou inexistência de diferenças estatisticamente significantes entre os resultados dos grupos tratados com duas doses de cialotrina e aqueles obtidos nos animais dos grupos controles (KW=7,332; $p < 0,05$). Portanto, verificamos que a produção de óxido nítrico de ratos pré-tratados com inibidor da síntese e antagonista de receptores para corticosterona reverteu os efeitos do tratamento com cialotrina sobre a produção de óxido nítrico de macrófagos peritoneais.

6.5 PARTICIPAÇÃO DO SNAS NOS EFEITOS DA CIALOTRINA.

6.5.1 Parte I – Dosagem de Noradrenalina e seus metabólitos (VMA e MHPG)

Diversos pesquisadores mostraram que os piretróides induziam uma liberação de neurotransmissores (BROOKS; CLARK, 1987; DOHERTY et al., 1986, 1987) e que a indução da liberação dos neurotransmissores por estes praguicidas ocorria apenas na presença de altas concentrações (DOHERTY et al., 1986, 1987) ou requeria a presença de outro estímulo despolarizante (BROOKS; CLARK, 1987; CLARK; BROOKS, 1989; SHAFER; MEYER, 2004). Ademais, sabe-se que a ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal é facilitada pela liberação de noradrenalina induzida pelo estresse, em certas regiões do Sistema Nervoso Central, incluindo-se, neste contexto, o núcleo paraventricular do hipotálamo (MA; MORILAK., 2005; MORILAK et al., 2005; PARDON et al., 2003)

Portanto, resolvemos verificar se a administração de cialotrina por sete dias consecutivos poderia estar influenciando a liberação de neurotransmissores, mais especificamente, da noradrenalina e seus metabólitos no hipotálamo e estriato.

Experimento 7 - Quantificação dos níveis de noradrenalina e seus metabólitos (VMA e MHPG) no hipotálamo e estriato de ratos tratados com 1,0 e 3,0 mg/kg de cialotrina, por 7 dias consecutivos.

30 ratos foram divididos ao acaso em 3 grupos iguais, sendo 2 grupos experimentais e 1 controle (E1, E2 e C). Os animais dos grupos experimentais receberam por via oral (gavage), durante 7 dias consecutivos, diferentes doses de cialotrina, respectivamente: E1 = 1,0 mg/kg; E2

= 3,0 mg/kg. Os animais do grupo controle (C) receberam, pela mesma via, idêntico volume do veículo da cialotrina. Após 24 horas da última administração da cialotrina ou do veículo, foi realizado o procedimento de colheita e processamento dos tecidos cerebrais para neuroquímica de noradrenalina e metabólitos (VMA e MHPG) conforme descrito no item 4.5.5.

Resultados

As tabelas 9 e 10 mostram e a figura 14 ilustra os efeitos da cialotrina (1mg/kg e 3 mg/kg) sobre os níveis e “turnover” hipotalâmicos e estriatais de noradrenalina de ratos adultos.

Uma primeira análise dos dados apresentados na tabela 9 demonstrou que houve uma interação entre o tratamento com cialotrina e os níveis hipotalâmicos de noradrenalina. De fato, como pode ser observado na figura 14, a administração de cialotrina na dose de 3,0 mg/kg aumentou os níveis hipotalâmicos de noradrenalina quando comparados àqueles medidos nos animais do grupo controle ($F(2,27) = 4,317$; $p < 0,05$). Entretanto, o mesmo tratamento com cialotrina nas doses de 1,0 e 3,0 mg/kg (por 7 dias consecutivos) não foi capaz de modificar o “turnover” hipotalâmico de Noradrenalina (MHPG/NOR - $F(2,27) = 2,561$; $p < 0,05$; VMA/NOR - $F(2,27) = 3,995$; $p < 0,05$; MHPG+VMA/NOR - $F(2,27) = 3,488$; $p < 0,05$).

Tabela 9 - Efeitos da administração oral de cialotrina durante 7 dias consecutivos sobre os níveis e “turnover” hipotalâmicos de Noradrenalina de ratos. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão (ng/g de tecido)

Parâmetros	Hipotálamo		
	¹ C	E1	E2
Noradrenalina (NOR)	1423,92 $\pm$ 256,22	1465,39 $\pm$ 116,32	1749,01 $\pm$ 371,97*
MHPG	249,00 $\pm$ 38,61	211,99 $\pm$ 45,34	234,43 $\pm$ 60,48
VMA	270,13 $\pm$ 46,99	207,93 $\pm$ 60,87	237,58 $\pm$ 61,61
MHPG/NOR	0,18 $\pm$ 0,04	0,14 $\pm$ 0,03	0,14 $\pm$ 0,05
VMA/NOR	0,19 $\pm$ 0,04	0,14 $\pm$ 0,04	0,14 $\pm$ 0,05
MHPG + VMA/NOR	0,37 $\pm$ 0,08	0,28 $\pm$ 0,07	0,28 $\pm$ 0,10

¹C= controle; E1= 1,0 e E2= 3 mg/kg de cialotrina presente no produto Grenade®. N= 10 animais/grupo. *p<0,05 em relação ao grupo controle. Anova seguido do teste de Tukey-Kramer.

Figura 14 - Efeitos da administração de cialotrina sobre os níveis hipotalâmicos de Noradrenalina. Os dados representam as médias $\pm$ SD de 10 animais/ grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste Anova seguido de Tukey Kramer). C= Controle; E1=1,0 mg/kg; E2=3,0 mg/kg de cialotrina

A análise estatística dos dados apresentados na tabela 10, mostra que ao contrário do que foi observado no hipotálamo, não se observou nenhuma interação entre o tratamento com cialotrina e os níveis estriatais de noradrenalina. De fato, como pode ser observado na tabela 10, a administração de cialotrina não foi capaz de modificar os níveis estriatais de noradrenalina quando comparados aos dos animais do grupo controle ($F(2,27) = 4,317$; $p < 0,05$), como também não modificou o “turnover” estriatal de Noradrenalina (MHPG/NOR - $F(2,27) = 2,021$; $p < 0,05$; VMA/NOR - $F(2,27) = 0,7192$; $p < 0,05$; MHPG+VMA/NOR - $F(2,27) = 0,2541$; $p < 0,05$).

Tabela 10 - Efeitos da administração oral de cialotrina durante 7 dias consecutivos sobre a os níveis e “turnover” estriatal de Noradrenalina de ratos. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão (ng/g de tecido)

Parâmetros	Estriato		
	¹ C	E1	E2
Noradrenalina (NOR)	599,00 $\pm$ 68,20	631,20 $\pm$ 55,12	636,60 $\pm$ 60,22
MHPG	237,80 $\pm$ 44,13	218,88 $\pm$ 42,46	216,69 $\pm$ 45,10
VMA	103,70 $\pm$ 34,05	126,20 $\pm$ 29,18	130,00 $\pm$ 48,30
MHPG/NOR	0,40 $\pm$ 0,08	0,35 $\pm$ 0,07	0,34 $\pm$ 0,06
VMA/NOR	0,17 $\pm$ 0,06	0,19 $\pm$ 0,04	0,20 $\pm$ 0,07
MHPG + VMA/NOR	0,57 $\pm$ 0,12	0,54 $\pm$ 0,07	0,54 $\pm$ 0,11

¹C= controle; E1= 1,0 e E2= 3 mg/kg de cialotrina presente no produto Grenade®. N= 10 animais/grupo.. Anova seguido do teste de Tukey-Kramer.

6.5.2 Parte II – Simpatectomia Química

Sabe-se que o Sistema Nervoso Simpático (SNS) comunica-se com o Sistema Imune (SI) primariamente através da liberação de neurotransmissores a partir dos terminais nervosos simpáticos (MADDEN., 2001; SANDERS et al., 2001). De fato, o SNS pode regular a resposta imune através da liberação de noradrenalina e adrenalina a partir da medula da adrenal.

A ligação da noradrenalina e da adrenalina em receptores adrenérgicos específicos presentes em células do sistema imune, modula as respostas imune e inflamatória, afetando o tráfego imune celular, circulação e proliferação, bem como a atividade das células imune (ESKANDARI; STERNBERG, 2002; LORTON et al., 1999.). Através destes mecanismos, a ativação do SNS pode causar uma supressão seletiva da resposta Th1, passando para uma dominância da resposta Th2; fato muito semelhante ocorre quando da ativação do eixo HHA (ELENKOV; CHROUSOS, 1999).

Portanto, é possível que a cialotrina, por induzir uma situação estressante (ABBUD RIGHI; PALERMO-NETO, 2003), possa estar interferindo com a atividade de macrófagos peritoneais (RIGHI, 2003; RIGHI; PALERMO-NETO, 2005) via ativação do SNS.

Um método amplamente utilizado para estudar como o SNS influencia a resposta imune é a simpatectomia química periférica realizada através da utilização de uma neurotoxina “6-hydroxydopamine” (6-OHDA – LORTON et al., 1999; PICLO, 1997). Sabe-se que a 6-OHDA não atravessa a barreira hemato-encefálica quando administrada em ratos adultos e, quando sistematicamente administrada, destrói os terminais periféricos das fibras noradrenérgicas simpáticas (KOSTRZEWA; JACOBOWICTZ, 1974). Portanto, a denervação sistêmica do SNS pela 6-OHDA é uma técnica efetiva e uma ferramenta ideal para examinar a influência do SNS e da noradrenalina em modular a resposta imune (BREIVIK et al., 2005).

Experimento 8 - Avaliar o efeito da simpatectomia química sobre a atividade (fagocitose) de macrófagos peritoneais de ratos, tratados ou não com cialotrina por 7 dias consecutivos.

40 ratos foram divididos ao acaso em 4 grupos iguais, sendo 2 grupos experimentais e 2 controles (E1, E2, C1 e C2). Os animais dos grupos C1, E1 e E2 foram tratados com 6-OHDA por 4 vezes consecutivas, conforme descrito no item 4.5.6. Os animais do grupo C2 receberam, nos mesmos dias, idênticos volumes do veículo da 6-OHDA. O dia da primeira administração de 6-OHDA foi considerada como sendo o dia 1 do experimento. Para ativar os macrófagos da cavidade peritoneal, dez (10) dias após a primeira aplicação de 6-OHDA, os animais de todos os grupos receberam pela via i.p. duas doses de Onco-BCG, sendo a primeira dose de 0,5ml e a segunda de 0,25 ml, realizada 5 dias após a primeira administração, conforme descrito no item 4.4.2. Os animais dos grupos experimentais receberam por via oral (gavage), durante 7 dias consecutivos, diferentes doses de cialotrina, respectivamente: E1 = 1,0 mg/kg; E2 = 3,0 mg/kg. Os animais do grupo controle (C1 e C2) receberam, pela mesma via, idêntico volume do veículo da cialotrina. A administração da cialotrina e/ou veículo iniciou-se conjuntamente com a primeira administração de BCG (10 dia do experimento). No dia 18 foi feita a avaliação da atividade de macrófagos peritoneais através da técnica de determinação da fagocitose de *S. aureus* efetuada por macrófagos peritoneais, avaliada por citometria de fluxo (item 4.5.7). A figura 14 ilustra este procedimento experimental.

Figura 15 - Procedimento experimental utilizado nos experimentos 8 e 9

Resultados

A tabela 11 mostra e as figuras 16 e 17 ilustram os efeitos do tratamento com 6-OHDA sobre a fagocitose de macrófagos peritoneais de ratos tratados ou não com diferentes doses de cialotrina (1,0 mg/kg e 3,0 mg/kg) e após ativação por BCG.

Tabela 11 - Efeitos do tratamento com 6-OHDA sobre a atividade (fagocitose) de macrófagos peritoneais de ratos, tratados ou não com cialotrina por 7 dias consecutivos, medidos por citometria de fluxo. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão.

Parâmetros	Grupos ¹			
	C1	C2	E1	E2
% de fagocitose	39,7 $\pm$ 5,49	38,9 $\pm$ 4,17	28,20 $\pm$ 2,03*	27,89 $\pm$ 1,29*
Intensidade de fagocitose	29,69 $\pm$ 1,55	29,15 $\pm$ 1,31	28,58 $\pm$ 1,42	26,97 $\pm$ 1,38*

¹C1= veículo da cialotrina mais veículo da 6-OHDA; C2= veículo da cialotrina mais 6-OHDA; E1= 6-OHDA mais 1,0 mg/kg de cialotrina e E2= 6-OHDA mais 3 mg/kg de cialotrina. N= 10 animais/grupo.

*p<0,05 em relação ao grupo C1 e C2. Anova seguido do teste de Tukey-Kramer.

Figura 16 - Efeitos do tratamento com 6-OHDA sobre a porcentagem de fagocitose de macrófagos peritoneais de ratos, tratados ou não com cialotrina por 7 dias consecutivos; medidos por citometria de fluxo. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão. 10 animais/ grupo. * $p < 0,05$ comparado aos grupos C1 e C2. Teste Anova seguido de Tukey Kramer. **C1**= veículo da cialotrina mais veículo da 6-OHDA; **C2**= veículo da cialotrina mais 6-OHDA; **E1**= 6-OHDA mais 1,0 mg/kg de cialotrina e **E2**= 6-OHDA mais 3 mg/kg de cialotrina

Figura 17 - Efeitos do tratamento com 6-OHDA sobre a intensidade de fagocitose de macrófagos peritoneais de ratos, tratados ou não com cialotrina por 7 dias consecutivos; medidos por citometria de fluxo. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão. 10 animais/ grupo. * $p < 0,05$ comparado aos grupos C1 e C2. Teste Anova seguido de Tukey Kramer. C1= veículo da cialotrina mais veículo da 6-OHDA; C2= veículo da cialotrina mais 6-OHDA; E1= 6-OHDA mais 1,0 mg/kg de cialotrina e E2= 6-OHDA mais 3 mg/kg de cialotrina

A análise estatística dos dados de percentual de fagocitose (Tabela 11) mostrou a existência de uma diferença significativa entre os dados dos grupos tratados com as duas doses de cialotrina e os dos grupos controles, mesmo quando sobre influência do tratamento com 6-OHDA. Pode-se perceber que houve uma diminuição no percentual de fagocitose dos animais dos grupos que receberam a cialotrina nas doses de 1,0 e 3,0 mg/kg quando comparados àqueles do grupo que recebeu o veículo desta mais o veículo da 6-OHDA (grupo C1) e àquele do grupo que recebeu o veículo da cialotrina mais o tratamento com a 6-OHDA (grupo C2 - $F(3,36)=31,661$; $p < 0,05$). Análise adicional destes dados mostrou que não existe diferença significativa entre aquele do grupo que recebeu o tratamento com o veículo da cialotrina mais o tratamento com a 6-OHDA (grupo C2) e aquele do grupo que recebeu ambos os veículos (grupo C1).

Em relação à intensidade de fagocitose, observou-se que apenas o tratamento com 3,0 mg/kg de cialotrina foi capaz de diminuir este parâmetro quando comparado àquele medido nos ratos do grupo que recebeu o veículo desta mais o veículo da 6-OHDA (grupo C1) e àquele do grupo que recebeu o veículo da cialotrina mais o tratamento com a 6-OHDA (grupo C2 - $F(3,36)=6,827$; $p < 0,05$). Como ocorreu com o percentual de fagocitose, uma análise adicional dos dados de intensidade de fagocitose mostrou que não existem diferenças significantes entre o grupo que recebeu o tratamento com o veículo da cialotrina mais o tratamento com a 6-OHDA (grupo C2) e o grupo que recebeu ambos os veículos (grupo C1). Portanto, verificamos que o tratamento com 6-OHDA *per se* não modificou a fagocitose de macrófagos.

Experimento 9 - Avaliar o efeito da simpatectomia química sobre da produção de nitrito (NO_2^-) realizada por macrófagos peritoneais de ratos, tratados ou não com cialotrina por 7 dias consecutivos.

40 ratos foram divididos ao acaso em 4 grupos iguais, sendo 2 grupos experimentais e 2 controles (E1, E2, C1 e C2). Os animais dos grupos C1, E1 e E2 foram tratados com 6-OHDA por 4 vezes consecutivas, conforme descrito no item 5.5.2. Os animais do grupo C2 receberam, nos mesmos dias, idênticos volumes da 6-OHDA. O dia da primeira administração de 6-OHDA foi considerada como sendo o dia 1 do experimento. Para ativar os macrófagos da cavidade peritoneal, dez (10) dias após a primeira aplicação de 6-OHDA, os animais de todos os grupos, receberam pela via i.p. duas doses de Onco-BCG, sendo a primeira dose de 0,5ml e a segunda de 0,25 ml realizada 5 dias após a primeira administração, conforme descrito no item 4.4.2. Os animais dos grupos experimentais receberam por via oral (gavage), durante 7 dias consecutivos, diferentes doses de cialotrina, respectivamente: E1 = 1,0 mg/kg; E2 = 3,0 mg/kg. Os animais do grupo controle (C1 e C2) receberam, pela mesma via, idêntico volume do veículo da cialotrina. A administração da cialotrina e/ou veículo iniciou-se conjuntamente com a primeira administração de BCG (10 dia do experimento). No dia 18, foi feita a avaliação da atividade de macrófagos peritoneais através da técnica de quantificação da produção de nitrito efetuada por macrófagos peritoneais (item 4.5.10). A figura 14 ilustra este procedimento experimental.

Resultados

A tabela 12 mostra e a figura 18 ilustra os efeitos do tratamento com 6-OHDA sobre a produção de nitrito realizada por macrófagos peritoneais de ratos tratados ou não com diferentes doses de cialotrina (1,0 mg/kg e 3,0 mg/kg).

Tabela 12 - Efeitos do tratamento com 6-OHDA sobre a produção de nitrito realizada por macrófagos peritoneais de ratos, tratados ou não com cialotrina por 7 dias consecutivos. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão ($\mu\text{mol}/2 \times 10^6$ células)

Parâmetros	Grupos ¹			
	C1	C2	E1	E2
NO_2^-	101,70 $\pm$ 6,29	104,20 $\pm$ 8,82	89,90 $\pm$ 4,84*	78,50 $\pm$ 5,27*#

¹C1= veículo da cialotrina mais veículo da 6-OHDA; C2= veículo da cialotrina mais 6-OHDA; E1= 6-OHDA mais 1,0 mg/kg de cialotrina e E2= 6-OHDA mais 3,0 mg/kg de cialotrina. N= 10 animais/grupo.

*p<0,05 em relação ao grupo C1 e C2; # p<0,05 em relação ao grupo E1. Anova seguido do teste de Tukey-Kramer.

Figura 18 - Efeitos do tratamento com 6-OHDA sobre a produção de nitrito realizada por macrófagos peritoneais de ratos, tratados ou não com cialotrina por 7 dias consecutivos. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão ($\mu\text{mol}/ 2 \times 10^6$ células). 10 animais/ grupo. * $p < 0,05$ comparado aos grupos C1 e C2. # $p < 0,05$ comparado ao grupo E1. Teste Anova seguido de Tukey Kramer. C1= veículo da cialotrina mais veículo da 6-OHDA; C2= veículo da cialotrina mais 6-OHDA; E1= 6-OHDA mais 1,0 mg/kg de cialotrina e E2= 6-OHDA mais 3 mg/kg de cialotrina

A análise estatística dos dados de produção de nitrito realizada por macrófagos peritoneais (Tabela 12) mostrou a existência de uma diferenças significantes entre os dados dos grupos tratados com as duas doses de cialotrina e aqueles dos grupos controles, mesmo sobre influência do tratamento com 6-OHDA. Pode-se perceber que a administração de cialotrina produziu uma diminuição dose dependente da produção de nitrito efetuada pelos macrófagos ativados por BCG (grupos E1 e E2) quando comparados àqueles do grupo que recebeu o veículo desta mais o veículo da 6-OHDA (grupo C1) e àqueles do grupo que recebeu o veículo da cialotrina mais o tratamento com a 6-OHDA (grupo C2 - . $F(3,36) = 33,149$; $p < 0,05$).

Análise adicional destes dados mostrou que não existem diferenças significantes entre o grupo que recebeu o tratamento com o veículo da cialotrina mais o tratamento com a 6-OHDA (grupo C2) e o grupo que recebeu ambos os veículos (grupo C1). Como ocorreu com a fagocitose, observamos que o tratamento de 6-OHDA *per se* não interferiu com a produção de nitrito realizada por macrófagos peritoneais ativados por BCG.

6.6 POSSÍVEL EFEITO DIRETO DA CIALOTRINA SOBRE A ATIVIDADE DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Observadas as alterações de atividade de macrófagos peritoneais induzidas pela administração da cialotrina e levando-se em consideração que a adrenalectomia e a manipulação de glicocorticóides inibiram, em parte, estes efeitos, enquanto que a simpatectomia química com 6-OHDA não foi capaz de inibir tal efeito, é possível hipotetizar que a cialotrina possa ter efeito direto sobre os macrófagos, modificando a sua atividade. Neste contexto, tornou-se relevante realizar um estudo que elucidasse a participação da cialotrina diretamente sobre os macrófagos peritoneais.

Experimento 10 - Avaliar um possível efeito direto da cialotrina sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais.

Foram coletados as células da cavidade peritoneal de 3 ratos que receberam pela via i.p. duas dose de Onco-BCG, sendo a primeira dose de 0,5 ml e a segunda de 0,25 ml realizada 5 dias após a primeira administração, conforme descrito no item 4.4.2; a colheita das células foi feita 2 dias após a segunda dose de BCG. Para avaliar a viabilidade celular, foi realizado um *pool* celular e alíquotas de 2×10^6 células/ml foram incubadas em septoplicata por 30 minutos a 37°C com diferentes concentrações de cialotrina (item 4.4.4), sendo sete alíquotas incubadas com 0,001% de Tween 80 (diluente da cialotrina – princípio ativo puro), sete com 10 nM e sete com 100nM de cialotrina.

Resultados:

A tabela 13 mostra os efeitos do tratamento *in vitro* com diferentes concentrações (10 nM e 100 nM) de cialotrina sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais de ratos.

Tabela 13 - Efeitos do tratamento *in vitro* com diferentes concentrações (10 nM e 100 nM) de cialotrina sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais de ratos. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão

Parâmetros	Grupos ¹			
	C1	C2	E1	E2
Percentual de viabilidade celular	96,00 $\pm$ 2,16	94,48 $\pm$ 0,95	94,00 $\pm$ 1,63	94,00 $\pm$ 2,08

¹C1= células mais PBS; C2= células mais Tween 80 na concentração final de 0,001%; E1= células mais cialotrina na concentração final de 10 nM e E2 = células mais cialotrina na concentração final de 100 nM. N = 07 repetições/grupo. Anova seguido do teste de Tukey-Kramer.

A análise estatística dos dados de viabilidade celular de macrófagos peritoneais (Tabela 13) mostrou que tanto o Tween 80, na concentração final de 0,001% , como a cialotrina nas concentrações finais de 10 e 100 nM, não interferiram com a viabilidade celular ($F(3,27)=1,996$; $p < 0,05$).

Experimento 11 - Avaliação da fagocitose e *burst* oxidativo realizada por macrófagos peritoneais de ratos após ativação por Onco-BCG, e tratados *in vitro* com cialotrina nas concentrações de 10 nM e 100 nM.

Foram coletadas as células da cavidade peritoneal de 07 ratos que receberam pela via i.p.duas dose de Onco-BCG, sendo a primeira dose de 0, 5ml e a segunda de 0,25 ml, realizada 5 dias após a primeira administração, conforme descrito no item 4.4.2, e a colheita das células feita 2 dias após a segunda dose de BCG. Após o ajuste do número de células para 2×10^6 células/ml,

foram preparadas amostras para avaliação da atividade de macrófagos peritoneais através das técnicas de citometria de fluxo (item 4.5.7). A seguir, foi adicionada em septoplicata a cialotrina nas concentrações finais de 10 nM e 100nM. A outros tubos, também em septoplicata, foi adicionado o Tween 80 na concentração de 0,001%, pois este foi utilizado como diluente da cialotrina.

Resultados

A tabela 14 mostra e as figuras 19 e 20 ilustram os efeitos do tratamento *in vitro* com diferentes concentrações (10 nM e 100 nM) de cialotrina sobre a atividade de macrófagos peritoneais ativados por BCG.

Tabela 14 - Efeitos do tratamento *in vitro* com diferentes concentrações (10 nM e 100 nM) de cialotrina sobre a atividade de macrófagos peritoneais de ratos. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão

Parâmetros	Grupos ¹		
	C	E1	E2
% células realizando fagocitose	44,00 $\pm$ 5,96	33,5 $\pm$ 4,78*	31,83 $\pm$ 3,53*
Intensidade de fagocitose	32,10 $\pm$ 3,07	26,20 $\pm$ 2,74*	24,72 $\pm$ 1,98*
Burst Oxidativo (Basal)	29,70 $\pm$ 6,32	30,33 $\pm$ 4,38	30,40 $\pm$ 3,40
Burst Oxidativo (<i>S.aureus</i>)	52,00 $\pm$ 5,12	48,7 $\pm$ 5,98	46,7 $\pm$ 4,29

¹C= Células mais Tween 80 na concentração final de 0,001%; E1= células mais cialotrina na concentração final de 10 nM e E2 = células mais cialotrina na concentração final de 100 nM. N = 07 repetições/grupo. *p<0,05 comparado ao grupo C. Teste anova seguido do teste de Tukey-Kramer.

Figura 19 - Efeitos do tratamento *in vitro* com diferentes concentrações (10 nM e 100 nM) de cialotrina sobre o percentual de fagocitose realizados por macrófagos peritoneais de ratos. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão. 7 repetições/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo C. Teste anova seguido de Tukey Kramer. ¹C= Células mais Tween 80 na concentração final de 0,001%; E1= células mais cialotrina na concentração final de 10 nM e E2 = células mais cialotrina na concentração final de 100 nM

Figura 20 - Efeitos do tratamento *in vitro* com diferentes concentrações (10 nM e 100 nM) de cialotrina sobre a intensidade de fagocitose realizados por macrófagos peritoneais de ratos. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão. 7 repetições/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo C. Teste anova seguido de Tukey Kramer. ¹C= Células mais Tween 80 na concentração final de 0,001%; E1= células mais cialotrina na concentração final de 10 nM e E2 = células mais cialotrina na concentração final de 100 nM

A análise estatística dos dados de fagocitose mostrou a existência de uma diferença estatisticamente significativa entre os dados dos grupos tratados com as duas concentrações de cialotrina e aqueles do grupo controle. Pode-se perceber que houve uma diminuição tanto no percentual de células que efetuaram a fagocitose, como na intensidade de fagocitose nos grupos tratados *in vitro* com a cialotrina nas concentrações de 10 nM e 100 nM, quando comparados àqueles do grupo que recebeu o veículo – Tween 80 na concentração final de 0,001% ($F(2,27)=18,399$; $p < 0,05$ e $F(2,27)=21,700$; $p < 0,05$, respectivamente).

Observamos, ainda, que o tratamento *in vitro* com as duas concentrações de cialotrina não foi capaz de alterar tanto o *burst* oxidativo basal, como aquele induzido pela bactéria. Portanto, verificamos que o tratamento *in vitro* com duas concentrações (10 nM e 100 nM) de cialotrina diminuiu a fagocitose (avaliada por citometria de fluxo) de macrófagos ativados por BCG; entretanto, este mesmo tratamento não foi capaz de alterar o *burst* oxidativo, também medido por citometria de fluxo. Estas alterações são muito similares às aquelas por nós encontradas *in vivo* utilizando diferente metodologia e concentrações de cialotrina (RIGHI; PALERMO-NETO, 2005).

Experimento 12 – Avaliação da produção de nitrito (NO_2^-) realizada por macrófagos peritoneais de ratos após ativação por Onco-BCG, e tratamento *in vitro* com cialotrina nas concentrações de 10 nM e 100 nM.

Foram coletadas as células da cavidade peritoneal de 03 ratos que receberam pela via i.p. duas dose de Onco-BCG, sendo a primeira dose de 0, 5ml e a segunda de 0,25 ml, realizada 5 dias após a primeira administração, conforme descrito no item 4.4.2. A colheita das células, bem como a preparação das amostras para avaliação da produção de nitrito (item 4.5.10), foi feita 2 dias após a segunda dose de BCG. A seguir, foi adicionada em septoplicata a cialotrina nas concentrações finais de 10 nM e 100nM. A outros pocinhos, também em septoplicata, foi adicionado o Tween 80, na concentração de 0,001%, pois este foi utilizado como diluente da cialotrina.

Resultados

A tabela 15 mostra e a figura 21 ilustra os efeitos do tratamento *in vitro* com diferentes concentrações (10 nM e 100 nM) de cialotrina sobre a produção de nitrito (NO_2^-), realizada por macrófagos peritoneais de ratos após ativação por BCG .

Tabela 15 - Efeitos do tratamento *in vitro* com diferentes concentrações (10 nM e 100 nM) de cialotrina sobre a produção de nitrito realizada por macrófagos peritoneais de ratos. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão ($\mu\text{mol}/2 \times 10^6$ células)

Parâmetros	Grupos ^I		
	C	E1	E2
NO_2^-	$164 \pm 3,06$	$134,57 \pm 7,52^*$	$115,94 \pm 5,03^{* \#}$

^IC= Células mais Tween 80 na concentração final de 0,001%; E1= células mais cialotrina na concentração final de 10 nM e E2 = células mais cialotrina na concentração final de 100 nM. N = 07 repetições/grupo. *p<0,05 comparado ao grupo C; #p<0,05 comparado ao grupo E1. Teste anova seguido do teste de Tukey-Kramer.

Figura 21 - Efeitos do tratamento *in vitro* com diferentes concentrações (10 nM e 100 nM) de cialotrina sobre a produção de nitrito realizada por macrófagos peritoneais de ratos. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão. 7 repetições/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo C; # $p < 0,05$ comparado ao grupo E1. Teste anova seguido de Tukey Kramer. ¹C= Células mais Tween 80 na concentração final de 0,001%; E1= células mais cialotrina na concentração final de 10 nM e E2 = células mais cialotrina na concentração final de 100 nM

A análise dos dados mostrou que o tratamento *in vitro* com diferentes concentrações de cialotrina produziu uma diminuição dose dependente da produção de nitrito efetuada pelos macrófagos ativados por BCG ($F_{(2,15)} = 117,16$; $p < 0,05$). Estes dados corroboram com aqueles previamente encontrados, utilizando-se mesma metodologia (RIGHI; PALERMO-NETO, 2005), isto é, aquela proposta por Ding; Nathan e Stuehr (1988).

6.7 POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DOS PBRs (RECEPTORES BENZODIAZEPÍNICOS PERIFÉRICOS) COM OS EFEITOS DIRETOS DA CIALOTRINA SOBRE A ATIVIDADE DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Embora já tenhamos demonstrado que a cialotrina modula diretamente a atividade de macrófagos (RIGHI; PALERMO-NETO, 2005), não se mostrou ainda por qual mecanismo o piretróide estaria atuando sobre estas células. Mais especificamente, poder-se-ia pensar em um efeito direto deste praguicida sobre os receptores benzodiazepínicos periféricos (PBR) que sabidamente existem nos mesmos (ZAVALA; LENFANT, 1987). Neste sentido, os ensaios de *binding* com células de tumor de mama e macrófagos mostraram que a afinidade pelos ligantes destes receptores se faz em concentrações nanomolares (BEINLICH et al., 1999; HARDWICH et al., 1999).

Neste contexto, diversos autores têm levantado evidências no sentido de que os piretróides atuem em PBR (SODERLUND et al., 2002). Esta ativação poderia resultar em modificação da atividade de macrófagos, como já demonstrado após o uso de agonistas de receptores PBR (MASSOCO, 2003; ZAVALA et al., 1990). Portanto, tornou-se relevante realizar um estudo que elucidasse a participação dos PBRs nos efeitos da cialotrina sobre a atividade de macrófagos peritoneais.

Experimento 13 - Avaliação da fagocitose realizada por macrófagos peritoneais de ratos após ativação por Onco-BCG, tratados *in vitro* com cialotrina, RO 5-4864 e PK 11195.

Foram coletados as células da cavidade peritoneal de 07 ratos que receberam pela via i.p. duas doses de Onco-BCG, sendo a primeira dose de 0,5ml e a segunda de 0,25 ml, realizada 5 dias após a primeira administração, conforme descrito no item 4.4.2; a colheita das células foi

feita 2 dias após a segunda dose de BCG. Após o ajuste do número de células para 2×10^6 células/ml, foram preparadas amostras para avaliação da atividade de macrófagos peritoneais através das técnicas de citometria de fluxo (item 4.5.7). A seguir, foram adicionadas as seguintes substâncias, em septoplicata, cada uma na concentração final de 10 nM ou de 100 nM: cialotrina, Ro 5-4864, PK11195, cialotrina + PK 11195 e Ro 5864 + PK 11195. A outros tubos, também em septoplicata, foram adicionados etanol (diluyente dos ligantes de PBR) e Tween 80 (diluyente da cialotrina) na concentração final de 0,01% e 0,001%, respectivamente. A outros 7 tubos, foram adicionados apenas as células mais o PBS, servindo estes, portanto, como um controle negativo. A substância PK 11195 sempre foi adicionada nos tubos que continham apenas células 10 minutos antes dos outros ligantes e reagentes.

Resultados

A tabela 16 mostra e a figura 22 ilustra o efeito do tratamento *in vitro* com cialotrina, Ro 5-4864, PK11195, cialotrina + PK 11195 e Ro 5864 + PK 11195 na concentração 10 nM, sobre a fagocitose de macrófagos peritoneais.

Tabela 16 - Efeitos do tratamento *in vitro* com cialotrina e os ligantes de PBR nas concentrações de 10 nM sobre a fagocitose de macrófagos peritoneais de ratos. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão

Fagocitose	Grupos ¹						
	C1	C2	E1	E2	E3	E4	E5
Porcentagem	69,71 $\pm$ 3,14	68,85 $\pm$ 3,62	60,71 $\pm$ 5,46*	68,71 $\pm$ 2,87	69,28 $\pm$ 5,90	59,81 $\pm$ 5,11*	68,82 $\pm$ 5,50
Intensidade	71,75 $\pm$ 3,16	71,38 $\pm$ 3,13	63,38 $\pm$ 4,86 [#]	63,78 $\pm$ 2,03 ⁺	71,41 $\pm$ 5,82	62,02 $\pm$ 5,03 [#]	70,87 $\pm$ 5,59

¹C1=PBS; C2=Etanol + Tween 80; E1=cialotrina; E2=RO 5-4864; E3=PK 11195; E4=Cialotrina + PK 11195 e E5=RO 5-4864+PK11195. N = 07 repetições/grupo. *p<0,05 comparado aos grupos C1, C2, E2, E3 e E5. [#]p<0,05 comparado aos grupos C1, C2, E3 e E5. ⁺p<0,05 comparado aos grupos C1, C2 e E3. Teste anova seguido do teste de Tukey-Kramer.

Figura 22 - Efeito do tratamento *in vitro* com cialotrina e ligantes de PBR na concentração de 10 nM sobre a porcentagem de macrófagos peritoneais que realizaram a fagocitose (A) e a intensidade de fagocitose (B). Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão. N = 07 repetições/grupo. * $p < 0,05$ comparado aos grupos controle; etanol + Tween 80; RO 5-4864; PK 11195 e RO + PK. # $p < 0,05$ comparado aos grupos controle; etanol + Tween 80; PK 11195 e RO + PK. + $p < 0,05$ comparado aos grupos controle; etanol + Tween 80 e PK 11195. Teste anova seguido do teste de Tukey-Kramer

A análise estatística dos dados de porcentagem de fagocitose mostrou a existência de uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com a concentração de 10 nM de cialotrina, cialotrina + PK 11195 ($F_{(6,42)} = 6,004$; $p < 0,05$) e aqueles dos grupos controles e dos tratados com ligantes de PBR. Depreende-se da leitura da tabela 15 e da figura 21 (A) que o

tratamento com os ligantes de PBR não interferiu com a atividade de macrófagos (porcentagem de fagocitose), bem como não reverteu o efeito do tratamento com cialotrina sobre este mesmo parâmetro.

Da análise dos dados de intensidade de fagocitose apresentados na tabela 15 e figura 21 (B), podemos perceber que este parâmetro se comportou de uma maneira muito similar à porcentagem de fagocitose realizada por macrófagos peritoneais. De fato, estes dados mostram que a cialotrina diminui a intensidade de fagocitose e o tratamento com ligantes de PBR não foi capaz de reverter este efeito. Entretanto, o tratamento com RO 5-4864 foi capaz de diminuir a intensidade de fagocitose ($F_{(6,42)} = 7,087$; $p < 0,05$) de células não tratadas com cialotrina e que o tratamento com o PK11195 foi capaz de reverter o efeito do RO 5-4864, mas não da cialotrina.

A tabela 17 mostra e a figura 23 ilustra o efeito do tratamento *in vitro* com cialotrina, Ro 5-4864, PK11195, cialotrina + PK 11195 e Ro 5864 + PK 11195 na concentração 100 nM, sobre a fagocitose de macrófagos peritoneais.

Tabela 17 - Efeitos do tratamento *in vitro* com cialotrina e os ligantes de PBR nas concentrações de 100 nM sobre a fagocitose de macrófagos peritoneais de ratos. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão

Fagocitose	Grupos ¹						
	C1	C2	E1	E2	E3	E4	E5
Porcentagem	69,78 $\pm$ 3,21	69,12 $\pm$ 2,81	60,18 $\pm$ 5,30*	67,77 $\pm$ 2,97	68,58 $\pm$ 5,64	59,40 $\pm$ 4,24*	68,15 $\pm$ 5,74
Intensidade	71,31 $\pm$ 2,86	70,94 $\pm$ 2,84	62,87 $\pm$ 3,56*	69,82 $\pm$ 3,15	70,44 $\pm$ 5,52	61,47 $\pm$ 4,65*	69,97 $\pm$ 5,51

¹C1=PBS; C2=Etanol + Tween 80; E1=cialotrina; E2=RO 5-4864; E3=PK 11195; E4=Cialotrina + PK 11195 e E5=RO 5-4864+PK11195. N = 07 repetições/grupo. *p<0,05 comparado aos grupos C1, C2, E2, E3 e E5. Teste anova seguido do teste de Tukey-Kramer.

(A)

(B)

Figura 23 - Efeito do tratamento *in vitro* com cialotrina e ligantes de PBR na concentração de 100 nM sobre a porcentagem de macrófagos peritoneais que realizaram a fagocitose (A) e a intensidade de fagocitose (B). Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão. N = 07 repetições/grupo. * $p < 0,05$ comparado aos grupos controle; etanol + Tween 80; RO 5-4864; PK 11195 e RO + PK. Teste anova seguido do teste de Tukey-Kramer

A análise estatística dos dados de porcentagem ($F_{(6,42)} = 6,841$; $p < 0,05$) e intensidade ($F_{(6,42)} = 6,829$; $p < 0,05$) de fagocitose mostrou a existência de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados com a concentração de 100 nM de cialotrina, cialotrina +

PK 11195 e aqueles dos grupos controles e dos tratados com ligantes de PBR. Depreende-se da leitura da tabela 16 e da figura 22 (A e B) que o tratamento com os ligantes de PBR não interferiu com a atividade de macrófagos (porcentagem e intensidade de fagocitose), bem como não reverteu o efeito do tratamento com cialotrina sobre estes mesmos parâmetros.

Experimento 14 - Avaliação produção de nitrito (NO_2^-) realizada por macrófagos peritoneais de ratos após ativação por Onco-BCG, tratados *in vitro* com cialotrina, RO 5-4864 e PK 11195.

Foram coletados as células da cavidade peritoneal de 07 ratos que receberam pela via i.p. duas doses de Onco-BCG, sendo a primeira dose de 0,5ml e a segunda de 0,25 ml, realizada 5 dias após a primeira administração, conforme descrito no item 4.4.2. A colheita das células, bem como a preparação das amostras para avaliação da produção de nitrito (item 4.5.10), foi feita 2 dias após a segunda dose de BCG. A seguir, foram adicionadas nos pocinhos as seguintes substâncias em septuplicata, cada uma na concentração final de 10 nM ou de 100 nM: cialotrina, Ro 5-4864, PK11195, cialotrina + PK 11195 e Ro 5864 + PK 11195. A outros pocinhos, também em septuplicata, foram adicionados etanol (diluyente dos ligantes de PBR) e Tween 80 (diluyente da cialotrina) na concentração final de 0,01% e 0,001%, respectivamente. A outros 7 pocinhos foram adicionados apenas as células mais o PBS, servindo estes, portanto, como um controle negativo. A substância PK 11195 sempre foi adicionada nos pocinhos que continham apenas células 10 minutos antes dos outros ligantes e reagentes.

Resultados

A tabela 18 mostra e a figura 24 ilustra o efeito do tratamento *in vitro* com cialotrina, Ro 5-4864, PK11195, cialotrina + PK 11195 e Ro 5864 + PK 11195 na concentração 10 nM, sobre a produção de nitrito de macrófagos peritoneais.

Tabela 18 - Efeitos do tratamento *in vitro* com cialotrina e os ligantes de PBR nas concentrações de 10 nM sobre a produção de nitrito realizada por macrófagos peritoneais de ratos. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão

Parâmetros	Grupos ¹						
	C1	C2	E1	E2	E3	E4	E5
NO ₂ ⁻	164,27 $\pm$ 2,80	163,81 $\pm$ 2,53	135,98 $\pm$ 4,40*	163,67 $\pm$ 2,61	161,92 $\pm$ 4,10	135,74 $\pm$ 4,36*	162,11 $\pm$ 3,23

¹C1=PBS; C2=Etanol + Tween 80; E1=cialotrina; E2=RO 5-4864; E3=PK 11195; E4=Cialotrina + PK 11195 e E5=RO 5-4864+PK11195. N = 07 repetições/grupo. *p<0,05 comparado aos grupos C1, C2, E2, E3 e E5. Teste Anova seguido do teste de Tukey-Kramer.

Figura 24 - Efeito do tratamento *in vitro* com cialotrina e ligantes de PBR na concentração de 10 nM sobre a produção de nitrito realizada por macrófagos peritoneais de ratos. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão. N = 07 repetições/grupo. *p<0,05 comparado aos grupos controle; etanol + Tween 80; RO 5-4864; PK 11195 e RO + PK. Teste Anova seguido do teste de Tukey-Kramer

A análise estatística dos dados de produção de nitrito ($F_{(6,42)} = 100,14$; $p < 0,05$) mostrou a existência de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados com a concentração de 10 nM de cialotrina, cialotrina + PK 11195 e aqueles dos grupos controles e dos tratados com ligantes de PBR.

Depreende-se da leitura da tabela 18 e da figura 24 que o tratamento com os ligantes de PBR não interferiu com a produção de nitrito realizada por macrófagos peritoneais, bem como não reverteu o efeito do tratamento com cialotrina sobre estes mesmos parâmetros.

A tabela 19 mostra e a figura 25 ilustra o efeito do tratamento *in vitro* com cialotrina, Ro 5-4864, PK11195, cialotrina + PK 11195 e Ro 5864 + PK 11195 na concentração 100 nM, sobre a produção de nitrito de macrófagos peritoneais.

Tabela 19 - Efeitos do tratamento *in vitro* com cialotrina e os ligantes de PBR nas concentrações de 100 nM sobre a produção de nitrito realizada por macrófagos peritoneais de ratos. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão

Parâmetros	Grupos ¹						
	C1	C2	E1	E2	E3	E4	E5
NO ₂ ⁻	163.05±2.71	162.70±2.04	134.97±4.39*	162.68±2.19	161.24±3.75	134.82±4.36*	161.35±3.17

¹C1=PBS; C2=Etanol + Tween 80; E1=cialotrina; E2=RO 5-4864; E3=PK 11195; E4=Cialotrina + PK 11195 e E5=RO 5-4864+PK11195. N = 07 repetições/grupo. * $p < 0,05$ comparado aos grupos C1, C2, E2, E3 e E5. Teste Anova seguido do teste de Tukey-Kramer.

Figura 25 - Efeito do tratamento *in vitro* com cialotrina e ligantes de PBR na concentração de 100 nM sobre a produção de nitrito realizada por macrófagos peritoneais de ratos. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão. N = 07 repetições/grupo. * $p < 0,05$ comparado aos grupos controle; etano + Tween 80; RO 5-4864; PK 11195 e RO + PK. Teste Anova seguido do teste de Tukey-Kramer

Assim como ocorreu com os dados relativos a concentração de 10 nM, a análise estatística dos dados de produção de nitrito ($F_{(6,42)} = 110,41$; $p < 0,05$) mostrou a existência de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados com a concentração de 100 nM de cialotrina, cialotrina + PK 11195 e aqueles dos grupos controles e dos tratados com ligantes de PBR.

Observa-se, portanto, que estes dados estão em linha com os dados referentes à fagocitose (porcentagem e intensidade) de macrófagos peritoneais tratados *in vitro* com 100 nM de cialotrina e ligantes de PBR.

Depreende-se da leitura da tabela 18 e da figura 23 que o tratamento com os ligantes de PBR na concentração de 100 nM não interferiu com a produção de nitrito realizada por macrófagos peritoneais, bem como não reverteu o efeito do tratamento com cialotrina sobre estes mesmos parâmetros.

7 DISCUSSÃO

Os presentes resultados, analisados em seu conjunto, mostram que a cialotrina é um estressor que ativa áreas específicas do Sistema Nervoso Central, modulando direta e/ou indiretamente (via ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal) a atividade de macrófagos peritoneais.

Especificamente, mostramos que a cialotrina administrada durante 7 dias consecutivos causou em ratos: **1** – marcação fos positiva em neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (NPH), após a dose de 3,0 mg/kg/dia; **2** - diminuição do percentual e da intensidade de fagocitose de macrófagos peritoneais ativados e avaliados por citometria de fluxo; **4** - diminuição dose-dependente da produção de nitrito (NO_2^-) após administração de 1,0 e 3,0 mg/kg/dia; **5** – diminuição do percentual e da intensidade de fagocitose de macrófagos peritoneais ativados, em ratos adrenalectomizados e/ou submetidos a manipulação farmacológica dos níveis de glicocorticóides, e tratados com 3,0 mg/kg/dia; **6** – aumento dos níveis de noradrenalina hipotalâmica em animais tratados com a dose de 3,0mg/kg/dia; **7** - diminuição do percentual e da intensidade de fagocitose, e também da produção de nitrito de macrófagos peritoneais ativados, em ratos simpatectomizados quimicamente com 6-OHDA após a dose de 3,0 mg/kg; **8** - diminuição dose-dependente do percentual e da intensidade de fagocitose, bem como da produção de nitrito por macrófagos peritoneais ativados e tratados *in vitro* com 10 e 100 nM da mesma. No entanto, não observamos: **1** – alteração na produção de nitrito realizada por macrófagos peritoneais ativados, em ratos adrenalectomizados e/ou submetidos a manipulação farmacológica dos níveis de glicocorticóides, e tratados com 1,0 e 3,0 mg/kg/dia de cialotrina; **2** – alteração na viabilidade celular induzida pelo tratamento *in vitro* com a cialotrina nas concentrações de 10 e 100 nM e **3** – alterações induzidas por ligantes de receptores benzodiazepínicos periféricos nos efeitos da cialotrina (10 e 100 nM) sobre a atividade de macrófagos analisados *in vitro*.

Os dados agora apresentados corroboram com aqueles obtidos por Abbud Righi e Palermo-Neto (2003) e sugerem ser a administração de 3,0 mg/kg/dia de cialotrina, por 7 dias consecutivos, capaz de ativar regiões específicas do SNC de ratos, induzindo sinais semelhantes àqueles que aparecem em situações de estresse. De fato, relatamos anteriormente a ocorrência de alterações comportamentais e bioquímicas após a administração de cialotrina em ratos. Em especial, mostramos naquele trabalho uma redução no percentual de tempo gasto na exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE), redução no tempo gasto em interação social no campo aberto e aumento dos níveis séricos de corticosterona (ABBUD RIGHI; PALERMO-NETO, 2003). Os dados por nós obtidos agora e anteriormente, em conjunto, sugerem a presença de um maior nível de ansiedade nos animais tratados com cialotrina, em especial porque as alterações comportamentais induzidas por este praguicida foram em tudo similares àquelas produzidas pela picrotoxina, um clássico fármaco ansiogênico (ABBUD RIGHI; PALERMO-NETO, 2003; DALVI; RODGERS, 2001).

Como relatado acima, a administração de cialotrina na dose de 3,0 mg/kg, por 7 dias consecutivos induziu ativação de áreas específicas do SNC. Em particular, observamos maior expressão de *c-fos* no núcleo paraventricular do hipotálamo (NPH) (experimento 2). Neste contexto, esta ativação parece ter sido específica, visto que não encontramos maior expressão para *c-fos* em outras áreas analisadas do próprio hipotálamo, bem como no baso lateral da amígdala (BLA).

Está bem estabelecido que a expressão de *c-fos* pode ser empregada como marcador de ativação neuronal (DRAGUNOV; FAULL, 1989; SAGAR; SHARP; CURRAN, 1988). Sabe-se, por outro lado, que o NPH e o BLA são as áreas do SNC em que ocorre mais intensamente a marcação fos em resposta a estímulos estressores (BRISKI; GILLEN, 2001). É um pouco estranho, portanto, que não tenhamos observado um aumento na marcação de *c-fos* no BLA. Sabe-se, que o BLA está envolvido com processos de aprendizado, consolidação de memória,

estresse condicionado ao medo e respostas ligadas a componentes indutores de forte carga emocional, isto é, que envolvam sofrimento (BERLAU; MCGAUGH, 2003; HUFF et al., 2005; KIM; JUNG, 2006). Neste contexto, quer nos parecer que a cialotrina, como qualquer estressor químico, não envolva apreensão e tão pouco permita o aprendizado de um possível escape ou “evitação” da situação estressante, como observado durante a aplicação de um estresse físico por choque escapável (HELMREICH et al., 2006). Esta situação de “evitação”, chamada de “coping”, já foi relacionada a atividade do sistema límbico e, em particular, àquela da amígdala (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2005). Este fato justificaria a ausência de atividade neuronal, mensurada pela marcação c-fos no BLA. Por outro lado, sabe-se que estressores de natureza psicológica que envolvam alta carga emocional, deflagam respostas fisiológicas em áreas do SNC similares, mas não idênticas, àquelas ativadas por estressores físicos como por exemplo, choque elétrico nas patas, contenção e outros (PALERMO-NETO et al., 2003). No entanto, as duas situações têm sido relatadas como capazes de ativar o eixo HHA (CHAMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 2005)

A ativação do NPH, agora constatada através do aumento da expressão de *fos*, mostra que a administração de cialotrina na dose de 3,0 mg/kg, por sete dias provoca aumento de atividade neuronal em área do SNC compatível com aquelas relatadas como estando envolvidas com respostas a estímulos estressores (BRISKI; GILLEN, 2001). De fato, o NPH é uma área do SNC que contém grande número de neurônios que expressam o Fator Liberador de Corticotrofina (CRF) - peça fundamental para as respostas adaptativas do organismo ao estresse (GRAY, 1993; GRAY; BINGAMAN, 1996).

Uma das principais respostas endócrinas relacionadas a uma situação de estresse é a ativação do eixo HHA; é por meio da ativação deste eixo que ocorre o aumento nos níveis séricos de corticosterona, resposta clássica aos estressores (RIVIER et al., 1982), e também relatada por nós após administração de cialotrina na dose 3,0 mg/kg, por 7 dias consecutivos

(ABBUD RIGHI; PALERMO-NETO, 2003). Neste sentido, é de amplo conhecimento que o CRF produzido pelos neurônios localizados no NPH atinge a adeno-hipófise através do sistema porta hipofisário, estimulando a produção e liberação de ACTH pela adeno-hipófise que, por sua vez, chega às adrenais através da corrente sanguínea, levando à produção e liberação de glicocorticóides.

O núcleo paraventricular do hipotálamo, em função do CRF, é assim um elemento chave na estimulação do eixo HHA, estando, ainda envolvido com a elaboração de respostas adaptativas comportamentais (BASSO, 2004). De fato, mostrou-se que a ativação de áreas específicas do SNC que contenham neurônios que expressam o CRF, como é o caso do NPH, leva a respostas endócrinas (ativação do eixo HHA), neurovegetativas (ativação do Sistema Nervoso Simpático) e comportamentais (MENZAGHI et al., 1993).

Neste sentido, estudos que fizeram uso de anticorpos conjugados a toxinas, visando eliminar os neurônios produtores de CRF em áreas do SNC, como o NPH, demonstraram que estes neurônios têm papel fundamental na expressão de comportamentos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE - MENZAGHI et al., 1993).

Desta forma, tomando-se em conjunto os dados comportamentais e bioquímicos por nós relatados anteriormente (ABBUD RIGHI; PALERMO-NETO., 2003) e os dados referentes à expressão de *c-fos* no NPH agora apresentados, torna-se possível afirmar que, em ratos, a administração de cialotrina na dose de 3,0 mg/kg por 7 dias consecutivos, induz alterações compatíveis com aquelas que ocorrem durante situações estressantes, e que envolvem a ativação do eixo HHA e quiçá do Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNAS), conforme já sugerido em outros contextos experimentais (MENZAGHI et al., 1993).

Neste sentido, já se relatou que a exposição de animais a alguns praguicidas, como, por exemplo, a organofosforados e piretróides do tipo II, poderia representar uma situação estressante (ABBUD RIGHI; PALERMO-NETO, 2003; CASTRO; PALERMO-NETO, 1989;

SPINOSA et al., 1999). Neste contexto, por modular a atividade de áreas específicas do SNC e, conseqüentemente, o eixo HHA e o SNAs, estes praguicidas poderiam interferir com a resposta imune, aqui caracterizada pela atividade de macrófagos. De fato, conforme já salientado, tanto o eixo HHA como o SNAS regulam, entre outras funções, a atividade do Sistema Imune em níveis regionais, locais e sistêmicos (ESKANDARI; STERNBERG, 2002).

É de amplo conhecimento a associação íntima que existe entre as atividades do SNC e do SI. Estudos ligados à neuroimunomodulação têm apresentado inúmeras evidências das relações de reciprocidade entre os mesmos. Inúmeros trabalhos mostraram, em seres humanos, os efeitos de estressores físicos e/ou psicológicos sobre a resposta imune (ADER et al., 1991; BESEDOVSKY; DEL REY, 1996; MILLER, 1998). Do mesmo modo, já se relatou a capacidade que apresentam os estressores de modificar a resposta imune de animais de laboratório. Assim, por exemplo, a aplicação de um choque elétrico nas patas, aumentou a susceptibilidade de camundongos ao vírus *Herpes simplex* (KUSNECOV et al., 1992); um estresse sonoro foi capaz de suprimir as respostas mediadas por linfócitos T e B (SOBRIAN et al., 1997); um choque elétrico aplicado de forma inescapável aumentou o número de células encontradas no lavado broncoalveolar de ratos sensibilizados com ovoalbumina (PORTELA et al., 2001); estressores de natureza física e psicológica foram capazes de diminuir tanto a atividade de macrófagos peritoneais ativados por onco-BCG como a resistência de camundongos ao tumor de Erlich (PALERMO-NETO et al., 2003). Neste último trabalho, mostrou-se que esta redução de imunidade estava inversamente correlacionada aos níveis de ansiedade apresentada pelos camundongos, como avaliada através do campo aberto, do LCE e dos níveis séricos de corticosterona.

Neste sentido, e antes de discutir os possíveis efeitos neuroimunomodulatórios da cialotrina e sua provável causa, é importante salientar que observadas as alterações de atividade de macrófagos peritoneais induzidas pela administração da cialotrina (RIGHI, 2003; RIGHI;

PALERMO-NETO., 2005), tornou-se relevante um estudo que comprovasse estes dados, usando metodologias mais sensíveis para análise de atividade de células imunes. Avaliamos, assim, os efeitos deste piretróide sobre a fagocitose de *S. aureus* realizada por macrófagos peritoneais, através de citometria de fluxo. Buscamos, também, a quantificação da produção de NO por estas células, uma vez que se sabe ter o NO relevante papel na defesa inata do organismo.

Nossos resultados, no que diz respeito à fagocitose medida por citometria após o uso de cialotrina (experimento 3) e produção de óxido nítrico (experimento 4), corroboram com aqueles por nós relatados anteriormente (RIGHI, 2003; RIGHI, PALERMO-NETO, 2005). De fato, os dados atuais, assim como os anteriores, apontam na mesma direção: diminuição da fagocitose e da produção de óxido nítrico. Entretanto, como anteriormente, não observamos quaisquer alterações no *burst* oxidativo de macrófagos.

Os nossos dados relativos à fagocitose efetuada por macrófagos após a dose de 3,0 mg/kg/dia de cialotrina, por sete dias, estão em linha com os de Ishigami (1919), Righi (2003) e Righi e Palermo-Neto (2005). Nestes trabalhos, assim como em muitos outros, mostrou-se ser um estressor capaz de diminuir a atividade fagocítica de macrófagos e de neutrófilos (FONSECA et al., 2002; MARINO et al., 2001; PALERMO-NETO et al., 2003). Ishigami (1919), em especial, relatou pela primeira vez uma diminuição da fagocitose de bacilos da tuberculose por macrófagos provenientes de crianças que passavam por uma situação de severo estresse emocional. Da mesma forma, tem sido relatado também que o estresse de contenção, assim como aquele induzido por choque inescapável em animais de laboratório, diminui a fagocitose de partículas de zymosan e de carbono por macrófagos; este fato é devido, muito provavelmente, à ativação do eixo HHA (OKIMURA et al., 1986; PALERMO-NETO et al., 2003). No entanto, e ao contrário do agora observado para a cialotrina, Palermo-Neto et al. (2003) também relataram um aumento induzido pelo estresse da liberação de H_2O_2 e não encontraram qualquer interferência do choque inescapável com a produção de NO por

macrófagos. Neste sentido, como a administração de cialotrina produziu uma diminuição na produção de NO, e não modificou aquela de H_2O_2 (tabela 3), é possível que estas diferenças sejam consequência de vias e etapas diferentes de ativação dos macrófagos.

Neste contexto, sabe-se que a secreção de espécies reativas de oxigênio (O_2^- , H_2O_2 , OH) pelos macrófagos é extremamente complexa; embora muito estudada, é pouca compreendida em seu nível molecular (ADAMS; HAMILTON, 1984; JOHNSTON, 1978). Parece ser consenso geral entre os pesquisadores que a secreção/produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) depende de pelo menos 3 sub-capacidades: **1)** número ou afinidade do receptor (Fc e complemento) pelo “triggering” ligante; **2)** eficiência de ligação destes receptores às oxidases, e **3)** níveis de oxidase necessários para produzir O_2^- e outros ERO. A principal enzima responsável pela produção de ERO é a NADPH oxidase, que está localizada, pelo menos na sua forma ativa, principalmente na e/ou próxima da membrana plasmática. Portanto, a geração de O_2^- e outros ERO por estímulos externos, como o Onco-BCG utilizado nos nossos experimentos, requer a ativação da NADPH oxidase (MC PHAIL; SYNDERMAN, 1983; SASADA et al., 1983). Parece, pois, razoável sugerir frente aos nossos dados que apesar de o tratamento com 3,0 mg/kg de cialotrina ter sido considerado semelhante a um evento estressante, ele não foi capaz de interferir com a produção de H_2O_2 , por não alterar a via de ativação da NADPH oxidase. Pelo visto, há que se confirmar esta hipótese.

Diversos autores têm observado que um estresse diminui a produção de H_2O_2 (RODRIGUES-GALAN et al., 2001). Estes relatos que aparentemente contrastam com os nossos dados, acerca da produção de peróxido de hidrogênio, ilustram a complexidade das interações entre os Sistemas Nervoso Central e Imune. De fato, além dos efeitos diferenciais de estressores sobre o balanço Th1 e Th2, sabe-se que: **1)** nem todo estressor produz o mesmo padrão de resposta neuroquímica; **2)** nem toda espécie ou sexo de animais responde a um determinado estressor da mesma maneira, tanto do ponto de vista comportamental, como

neuroquímico ou imunológico, e **3**) nem toda “função imune” é igualmente afetada pela aplicação de um mesmo agente estressor. Portanto, em resposta a um agente estressor, a “função imune” pode ser suprimida, incrementada ou até mesmo permanecer inalterada (MOYNAHAN et al., 1994).

Entre os produtos secretados pelos macrófagos, existem dois grupos de compostos inorgânicos com alta reatividade química: as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as reativas de nitrogênio. Dentre as espécies reativas de nitrogênio, o óxido nítrico (NO) tem despertado maior interesse científico, pela recente descoberta do seu importante papel nas defesas celulares contra infecções virais, parasitárias, bacterianas (AKAIKE et al., 1998; BOGDAN, 1997; KRONCKE et al., 1998) e também sobre células tumorais (CUI et al., 1994). A redução dos níveis de NO agora relatada após o tratamento com 1,0 e 3,0 mg/kg de cialotrina tem, pois, relevância clínica. Especificamente, observamos uma diminuição dose-dependente da produção de NO efetuada pelos macrófagos peritoneais de animais tratados por 7 dias consecutivos com as duas doses de cialotrina (tabela 4 e figura 8). Neste sentido, estudos realizados por nós anteriormente mostraram que a cialotrina, quando administrada pelo mesmo período de tempo na dose de 3,0 mg/kg, diminuiu a resistência do hospedeiro frente ao tumor ascítico de Ehrlich. Pode-se sugerir agora, frente aos novos achados experimentais, que muito provavelmente a diminuição induzida pela cialotrina na produção de óxido nítrico por macrófagos esteja associada com a redução da resistência ao tumor (QUINTEIRO FILHO; RIGHI; PALERMONETO, 2005).

Parece ser consenso geral entre os pesquisadores que os seguintes fatos mostram a importância da atividade antimicrobiana do NO: 1) as espécies reativas derivadas da NOS possuem atividade antimicrobiana; 2) as interações que ocorrem entre o NO e as espécies reativas de oxigênio levam à formação de múltiplos metabólitos antimicrobianos, como, por exemplo, do dióxido de nitrogênio (NO_2^-); 3) a produção do NO está aumentada durante

processos de “defesa do hospedeiro”; e 4) a inativação ou a falta de iNOS, seja esta por causa genética ou não, aumenta a capacidade de multiplicação dos microorganismos. Lembra-se que o NO é produzido a partir da L-arginina, em uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), e que nos macrófagos, ela é produzida a partir da iNOS, tendo um importante papel na resposta imune do “hospedeiro” frente a uma infecção. (FANG, 1997; WEI et al., 1995).

Neste contexto, diversos trabalhos têm demonstrado que um estressor pode interferir com a produção de NO derivada da iNOS presente em macrófagos. Sigola e colaboradores (2000) mostraram que a adrenalina diminui a produção, *in vitro*, de NO por macrófagos peritoneais. Estes pesquisadores, assim com outros autores (BARNES, 1996; WERB et al., 1978) mostraram, também que o aumento dos níveis séricos de corticosterona está associada à diminuição da produção de NO. Estes dados parecem, pois, corroborar com aqueles por nós observados. Neste contexto, ao induzir uma situação ansiogênica a cialotrina seria capaz de ativar o HHA e, desta forma, de interferir indiretamente com a produção de NO por macrófagos, via aumento nos níveis de corticosterona. De fato, relatamos aumento dos níveis séricos de corticosterona após tratamento com cialotrina (ABBUD RIGHI; PALERMO-NETO., 2003). Esta ação nos macrófagos ocorreria provavelmente em decorrência da interferência da corticosterona com a atividade da iNOS presente nos mesmos.

Sabe-se que os macrófagos têm receptores de superfície para glicocorticóides (AUGER; ROSS, 1991); estes receptores, se ativados, modulam a resposta destas células. Esta imunomodulação - associada ao estresse - está descrita em diversos trabalhos, que correlacionaram alterações dos níveis de glicocorticóides com a atividade de macrófagos (BLECHA et al., 1982; COE et al., 1987; MASSOCO; PALERMO-NETO, 1999; OKIMURA et al., 1986; PALERMO-NETO et al., 2003; RIGHI et al., 1999). Entretanto, não foram encontrados níveis alterados deste glicocorticóides em todos os estudos que relataram efeitos do

estresse sobre a resposta imune (ADER; COHEN, 1993; MOYNIHAN; COHEN, 1992; RABIN et al., 1990). Neste sentido, sabe-se que os glicocorticóides modulam a atividade Th1 e Th2 e, desta forma, através de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, a atividade do Sistema Imune (SCHWARTZ et al., 2001). Esta constatação talvez justifique a discrepância que existe entre os dados de literatura e também, de alguma forma, a ausência de resultados agora apontados para a cialotrina sobre a produção de H_2O_2 .

Nossos resultados relacionados com a atividade de macrófagos corroboram, assim, com aqueles da literatura, que relatam ser um agente estressor capaz de diminuir a atividade do Sistema Imune (LAWRENCE; KIM, 2000; MCEWEN et al., 1997). De fato, a administração de cialotrina diminuiu o percentual e intensidade de fagocitose, assim como a produção de NO por macrófagos peritoneais ativados por onco-BCG. Neste sentido, é muito relevante salientar que a dose de 1,0 mg/kg/dia de cialotrina, administrada por 7 dias, também diminuiu a atividade destes macrófagos, um fato previamente relatado (ABBUD RIGHI; PALERMO-NETO, 2003; RIGHI; PALERMO-NETO, 2005) e agora confirmado utilizando novas técnicas. Este achado, de alguma forma, dificulta o entendimento e a defesa da hipótese que postula a existência de um efeito neuroimunomodulatório para justificar as ações da cialotrina sobre os macrófagos, isto é, que o praguicida tenha um efeito indireto sobre a atividade de macrófagos via ativação do eixo HHA. De fato, a dose de 1,0 mg/kg de cialotrina, por 7 dias consecutivos, não produziu aumento dos níveis séricos de corticosterona e também não produziu alterações comportamentais.

Tornou-se, assim, relevante delinear alguns estudos que permitissem uma avaliação da participação da corticosterona nos efeitos agora relatados para a cialotrina, especialmente no que diz respeito à fagocitose e produção de óxido nítrico (NO) realizada por macrófagos.

Os dados provenientes dos estudos feitos após a adrenalectomia (experimento 5) e após manipulação farmacológica dos glicocorticóides (experimento 6), mostram que estes procedimentos reverteram, em parte, os efeitos da cialotrina sobre a atividade de macrófagos.

Especificamente, em relação a fagocitose, estes procedimentos aboliram os efeitos produzidos pela dose de 1,0 mg/kg de cialotrina, sendo incapazes de reverter aqueles observados após a dose de 3,0 mg/kg do praguicida (tabelas 5 e 7). No entanto, estes procedimentos reverteram os efeitos das duas doses de cialotrina (1,0 e 3,0 mg/kg) sobre a produção de NO (tabelas 6 e 8).

Considerando-se ser a cialotrina um estressor químico, nossos dados concordam, em parte, com aqueles da literatura que sugerem serem os glicocorticóides responsáveis pelos efeitos de estressores sobre a atividade de macrófagos (BLECHA et al., 1982; COE et al., 1987; MASSOCO; PALERMO-NETO, 1999; OKIMURA et al., 1986; PALERMO-NETO et al., 2003; RIGHI et al., 1999). É provável que a ausência de marcação fos no BLA tenha a ver com esta redução parcial de atividade de macrófagos. De fato, o BLA está envolvido com respostas emocionais a estressores físicos (BERLAU; MCGAUGH, 2003; HUFF et al., 2005; KIM; JUNG, 2006). Assim, é provável que existam outros mecanismos de ação que sejam responsáveis pelos efeitos da cialotrina sobre a fagocitose de macrófagos peritoneais de ratos. Alguns trabalhos da literatura mostram que níveis alterados de glicocorticóides nem sempre estão positivamente relacionados aos efeitos do estresse sobre a resposta imune (ADER; COHEN, 1993; MOYNIHAN ; COHEN, 1992; RABIN et al., 1990). Neste contexto, Keller et al. (1983) já haviam observado que a imunossupressão induzida pelo estresse aparecia tanto em animais “íntactos” como em animais adrenalectomizados, demonstrando, assim, a existência de outras vias, além daquela que envolve os glicocorticóides com as alterações de imunidade.

Conforme já salientado, sabe-se que estressores podem ativar tanto o eixo HHA, levando a respostas endócrinas, como o SNAS, desencadeando respostas neurovegetativas (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996; MENZAGHI et al., 1993.)

Neste contexto, diversos pesquisadores mostraram que os piretróides são capazes de produzir uma liberação de neurotransmissores no SNC (BROOKS; CLARK, 1987; DOHERTY et al., 1986, 1987) e que esta liberação ocorre apenas na presença de altas concentrações dos

mesmos (DOHERTY et al., 1986, 1987) ou, ainda, na presença de um outro estímulo despolarizante (BROOKS; CLARK, 1987; CLARK; BROOKS, 1989; SHAFER; MEYER, 2004). Pareceu-nos válido, portanto, verificar se a administração de cialotrina por sete dias consecutivos estaria interferindo com os neurotransmissores no SNC, mais especificamente com a noradrenalina e seus metabólitos no hipotálamo e no estriato.

Mostramos que a administração de cialotrina na dose de 3,0 mg/kg durante 7 dias consecutivos, aumentou os níveis de noradrenalina hipotalâmica, não modificando, entretanto, o “turnover” deste mesmo neurotransmissor. Mais especificamente, observamos um aumento dos níveis de noradrenalina no hipotálamo e uma ligeira, mas não significativa, diminuição dos metabólitos e do “turnover” deste neurotransmissor (tabela 9). Estes dados contrariam aqueles da literatura que sugerem um aumento da liberação de noradrenalina na vigência do tratamento com praguicidas piretróides (BROOKS; CLARK, 1987; DOHERTY et al., 1986, 1987). Contrariam também outros relatos de literatura e, muito especialmente, o de Lazzarini et al. (2001) que, utilizando outro piretróide tipo II (fenvalerato), mostraram, em nossos laboratórios, que a exposição a este praguicida aumentava os níveis de noradrenalina no estriato. De fato, a cialotrina no esquema de tratamento agora usado não alterou os níveis e o “turnover” de noradrenalina no estriato. Entretanto, deve-se salientar que o trabalho de Lazzarini et al. (2001) foi feito com outro piretróide e, principalmente, utilizando uma exposição prenatal. Tais fatos podem responder pela discrepâncias agora encontradas.

Uma possível hipótese explicativa para os dados de noradrenalina agora obtidos envolveria uma possível ativação pelos piretróides de outros sistemas de neurotransmissão, como, por exemplo, do gabaérgico, o qual por sua vez, “frearia” a atividade do sistema noradrenérgico. Neste sentido, Grosse et al. (2002) mostraram que pequenas concentrações de deltametrina podem aumentar a atividade gabaérgica em diferentes áreas do SNC. Neste contexto, um aumento de atividade gabaérgica poderia ser responsabilizado pela diminuição da

atividade do sistema noradrenérgico agora observado após o tratamento com a cialotrina. De fato, já está bem estabelecido que o sistema gabaérgico pode modular a liberação de noradrenalina por neurônios noradrenérgicos (BERLAU; MACGAUGH., 2006). No caso em tela, o uso do piretróide resultaria na ativação do sistema gabaérgico (uma tentativa do organismo de “frear” a estimulação induzida pelo praguicida?) levando a uma diminuição da liberação de noradrenalina no hipotálamo. Esta redução de liberação explicaria o aumento nos níveis de neurotransmissores e a conseqüente redução daqueles dos seus metabólitos.

Os dados de noradrenalina, agora relatados, concordam com aqueles por nós obtidos e referentes à atividade geral de ratos tratados com cialotrina (RIGHI., 2003). Especificamente, não observamos alterações da atividade locomotora dos animais tratados com cialotrina no campo aberto, fato que é compatível com os dados de noradrenalina agora observados. Houvesse ativação dos sistemas noradrenérgicos centrais após o uso de cialotrina, como relatado por outros após o uso de piretróides (BROOKS; CLARK, 1987; DOHERTY et al., 1986, 1987), era de se esperar aumento de atividade locomotora no campo aberto, um fato que não observamos (ABBUD RIGHI; PALERMO-NETO, 2003).

Outra hipótese para os dados de neuroquímica, referentes à noradrenalina, seria aquela que sugere uma tentativa do organismo em manter a homeostase do eixo HHA. Neste sentido, o aumento dos níveis séricos de corticosterona observado após a administração de 3,0 mg/kg de cialotrina, por sete dias consecutivos, levaria a uma redução da liberação de noradrenalina. De fato, sabe-se que a ativação do eixo HHA é facilitada pela liberação de noradrenalina induzida pelo estresse, em certas regiões do SNC, incluindo-se aqui o NPH (MA; MORILAK., 2005; MORILAK et al., 2005; PARDON et al., 2003). Assim, uma redução da liberação de noradrenalina no NPH induzida pela corticosterona reduziria a ativação do eixo HHA, restaurando a homeostasia.

Sabe-se que estressores são capazes de induzir aumento de atividade em neurônios noradrenérgicos do núcleo paraventricular do hipotálamo (MA; MORILAK, 2005); sabe-se, também que este aumento de atividade esta relacionado à maior expressão de fos e de mRNA para CRH nesta mesma região do SNC (ITOI et al., 1994; KISS; AGUILERA, 1992). Estas constatações em seu conjunto estão, pois, aparentemente discordantes dos nossos dados de noradrenalina, pois conforme já salientado, observamos um aumento na expressão de c-fos no NPH mas não um aumento do “turnover” de noradrenalina. Neste sentido, sabe-se que c-fos é um excelente marcador de atividade neuronal (DRAGUNOV, FAULL, 1989; SAGAR; SHARP; CURRAN, 1988); contudo, esta marcação não é específica para grupos de neurônios. Neste contexto, levando-se em consideração o aumento dos níveis de corticosterona observado após a dose de 3,0 mg/kg de cialotrina, por 7 dias consecutivos (RIGHI., 2003; ABBUD RIGHI; PALERMO-NETO., 2003), e a diminuição da liberação de noradrenalina (tabela 9) sugere-se que a maior atividade neuronal, observada neste trabalho e indicada pela maior expressão de c-fos, não seja decorrente do aumento de atividade de neurônios noradrenérgicos, mas de outros sistemas hipotalâmicos de neurotransmissão. Haveria, no entanto, uma participação direta da noradrenalina e da adrenalina via ativação do SNAS nesta atividade imunomodulatória da cialotrina?

Neste sentido, sabe-se que o SNAS comunica-se com o Sistema Imune primariamente através da liberação de neurotransmissores a partir dos terminais nervosos simpáticos (MADDEN, 2001; SANDERS et al., 2001). De fato, o SNAS pode regular sistematicamente a resposta imune através da liberação de noradrenalina e adrenalina a partir principalmente da medula da adrenal. O SNAS (assim como o eixo HHA) são ativados por citocinas originárias de células do sistema imune que reconhecem antígenos, como os lipopolissacarídeos (LPS) e o *Micobacterium*. Sabe-se que os nervos periféricos simpáticos inervam tecidos localizados nos locais de inflamação e órgãos imune, como o timo, baço e linfonodos, e que a noradrenalina é

liberada diretamente nestes tecidos em resposta a sinais de perigo e situações de estresse (FELTEN, 2002; MADDEN, 2001).

A ligação da noradrenalina em receptores β -adrenérgicos presentes em células do sistema imune, como, por exemplo, em macrófagos (MULLER-WIELAND et al., 1994), sabidamente modula as respostas imunes e inflamatórias, afetando o tráfico imune celular, a circulação, a proliferação e a atividade das células imunes (ESKANDARI; STERNBERG, 2002; LORTON et al., 1999.). Através destes mecanismos, a ativação do SNAS causa supressão seletiva da resposta Th1, levando uma dominância das respostas Th2. Este fato é muito semelhante ao que ocorre quando da ativação do eixo HHA (ELENKOV; CHROUSOS, 1999).

Portanto, é possível que a cialotrina, por ser um estressor químico (ABBUD RIGHI; PALERMO-NETO, 2003), interfira com a atividade de macrófagos peritoneais por modular a atividade do SNAS.

Um método amplamente utilizado para estudar a participação do SNAS sobre a resposta imune é aquele que emprega a chamada simpatectomia química periférica realizada através da utilização da neurotoxina “6-hydroxydopamina” (6-OHDA – LORTON et al., 1999; PICLO, 1997). Sabe-se que a 6-OHDA não atravessa a barreira hemato - encefálica quando administrada a animais adultos e que, quando sistematicamente administrada, destrói os terminais periféricos das fibras noradrenérgicas simpáticas (KOSTRZEWA; JACOBOWICTZ, 1974). Portanto, a denervação sistêmica do SNAS pela 6-OHDA é uma técnica efetiva e uma ferramenta ideal para examinar a influência do SNS e, portanto, da noradrenalina em modular as respostas imunes (BREIVIK et al., 2005). Esta foi a razão que nos levou a usar esta neurotoxina no presente trabalho.

Nossos dados mostram que o uso de 6-OHDA *per se* não modificou a atividade de macrófagos (Tabela 11) e também que ela não inibiu o efeito produzido pela cialotrina sobre a atividade de macrófagos, seja no que diz respeito à fagocitose, seja no que é pertinente à

produção de óxido nítrico (Tabelas 11 e 12). Assim, e à primeira vista, nossos dados parecem contradizer outros de literatura, em especial os de Cao, Filipov e Lawrence (2002), pois estes autores relataram ser a simpatectomia química por 6-OHDA capaz de inibir os efeitos estimulantes de um estresse agudo por restrição ou frio, sobre o SNAS, aumentando a susceptibilidade dos animais a infecções, como aquelas causadas por *Listeria monocytogenes*. Neste sentido, é relevante relatar que Cao, Filipov e Lawrence (2002) sugeriram apenas a participação do SNAS nos resultados que observaram, descartando aquela do eixo HHA. Este fato é relevante. De fato, como amplamente comentado nesta tese, um agente estressor pode estimular tanto o SNAS como o eixo HHA e, portanto, a “função imune” pode ser modulada individualmente ou em conjunto por estes sistemas. Neste sentido, os dados agora obtidos, se tomados em conjunto, parecem apontar nesta direção.

Observamos que tanto a adrenalectomia, como a manipulação dos níveis de glicocorticóides, inibiram, em parte, os efeitos da cialotrina sobre a atividade de macrófagos, enquanto que a simpatectomia química com 6-OHDA não foi capaz de inibir tal efeito. Quer nos parecer, pois, que a cialotrina apesar de induzir uma situação semelhante ao estresse (ABBUD RIGHI; PALERMO-NETO, 2003), modula a atividade de macrófagos de forma diferenciada destes. Esta modulação diferencial permite à cialotrina diminuir a atividade dos macrófagos peritoneais, principalmente através da ativação do eixo HHA, mas não do SNAS. Estariam os dados diferenciais de marcação c-fos agora relatados no NPH e no BLA relacionados aos nossos achados de atividade de macrófagos após manipulação do HHA e do SNAS? Estaria o BLA (onde não houve marcação fos) mais envolvido com os efeitos do SNAS na atividade de macrófagos? Por certo, outros experimentos deverão responder a estas questões.

Neste sentido, não podemos esquecer que os macrófagos agora estudados foram analisados após uma ativação produzida pela administração do Onco-BCG. Sabe-se que a fagocitose é um processo ativo que depende da ativação de receptores presentes na membrana

das células imunes e que a ativação destes receptores é induzida pelo Onco-BCG e/ou outros produtos bacterianos (JOANNE; CHAN, 2001).

Assim, poderia o tratamento com cialotrina interferir com o processo de ativação celular induzida pela *Mycobacterium*? De fato, a ativação feita pelo Onco-BCG e o tratamento com a cialotrina foram realizados conjuntamente. Apesar dos presentes dados não permitirem comentários adicionais, parece-nos relevante salientar que o tratamento com cialotrina aumentou os níveis séricos de corticosterona (ABBUD RIGHI; PALERMO-NETO, 2003), e que os glicocorticoides e a ativação dos “Toll Like Receptors” (TLR) regulam a ativação gênica do NF- κ B (HAYASHI et al., 2001; JOANNE; CHAN., 2001), a qual é um fator de transcrição crucial para a ativação dos macrófagos (SAKLATVALA, 2002). De fato, estudos *in vitro* utilizando TLR2– e/ou TLR4 – expressos em linhagem celulares e macrófagos murinos em conjunto com a atividade de NF- κ B, evidenciam que a *Mycobacterium* pode imunologicamente ativar células (incluindo macrófagos e neutrófilos) via TLR2 ou TLR4, independentemente de CD14 (JOANNE; CHAN, 2001; PARKER et al., 2005).

No entanto, uma vez que a participação do eixo HHA na inibição induzida pela cialotrina na atividade de macrófagos foi apenas parcial, quer nos parecer que outras vias, além daquela que envolve os glicocorticóides, devam ser deflagradas após seu uso. Neste contexto, observamos que o tratamento *in vitro* de macrófagos ativados com Onco-BCG com cialotrina foi também capaz de diminuir a atividade de macrófagos, como por nós relatada anteriormente (RIGHI; PALERMO-NETO, 2005) e agora confirmada por citometria de fluxo; uma ação como esta justifica nossos dados relativos à modulação parcial da atividade de macrófagos exercida pelo eixo HHA após a administração de cialotrina, isto é, a cialotrina estaria atuando indiretamente (via eixo HHA) e também diretamente em macrófagos.

Uma explicação simplista para o efeito *in vitro* da cialotrina sobre a atividade de macrófagos, seria uma ação citotóxica da mesma sobre estas células. De fato, já se relatou terem

os piretróides, em especial os do tipo II, como, por exemplo a deltametrina e a lambda-cialotrina, uma ação citotóxica (CELIK et al., 2005; WU et al., 2003). Dados que obtivemos e referentes à viabilidade celular (Tabela 13), no entanto, excluem totalmente esta hipótese e contrapõem os dados de Wu et al. (2003). Mostramos que o tratamento *in vitro* com a cialotrina não alterou a viabilidade celular dos macrófagos peritoneais ativados. Esta discrepância entre os nossos dados e os do grupo de Wu deve-se, muito provavelmente, a diferenças no tipo, concentração e forma de tratamento bem como nas células analisadas. De fato, Wu et al. (2003) utilizaram astrócitos incubados com 1×10^{-4} mol/L de deltametrina por um tempo mínimo de 4 horas e nós utilizamos macrófagos incubados com 10 e 100 nM de cialotrina por um período de 30 minutos. Nesta mesma linha de raciocínio, quando confrontamos os dados que obtivemos e relativos à viabilidade celular com os de Celik et al. (2005), encontramos discrepâncias que, assim como citado anteriormente, devem-se, provavelmente a diferenças entre os protocolos experimentais. De fato, Celik et al. (2005) utilizaram um tratamento *in vivo* e nós o fizemos *in vitro*.

Entretanto, nossos dados de viabilidade celular corroboram com os de Undeger e Basaran (2005). Estes pesquisadores, utilizando o teste de exclusão de azul de tripan, verificaram que o tratamento *in vitro* com diferentes praguicidas (cipermetrina, permetrina, propoxur, pirimicarb e parathion) incubados por 30 minutos, não modificou a viabilidade de linfócitos. Ressalte-se que a metodologia usada por estes autores é muito semelhante àquela por nós aqui utilizada.

Assim, nossos dados relativos à diminuição de atividade de macrófagos (porcentagem e intensidade de fagocitose), após tratamento *in vitro* com cialotrina em concentrações que não diminuem a viabilidade celular (Tabela 14), apontam claramente para uma ação direta deste piretróide nos macrófagos. Neste sentido, observamos, que o tratamento *in vitro* com as duas concentrações de cialotrina (10 nM e 100 nM) diminuiu a fagocitose e a produção de NO realizada por macrófagos ativados por BCG e não alterou o *burst* oxidativo destas células.

Saliente-se, neste momento, que os efeitos *in vitro* da cialotrina sobre a atividade de macrófagos peritoneais foram analisados tanto por metodologias visuais (RIGHI, 2003; RIGHI; PALERMO-NETO, 2005), como por citometria de fluxo, apontando para mesma direção, isto é, para diminuição da atividade. Através de qual mecanismo estaria este piretróide agindo? Em um primeiro momento, poder-se-ia pensar em um efeito direto da cialotrina sobre os receptores benzodiazepínicos periféricos (PBR) presentes na membrana dos macrófagos (ZAVALA; LEFANT, 1987). De fato, tem sido sugerido uma ação dos piretróides em PBR presentes no SNC (SODERLUND et al., 2002).

Neste sentido, uma ação da cialotrina em PBR poderia justificar as modificações na atividade de macrófagos, como já demonstrado após o uso de agonistas de receptores PBR (MASSOCO et al., 1999; MASSOCO, 2003). Estes autores mostraram uma redução - induzida por benzodiazepínicos - dos índices de espraçamento, de fagocitose e de produção de espécies reativas de oxigênio. Tais dados concordam, em parte com os nossos resultados, pois observamos uma diminuição apenas da fagocitose (percentual e intensidade) e da produção de NO, mas não das espécies reativas de oxigênio. Já foi sugerida a existência de um “link” funcional entre PBR e a ativação da NADPH-oxidase (SILVA et al., 2003; ZAVALA et al., 1991); e, conforme já salientado, a produção de espécies reativas de oxigênio depende desta ativação.

Nossos dados referentes à atividade de macrófagos incubados com ligantes de PBRs (experimentos 13 e 14), no entanto, sugerem que estes receptores não estejam envolvidos com os efeitos *in vitro* agora relatados para a cialotrina. De fato, o tratamento *in vitro* com o ligantes de PBR não reverteu os efeitos da cialotrina sobre a atividade de macrófagos (Tabelas 17 e 18; Figuras 22 e 23). Assim e, conforme já salientado, parece que os PBRs não estejam envolvidos com os efeitos da cialotrina sobre a atividade de macrófagos. Nossos dados mostram, no entanto, que o Ro 5-4864, na concentração de 10 nM, diminuiu *per se* a intensidade de

fagocitose, fenômeno este que foi revertido pelo PK 11195, confirmando e corroborando com dados obtidos anteriormente em nosso laboratório por Silva (2003) e Massoco (2003).

Entretanto, não observamos qualquer atividade para ligantes de PBR quando usados na concentração de 100 nM. Uma possível explicação para este fato seria a classificação de ligantes de PBR em agonistas e antagonistas, dependendo estas ações da concentração em que estes são utilizados. Sob certas condições fisiológicas e, dependendo do tipo de tecido ou célula analisada, ambos efeitos podem até mesmo aparecer (MASSOCO, 2003).

Uma vez que a cialotrina atua *in vitro* sobre os macrófagos e que os PBRs aparentemente não estão envolvidos nesta ação, qual seria o mecanismo de ação? Embora não se tenha analisado esta questão, parece-nos possível sugerir um envolvimento dos canais de cálcio nestes efeitos da cialotrina, isto é, a cialotrina atuaria diretamente nos canais de cálcio presentes nas membrana dos macrófagos. De fato, foi recentemente proposto que os piretróides do tipo I e do tipo II bloqueariam os canais de cálcio, diminuindo o influxo deste íon (SODERLUND et al., 2002), que tem papel fundamental na atividade dos macrófagos, como, por exemplo, na fagocitose (CAMPO; SUPRENANT; ALAN NORTH, 2003; WINFRIED et al., 2005). Neste sentido, já se relatou serem os piretróides (tipo I e II) capazes de inibir os canais de cálcio presentes nas membranas de leucócitos peritoneais de ratos (GROSMAN; DIEL, 2005). Portanto, não seria de se estranhar que a cialotrina, um piretróide tipo II, atuasse diretamente sobre os canais de cálcio presentes nas membranas dos macrófagos peritoneais, o que explicaria a diminuição da atividade dos mesmos, relatada *in vitro* neste trabalho (RIGHI, 2003; RIGHI; PALERMO-NETO, 2005). Esta ação direta somar-se-ia, então, com outra indireta que se faria através dos efeitos da cialotrina sobre no eixo HHA, via aumento dos níveis séricos de corticosterona.

Embora muitas questões ainda careçam de respostas, parece-nos relevante dizer que os presentes resultados alertam para possíveis efeitos adversos de exposições prolongadas a

piretróides tipo II sobre o SI. Embora estas exposições não envolvam sintomatologia clínica de toxicidade, carregam potencial para induzir um estado fisiológico semelhante àquele produzido pelo estresse, diminuindo a atividade de macrófagos (e quiçá de outros parâmetros imunológicos), o que representaria diminuição da resistência dos organismos a uma invasão, por microorganismos. Neste sentido, deveriam ser tomados cuidados a fim de se evitar a exposição de animais e pessoas a piretróides tipo II, em especial pessoas imunossuprimidas, como, por exemplo, portadores do Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV+) ou pacientes tratados com fármacos imunodepressores. Finalmente, os presentes dados reforçam a relevância dos resultados e dos estudos de imunotoxicologia e de neuroimunomodulação.

8 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos sugerem que:

- ✓ A administração de cialotrina por 7 dias consecutivos na dose de 3,0mg/kg ativa neurônios do SNC, fato avaliado através do aumento de expressão de c-fos no núcleo paraventricular do hipotálamo. Não modifica, no entanto, a atividade neuronal do núcleo baso lateral da amígdala.
- ✓ A ativação do eixo HHA, pela administração da cialotrina – via aumento dos níveis de corticosterona sérica, é um dos fatores responsáveis pelos efeitos deste praguicida sobre a atividade de macrófagos peritoneais.
- ✓ A cialotrina produz um aumento dos níveis de noradrenalina e não interfere com a taxa de renovação deste neurotransmissor no hipotálamo, e não modifica quer os níveis quer a taxa de renovação de noradrenalina no estriato
- ✓ O Sistema Nervoso Autônomo Simpático não está diretamente envolvido com as ações da cialotrina na atividade de macrófagos peritoneais.
- ✓ A cialotrina possui uma ação direta em macrófagos peritoneais.
- ✓ A ação direta da cialotrina em macrófagos peritoneais não se faz via ativação de Receptores Benzodiazepínicos Periféricos (PBRs).

Em seu conjunto, parece-nos possível sugerir que o mecanismo de ação através do qual a cialotrina interfere com a atividade de macrófagos peritoneais inclua tanto uma ação direta como outra indireta, que se faz através da ativação do eixo HHA e conseqüente liberação de corticosterona. Experimentos futuros poderão trazer informações adicionais sobre uma ação da cialotrina em canais iônicos presentes nas membranas de macrófagos.

REFERÊNCIAS

- ABBUD RIGHI, D.; PALERMO-NETO, J. Behavioral effects of type II pyrethroid cyhalothrin in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 191, p. 167-176, 2003.
- ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. **Annual Review of Immunology**, v. 2, p. 283-318, 1984.
- ADER, R. Psychosomatic and psychoimmunologic research. **Psychosomatic Medicine**, v. 42, p. 307– 321, 1980.
- ADER, R.; COHEN, N. Psychoneuroimmunology: conditioning and stress. **Annual Review of Immunology**, v. 44, p. 53-85, 1993.
- ADER, R.; FELTEN, D.; COHEN, N. **Psychoneuroimmunology**, 2. ed. New York: Academic Press, 1991. 179 p.
- ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanism of phagocytosis in macrophages. **Annual Review of Immunology**, v. 17, p. 593-623, 1999.
- AKAIKE, T.; SUGA, M.; MAEDA, H. Free radicals in viral pathogenesis molecular mechanisms involving superoxide and NO. **SEBM**, v. 217, p. 64-73, 1998.
- ALDRIDGE, W. N. An assessment of the toxicology properties of pyrethroids and their neurotoxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 21, p. 89-103, 1990.
- ALITALO, K.; HOVI, T.; VAHERI, A. Fibronectin is produced by human macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 3, p. 602 - 613, 1980.
- AUGER, M. J.; ROSS, J. A. The biology of the macrophage. In: LEWIS, C. E.; MCGEE, J. O. D. (Ed). **The natural immune system: the macrophage**. England: Oxford University Press, 1991, p.1-74.
- AUTELITANO, D. J.; LUNDBLAD, J. R.; BLUM, M.; ROBERTS, J. L. Hormonal regulation of POMC gene expression. **Annual Review of Physiology**, v. 51, p. 715-726, 1989.
- BADWEY J. A.; KARNOSVKY, M. L. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 695-726. 1980
- BARNES, J. M.; VERSCHOYLE, R. D. Toxicity of new pyrethroid insecticides, **Nature**, v. 248, p. 711, 1974.
- BARNES, P. J. Mechanism of action of glucocorticoids in asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 154, p. 21, 1996.

- BASS, D. A.; PARCE, J. W.; DECHATELET, L. R.; SZEJDA, P.; SEEDS, M. C.; THOMAS, M. Flow cytometric studies of oxidative produce formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **Journal of Immunology**, v. 130, p. 1910–1917, 1983.
- BASSO, A. S.; COSTA-PINTO, F. A.; BRITTO, L. R. G.; SÁ-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Neural pathways involved in food allergy signling in the mouse brain: role of capsaicin-sensitive afferents. **Brain Research**, v. 1009, p. 181-188, 2004.
- BASSOE, C. F.; LAERUM, O. D.; SOLBERG, C. O.; HANEBERG, B. Phagocytosis of bactéria by human leucocytes measured by flow cytometry. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 174, p. 182-186, 1983.
- BAST, R. C.; CLEVELAND, R. P.; LITTMAN, B. H.; ZBAR, B.; RAPP, H. J. Acquired celular immunity: extracelular killing of *Listeria monocytogenes* by a product of immunologically activated macrophages. **Cellular Immunology**, v. 10, p. 248-259, 1974.
- BEINLICH, A. B.; STROHMEIER, R.; KAUFMANN, M.; KUHL, H. Specific binding of benzodiazepines to human breast cancer cell lines. **Life Science**, v. 65, p. 2099–2108, 1999.
- BENAVIDES, J.; GUILLOX, F.; ALLM, D.; UZAN, A.; MIZOULE, J.; RENAULT, C.; DUBROEUCQ, M.; GUEREMY, C.; LEFUR, G. Opposite effects of an agonist, Ro5-4864, and an antagonist, PK11195, of the peripheral type benzodiazepine binding sites on audiogenic seizures in DBA/2J mice. **Life Science**, v. 34, p. 2613–2620, 1984.
- BERLAU, D. J.; MCGAUGH, J. L. Basolateral amygdala lesions do not prevent memory of context-footshock training. **Learning and Memory**, v. 10, p. 495–502, 2003.
- BERLAU, D. J.; MCGAUGH, J.L. Enhancement of extinction memory concolidation: The role of the noradrenergic and GABAergic systems within the basolateral amygdala. **Neurobiology of Learning and Memory** (in press – 2006) Available on line: www.sciencedirect.com
- BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocrine Reviews**, v. 17, p. 64–102, 1996.
- BJORKSTEN, B.; QUIE, P. J. Recent advances in clinical immunology. Ed: R.A. Thompson (Churchil Livingstone, Edinburgh). 181 p.
- BLACKWELL, T. S.; CHRISTMAN, J. W. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. v.17, p. 3-9, 1997.
- BLALOCK, J. E. A molecular basis for bidirecional 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.

BLECHA, F.; KELLEY, K. W.; SATTERLEE, D. G. Adrenal involvement in the expression of delayed-type hypersensitivity to SRBC and contact sensitivity to DNFB in mice. **Proceedings of the Society for Experimental and Biological Medicine.**, v. 169, p. 247-252, 1982.

BOER, S. F.; GUGTEN, J. L.; SLAGEN, J. L.; HIJZEN, T. H.; Changes in plasma corticosterone and catecholamine content induced by low doses of deltamethrin in rats. **Toxicology**, v. 49, p. 263–270, 1988.

BOGDAN, C. Of microbes, macrophages and nitric oxide. **Behring Institute Mitteilungen.**, v. 99, p. 58-71, 1997.

BREIVIK, T.; GUNDERSEN, Y.; OPSTAD, P.K.; FONNUM, F. Chemical sympathectomy inhibits periodontal disease in Fischer 344 rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 40, p. 325–330, 2005.

BRISKI, K.; GILLEN, E. Differential distribution of Fos expression within the male rat preoptic area and hypothalamus in response to physical vs. psychological stress. **Brain Research Bulletin**, v. 55, n. 3, p. 401-408, 2001.

BROOKS, W. H.; CLARK, J. M. Enhancement of norepinephrine release from rat brain synaptosomes by alpha cyano pyrethroids. **Pesticides and Biochemical Physiology**, v. 28, p. 127-139, 1987.

BROOKS, W. H.; CROSS, R. J.; ROSZMAN, T. L.; MARKESBERY, W. R. Neuroimmunomodulation: neural anatomical basis for impairment and facilitation. **Annals of neurology**, v. 12, p. 56–61, 1982.

BROWN, D. E.; SHERIDAN, J.; PEARL, D.; ZWILLING, B. S. Regulation of Mycobacterial growth by the hypothalamus-pituitary-adrenal axis: differential responses of BCG resistant and susceptible mice. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 4793-4800, 1993.

BROWN, L. D.; NARAHASHI, T. Modulation of nerve membrane sodium channel activation by deltamethrin. **Brain Research**, v. 584, p. 71- 76, 1992.

CAO, L.; FILIPOV, N. M.; LAWRENCE, D. A. Sympathetic nervous system plays a major role in acute cold/restraint stress inhibition of host resistance to *Listeria monocytogenes*. **Journal of Neuroimmunology**, v. 125, p. 94-102, 2002.

CAMPO, B.; SURPRENANT, A.; ALAN NORTH, R. Sustained Depolarization and ADP-Ribose Activate a Common Ionic Current in Rat Peritoneal Macrophages. **Journal of Immunology**, p. 1167-1173, 2003

CARMEL, I.; FARES, F. A.; LESCHINER, S.; SCHERUBL, H.; WEISINGER, G.; GAVISH, M. Peripheral-type benzodiazepine receptors in the regulation of proliferation of MCF-7 human breast carcinoma cell line. **Biochemical and Pharmacology**, v. 59, p. 831 – 842, 1999.

CASTRO, V. L. S. S.; PALERMO-NETO, J. Effects of a specific stress (Aldrin) on rat progeni behavior. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 22, n. 8, p. 979 – 982, 1989.

CATERALL, W. A. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 16, p. 521-555, 2000.

CELIK, A.; MAZMANCI, B.; ÇAMLICA, Y.; ÇOMELEKOGLU, U.; ASKIN, A. Evaluation of cytogenetic effects of lambda-cyhalothrin on Wistar rat bone marrow by gavage administration. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, p. 128-133, 2005.

CHAMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. Endocrinology of the stress response. **Annual Review of Physiology**, v. 67, p. 259-284, 2005.

CLARK, J. M.; BROOKS, M. W. Role of ion channels and intraterminal calcium homeostasis in the action of deltamethrin at presynaptic nerve terminals. **Biochemical and Pharmacology**, v. 38, p. 2233-2245, 1989.

CHROUSOS, G. P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, p. 1351–1362, 1995.

COE, C. L.; ROSENBERG, L. T.; FISHER, M.; LEVINE, S. Psychological factors capable of preventing the inhibition of antibody responses in separated infant monkeys. **Child Development**, v. 58, p. 1420 –1430, 1987.

COHEN, S.; HERBERT, T. B. Health psychology: psychological factors and physical disease from the perspective of human psychoneuroimmunology. **Annual Review of Psychology**, v. 47, p. 113-142, 1996.

COHN, Z. A. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy, and future. **Journal of Immunology**, v. 121, p. 813-816, 1978.

CONTE, A.; OTAVIANI, E. Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes. **FEBS Letters**, v. 365, p. 120-124, 1995.

COSTA, E.; GUIDOTTI, A.; TOFFANO, G. Molecular mechanisms mediating the action of diazepam on GABA receptors. **The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science**, v. 133, p. 239-248, 1978.

COSTA, E. C. R. **Neuroimunomodulação: efeitos da morfina sobre o comportamento e a atividade de macrófagos**. 2004. 124 p. Dissertação (Mestrado) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Acute and chronic inflammation: In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (Ed.). **Robbins – Pathologic basis of disease**. 6. ed. Philadelphia: EUA, Editora Saunders, 1999, p. 50-88.

COX, D.; GREENBER, J. phagocytic signaling strategies: Fcγ receptor-mediated phagocytosis as a model system. **Immunology**, v. 13, p. 339-345, 2001.

CRANER, M. J.; DAMARJIAN, T. G.; LIU, S.; HAINS, B. C.; LO, A. C.; BLACK, J. A.; NEWCOMBE, J.; CUZNER, M. L.; WAXMAN, S. G. Sodium channels contribute to microglia/macrophage activation and function in EAE and MS. **Glia**, v.15, n. 2, p. 220-229, 2005.

CRAWFORD, J. R.; JACOBSON, A. R. Extracellular calcium regulates HeLa cell morphology during adhesion to gelatin: role of translocation and phosphorylation of cytosolic phospholipase A2. **Molecular and Cellular Biology**, v. 12, p. 3429-3443, 1998.

CUI, S.; REICHNER, J. S.; MATEO, R. B.; ALBINA, J. E. Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric-oxide-dependent or independent mechanism. **Cancer Research**, v. 54, p. 2462-2467, 1994.

DALVI, A.; RODGERS, R. J. Anxiolytic effects of valproate and diazepam in mice are differentially sensitive to picrotoxin antagonism. **Pharmacology, Biochemistry and behaviour**, v. 68, p. 23-32, 2001.

DEVAUD, L. L.; MURRAY, T. F. PK 11195 antagonism of pyrethroid-induced proconvulsant activity. **European Journal of Pharmacology**, v. 120, p. 269-273, 1986.

DOHERTY, J. D.; LAUTER, C. J.; SALEM, N. J. Synaptic effects of the synthetic pyrethroid resmethrin in the rat brain in vitro, **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 84, p. 373-379, 1986.

DOHERTY, J. D.; NISHIMURA, K.; KURIHARA, N.; FUJITA, T. Promotion of norepinephrine released and inhibition of calcium uptake by pyrethroids in rat brain synaptosomes. **Pesticides and Biochemical Physiology**, v. 29, p. 187-196, 1987.

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, p. 2407-2412, 1988.

DRAGUNOV, M.; FAULL, R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 29, p. 261-265, 1989.

DUCE, I. R.; KHAN, T. R.; GREEN, A. C.; THOMPSON, A. J.; WARBUTON, S. P. M.; WONG, J. Calcium channels in insects. In: BEADLE, D.J. (Ed.). **Progress in euopharmacology and neurotoxicology of pesticides and drugs**. Oxford, UK: The Royal Society of Chemistry, p. 56-66, 1999.

DUNN, A. J. Interactions between the nervous system and the immune system. In: BLOMM, F. E.; KUPFER, D. J. (Ed). **Psychopharmacology: the fourth generation of progress**. New York: Raven Press, 1995. p. 719–731.

ELENKOV, I. J, CHROUSOS, G. P. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/antinflammatory cytokines and susceptibility to disease. **Trends Endocrinology and Metabolic**, v. 10, p. 359–368, 1999.

EPA –United States Enviromental Protection Agency. Synthetic pyrethroids for mosquito control. In: **Prevention, pesticides and toxic substances.**, May 2000.

ESKANDARI, F.; STERNBERG, E. M. Neural-immune interactions in health and disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 966, p. 20-27, 2002.

FANG, F.C. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial acivity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, p. 2818-2825, 1997.

FAO/WHO - Toxicology evaluation of certain veterinary drug residues in food. Prepared by the Fifty-fourth meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA) In: **Who Additives Series.**, v. 45, p. 41-74, 2000.

FEARON, D. T.; COLLINS, L. A. Increased expression of C3b receptors on polymorphonuclear leukocytes induced by chemotatic factors and purification procedures. **Journal of Immunology**, v. 130, p. 370-375, 1983.

FELICIO, L. F.; FLORIO, J. C.; SIDER, L. H.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; BRIDGES, R. S. Reproductive experience increases striatal and hypothalamic dopaminic levels in pregnant rats. **Brain Research Bulletin**, v. 40, n. 4, p. 253-256, 1996.

FELTEN, D. L. Neural influence on immune responses: underlying suppositions and basic principles of neural-immune signalling. **Progress in Brain Research**, v. 122, p. 381–389, 2002.

FELTEN, D. L.; ACKERMAN, K. D.; WIEGAND, S. J. Noradrenegic sympathetic innervation of the spleen: I. Nerve fibers associate with lymphocytes and macrophages in specific compartments of the splenic white pulp. **Journal of Neuroscience Research**, v. 18, p. 28–36, 1987.

- FONSECA, E. S. M.; MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J. Effects of prenatal stress on stress-induced changes in behavior and macrophage activity. **Physiology and Behaviour**, v. 77, p. 205-215, 2002.
- FORSHAW, P. J.; LISTER, T.; RAY, D. E. Inhibition of neuronal voltage-dependent chloride channel by type II pyrethroid, deltamethrin. **Neuropharmacology**, v. 32, n. 2, p. 105-11, 1993.
- FRANCHINI, A.; CONTE, A.; OTAVIANI, E. Nitric oxide: an ancestral immunocyte effector molecule. **Advances in neuroimmunology**, v. 5, n. 4, p. 463-478, 1995.
- FRANKLIN, K.; PAXINOS, G. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. San Diego: Academic Press, 1998. 210 p.
- FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 28, p. 373, 1980.
- GABBIANELLI, R.; NASUTI, C.; FALCIONI, G.; CANTALAMESSA, F. Lymphocyte DNA damage in rats exposed to pyrethroids: effect of supplementation with vitamins E and C. **Toxicology**, v. 203, p. 17-26, 2004.
- GAMMON, D. E.; LAWRENCE, L. J.; CASIDA, J. E. Pyrethroid toxicology: protective effects of diazepam in the mouse and cockroach. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 66, p. 290-296, 1982.
- GRAEFF, F. G. *Drogas Psicotrópicas e seu modo de ação*. Editora pedagógica, São Paulo, 155 p. 1989.
- GRAY, T. S. Amygdaloid CRF pathways. Role in autonomic, neuroendocrine, and behavioral responses to stress. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 697, p. 53-60, 1993.
- GRAY, T. S.; BINGAMAN, E.W. The amygdala: corticotropin-releasing factor, steroids, and stress. **Critical reviews in neurobiology**, v. 10, p. 155-168, 1996.
- GROSMAN, N.; DIEL, F. Influence of pyrethroids and piperonyl butoxide on the Ca(2+)-ATPase activity of rat brain synaptosomes and leukocyte membranes. **International Immunopharmacology**, v. 5, p. 263-270, 2005.
- GROSSE, G.; THIELE, T.; HEUCKENDORF, E.; SCHOPP, E.; MERDER, S.; PICKERT, G.; AHNERT-HILGER, G. Deltamethrin differentially affects neuronal subtypes in hippocampal primary culture. **Neuroscience**, v.112, n. 1, p. 233-241, 2002.
- HAMMOND, B.; KONTOS, H. A.; HESS, M. L. Oxygen radicals in the adult respiratory distress syndrome, in myocardial ischemia and reperfusion injury, and in cerebral vascular damage. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 63, p. 173-187, 1985.

HARDWICK, M.; FERTIKH, D.; CULTY, M.; LI, H.; VIDIC, B.; PAPADOPOULOS, V. Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in human breast cancer: correlation of breast cancer cell aggressive phenotype with PBR expression, nuclear localization, and PBR-mediated cell proliferation and nuclear transport of cholesterol. **Cancer research**, v. 94, p. 322-327, 1999.

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

HASKARD, D. O.; CAVENDER, D.; BEATTY, P.; SPRINGER, T.; ZIFF, M. T. Lymphocyte adhesion to endothelial cell: mechanisms demonstrated by anti-LFA-1 monoclonal antibodies. **Journal of Immunology**, v. 137, p. 2901, 1986.

HAYASHI, F.; SMITH, K. D.; OZINSKY, A.; HAWN, T. R.; Yi, E. C.; GOODLETT, D. R.; ENG, J. K.; AKIRA, S.; UNDERHILL, D. M.; ADEREM, A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-Like Receptor 5. **Nature**, v. 410, p. 1099 - 1103, 2001.

HELMREICH, D. L.; CROUCH, M.; DORR, N. P.; PARFITT, D. B. Peripheral triiodothyronine (T3) levels during escapable and inescapable footshock. **Physiology & Behavior**, v. 87, p. 114-119, 2006.

HILDEBRAND, M. E.; McRORY, J. E.; SNUTCH, T. P.; STEA, A. Mammalian voltage-gated calcium channels are potently blocked by the pyrethroid insecticide allethrin. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 308, p. 805-813, 2004.

HIRABAYASHI, Y.; TANIUCHI, S.; KOBAYASHI, Y. A quantitative assay of oxidative metabolism by neutrophils in whole blood using flow cytometry. **Journal of immunology methods**, v.82, p. 253-259, 1985.

HUFF, N. C.; WRIGHT-HARDESTY, K. J.; HIGGINS, E. A.; MATUS-AMAT, P.; RUDY, J. W. Context pre-exposure obscures amygdala modulation of contextual-fear conditioning. **Learning and Memory**, v. 12, n. 5, p. 456-460, 2005

IRWIN, L. R.; BAINDRIDGE, L. C.; REID, C. A.; PIGGOT, T. A.; BROWN, H. G. Dermal eccrine cylindroma (turban tumour). **Brazilian Journal of Plastic Surgeon**, v. 43, p. 702-705, 1990.

IRWIN, S. Comprehensive observational assessment I: A systematic quantitative procedure for assessing the behavioral and physiological state of the mouse. **Psychopharmacology**, v. 13, p. 222-257, 1968.

ISHIGAMI, T. The influence of psychic acts on the progress of pulmonary tuberculosis. **American Review of Tuberculosis**, v. 2, p. 470-484, 1919.

- ITOI, K.; SUDA, T.; TOZAWA, F.; DOBASHI, I.; OHMORI, N.; SAKAI, Y.; ABE, K.; DEMURA, H. Microinjection of norepinephrine into the paraventricular nucleus of hypothalamus stimulates corticotropin- releasing factor gene expression in conscious rats. **Endocrinology**, v. 135, p. 2177-2182, 1994.
- JIANG, C. G.; MORROW-TESCH, J. L.; BELLER, D. I.; LEVY, E.; BLACK, P. H. Immunosuppression in mice induced by cold water stress. **Brain, Behaviour and immunity**, v. 4, p. 278 –291, 1990.
- JOANNE, L. F.; CHAN, J. Immunology of tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 93–129, 2001.
- JOHANNISSON, A.; GRO-NDAHL, G.; DEMMERS, S.; JENSEN-WAERN, M. Flow-cytometric studies on the phagocytic capacities of equine neutrophils. **Acta Veterinarian Scandinavian**, v. 36, p. 553–562, 1995.
- JOHNSON, E. O.; KAMILARES, T. C.; CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. **Neuroscience and Biobehavioral Review**, v. 16, p. 115-130, 1992.
- JOHNSTON, R. B. Enhancement of phagocytosis-associated oxidase metabolism as a manifestation of macrophage activation. **Lymphokines**, v. 3, p. 33-56, 1978.
- KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. Parte VII: Excitação, emoção e comportamento da homeostase. In: *Princípios de neurociências*. 4^a edição., p. 873-998. 2005.
- KARNOVSKY, M. L.; LAZDINS, J. K. The biochemical criteria for activated macrophages. **Journal of Immunology**, v. 121, p. 809-813, 1978.
- KASPROWICZ, D. J.; KOHM, A. P.; BERTON, M. T. Stimulation of the B cell receptor, CD86 (B7-2), and the beta 2 – adrenergic receptor intrinsically modulates the level of IgG1 and IgE produced per B cell. **Journal of Immunology**, v. 165, p. 680-690, 2000.
- KELLER, S. E.; WEISS, J. M.; SCHELEIFER, S. J.; MILLER, N. E.; STEIN, M. M. Stress-induced suppression of immunity in adrenalectomized rats. **Science**, v. 221, p. 1301-1304, 1983.
- KIM, J. J.; JUNG, M. W. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: A critical review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 30, p.188-202, 2006.
- KISS, A.; AGUILERA, G. Participation of α_1 -adrenergic receptors in the secretion of hypothalamic corticotropin-release hormone during stress. **Neuro-endocrinology**, v. 56, p. 153-160, 1992.

- KOFF, W. C.; DUNEGAN, M. A. Modulation of macrophage mediated tumoricidal activity by neuropeptides and neurohormones. **Journal of Immunology**, v. 135, p. 350-354, 1985.
- KOSTRZEWA, R. M.; JACOBOWICZ, D. M. Pharmacological actions of 6-hydroxydopamine. **Pharmacology Review**, v. 26, p. 199-288, 1974.
- KRONCKE, K. D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Inductible nitric oxide synthase in human disease. **Clinical and experimental immunology**, v. 113, p. 147-156, 1998.
- KUSNECOV, A. V.; GROTA, L. J.; SCHMIDT, S. G.; BONNEAU, R. H.; SHERIDAN, J. F.; GLASER, R.; MOYNIHAN, J. A. Decreased herpes simplex viral immunity and enhanced pathogenesis following stressor administration in mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 1, p. 129-137, 1992.
- KWIATKOWSKA, K.; SOBOTA, A. Signaling pathways in phagocytosis. **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 21, p. 422-431, 1999.
- LAWRENCE, D. A.; KIM, D. Central/peripheral nervous system and immune responses. **Toxicology**, v. 142, p. 189-201, 2000.
- LAZZARINI, C. A.; FLORIO, J. C.; LEMONICAB, I. P.; BERNARDI M. M. Effects of prenatal exposure to deltamethrin on forced swimming behavior, motor activity, and striatal dopamine levels in male and female rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 23, p. 665-673, 2001.
- LEFANT, M.; HAUMONT, J.; ZAVALA, F. In vivo immunomodulation activity of PK 11195, a structurally unrelated ligand for "peripheral" benzodiazepine binding site: I. Potentiation in mice of the humoral response to sheep red blood cells. **International Journal of immunopharmacology**, v. 8, p. 825-829, 1986.
- LEY, K.; AFFORS, K. E. Changes in macromolecular permeability by intravascular generation of oxygen-derived free radicals. **Microvascular Research**, v. 24, p. 25-33, 1982.
- LLINAS, R. R. Calcium in synaptic transmission. **Scientific American**, v. 247, n. 4, p. 56-65, 1982.
- LORTON, D.; LUBAHN, C.; KLEIN, N.; SCHALLER, J.; BELLINGER, D. L. Dual role for noradrenergic innervation of lymphoid tissue and arthritic joints in adjuvant-induced arthritis. **Brain Behavior and Immunity**, v. 85, p. 60-65, 1999.
- MA, S.; MORILAK, D. A. Chronic intermittent cold stress sensitizes the hypothalamic pituitary adrenal response to a novel acute stress by enhancing noradrenergic influence in the rat paraventricular nucleus. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 17, p. 761-769, 2005.

MADDEN, K. S. Catecholamines, sympathetic nerves, and immunity. In: ADER, R.; FELTEN, D.; CHOEN, N. (Ed.). **Psychoneuroimmunology**, 3. ed. San Diego, CA: Academic Press, 2001, p. 161–196.

MADSEN, C.; CLEASSON, M. H.; RÖPKE, C. Immunotoxicity of the pyrethroid insecticides deltamethrin and α -cypermethrin. **Toxicology**, v. 107, p. 219–227, 1996.

MARINO, F.; CATTANEO, S.; COSENTINO, M.; RASINI, E.; DI GARCIA, L.; FIETTA, A. M.; LECCHINI, S.; FRIGO, G. Diazepam stimulates migration and phagocytosis of human neutrophils: possible contribution of peripheral-type benzodiazepine receptors and intracellular calcium. **Pharmacology**, v. 63, p. 42–49, 2001.

MASSOCO, C. O. **Receptores benzodiazepínicos periféricos e a resposta imune inata de eqüinos : efeitos do midazolam**. 2003. 123 p. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 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, 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, p. 11–19, 2003.

MENZAGHI, F.; HEINRICHS, S. C.; PICH, E. M.; WEISS, F.; KOOB, G. F. The role of limbic and hypothalamic corticotropin-releasing factor in behavioral responses to stress. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 697, p. 142–154, 1993.

MCEWEN, B. S.; BIRON, C. A.; BRUNSON, K. W.; BULLOCH, K.; CHAMBERS, W. H.; DHABHAR, F. S.; GOLDFARB, R. H.; MILLER, A. H.; SPENCER R. L.; WEISS J. M. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural and immune interactions. **Brain Research Reviews**, v. 23, n. 1–2, p. 79–133, 1997.

MCPHAIL, L. C.; SYNDERMAN, R. Activation of the respiratory burst enzyme in human polymorphonuclear leukocytes by chemoattractants and other soluble stimuli: Evidence that the same oxidase is activated by different transductional mechanisms. **Journal of Clinical Investigation**, v. 72, p. 192–200, 1983.

MILLER, A. H. Neuroendocrine and immune system interactions in stress and depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 21, p. 443–463, 1998.

MIYAMOTO, I.; KANEKO, H.; TSUJI, R.; OKUNO, Y. Pyrethroids, nerve poisons: how their risks to human health should be assessed. **Toxicology Letters**, v. 82/83, p. 933–940, 1995.

MOYNAHAN, J. A.; BRENNER, G. J.; COCKE, R.; KARP, J. D.; BRENEMAM, S. M.; DAPP, J. M.; ADER, R.; COHEN, N.; GROTA, L. J.; FELTEN, S. Y. Stress-Induced modulation of immune function in mice. In: GLASSER, R.; KIECOLT-GLASSER J. K. **Handbook of human stress and immunity**. San Diego: Academic Press, 1994. p. 1-22.

MORILAK, D. A.; BARRERA, G.; ECHEVARRIA, D. J.; GARCIA, A. S.; HERNANDEZ, A.; MA, S.; PETRE, C. O. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatric**, v. 29, p. 1214-1224, 2005.

MOYNIHAN, J. A.; COHEN, N. Stress and immunity. In: SCHNEIDERMAN, N.; BAUM, A. (Eds) **Stress and disease process: perspectives in behavioral medicine**. New York: Lawrence Erlbaum Assoc. 1992. p. 27-53.

MULLER-WIELAND, D.; BEHNKE, B.; DIEDERICHSEN, D.; KRONE, W. Inhibition of fatty acid synthesis by stimulation of alpha- and beta- adrenergic receptors in human mononuclear leukocytes. **Hormone and metabolic research**, v. 26, n. 4, p. 169-172, 1994.

MURAMATSU, S. In: COOPER, E.L.; NISBET-BROWN, E. (Ed.), **Developmental immunology**, Oxford: Oxford University Press, 1993. p. 198-216.

NARAHASHI, T. Mechanism of action of pyrethroids on sodium and calcium channel gating. In: FORD, M. G.; LUNT, G. G.; REAY, R. C.; USHERWOOD, P. N. R. **Neuropharmacology and pesticide action**. 1. ed. England: Ellis Horwood, 1986. p. 55-57.

NATHAN, C.; COHN, Z. Role of oxygen-dependent mechanisms in antibody-induced lysis of tumor cells by activated macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 152, p. 198-208, 1980.

NATHAN, C. F.; KARNOVSKY, M. L.; DAVIS, J. R. Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 133, p. 1356-1376, 1971.

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

NEGULYAEV, J.; VEDERNIKOVA, Z. Sodium selective channels in membrane of rat macrophages. **The Journal of Membrane Biology**, v. 138, p. 37-45, 1994.

NORTH, R. J. The concept of activated macrophage. **Journal of Immunology**, v. 121, p. 806-809, 1978.

OKIMURA, T.; OGAWA, M.; YAMAUCHI, T. Stress and immune responses. III. effect of restraint stress on delayed type hypersensitivity (DTH) response, natural killer (NK) activity and phagocytosis in mice. **Japanese Journal Pharmacology**, v. 41, p. 229-235, 1986.

OKIMURA, T.; OGAWA, M.; YAMAUCHI, T.; SASAKI, Y. Stress and immune responses IV. Adrenal involvement of antibody responses in restraint-stressed mice. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 41, p. 237–245, 1986.

OTTAVIANI, E.; CASELGRANDI, E.; PETRAGLIA, F.; FRANCESCHI, C. Stress response in the freshwater snail *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata): interaction between CRH, ACTH, and biogenic amines. **General and comparative endocrinology**, v. 87, p. 354–360, 1992.

OTTAVIANI, E.; FRANCESCHI, C. The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common evolution of immune and neuroendocrine systems. **Science**, v.18, n. 4, p. 169–174, 1997.

OTTAVIANI, E.; FRANCESCHI, C. The neuroimmunology of stress from invertebrates to man. **Progress in Neurobiology**, v. 48, p. 421–440, 1996.

OTTAVIANI, E.; PETRAGLIA, F.; MONTAGNANI, G.; COSSARIZZA, A.; MONTI, D.; FRANCESCHI, C. Presence of ACTH and β -endorphin immunoreactive molecules in the freshwater snail *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata) and their possible role in phagocytosis. **Regulatory Peptides**, v. 27, p. 1–9, 1990.

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

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

PAPADOPOULOS, V.; BOURJRAD, N.; IKONOMOVIC, M. D.; FERRARA, P.; VIDIC, B. Topography of the Leydig cell mitochondrial peripheral – type benzodiazepine receptor. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 104, p. 5–9, 1994.

PAPADOPOULOS, V.; GUARNERI, P.; KRUEGER, K. E.; GUIDOTTI, A.; COSTA, E. Pregnenolone biosynthesis in C6 glioma cell mitochondria: regulation of diazepam binding inhibitor mitochondrial receptor. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 5118–5122, 1992.

PARDON, M. C.; MA, S.; MORILAK, D. A. Chronic cold stress sensitizes brain noradrenergic reactivity and facilitates the HPA stress response in Wistar Kyoto rats. **Brain Research**, v. 971, p. 55–65, 2003.

PARKER, L. C.; WHYTE, M. K. B.; DOWER, S. K.; SABROE, I. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, p. 886–892, 2005.

PERSOONS, J. A.; BERKENBOSCH, F.; SCHORNAGEL, K.; THEPEN, T.; KRAAL, G. Increased specific IgE production in lungs after the induction of acute stress in rats. **The Journal of Allergy and Clinical immunology**, v. 95, p. 765-770, 1995.

PHILIBERT, D. RU 38486: An original multifaceted anti-hormone *in vivo*. In: AGARWAL M. K. (Ed.). **Adrenal steroid antagonism**. New York: Walter de Gruyter, 1984, p. 77-101.

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, p. 211-226, 1981.

PICLO, M. J. Methods of sympathetic denervation and alteration. **Journal of Autonomic Nervous System**, v. 62, p. 111-125, 1997

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

PURCELL, E. S.; GATTONE, V. H. Immune system of the spontaneously hypertensive rat. I. Sympathetic innervation. **Experimental Neurology**, v. 117, p. 44-50, 1992.

PYTHON, C. P.; ROSSIER, M. F.; VALLOTON, M. B.; CAPPONI, A. M. Peripheral – type benzodiazepine inhibit calcium channels and aldosterone production in adrenal glomerulosa cells. **Endocrinology**, v. 132, p. 1489-1496, 1993.

QUINTEIRO-FILHO, W. M.; RIGHI, D. A.; PALERMO-NETO, J. Efeitos da administração de cialotrina (piretróide tipo II) na evolução do tumor Ascítico de ehrlich em camundongos machos. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 18, suplemento, outubro, p. 109, 2005

RABIN, B. S.; CUNNICK, J. E.; LYSLE, D. T. Stress-induced alteration of immune function. **Progress in NeuroEndocrine Immunology**, v. 3, p. 116-124, 1990.

RABINOVITCH, M.; DESTEFANO, M. J. Macrophage spreading in vitro. I. Inducers of spreading. **Experimental Cellular Research**, v. 77, p. 323-334, 1973.

RAIDAL, S. L.; BAILEY, G. D.; LOVE, D. N. Flow cytometric determination of oxidative burst activity of equine peripheral blood and bronchoalveolar lavage-derived leukocytes. **Veterinary Journal**, v. 156, p. 117-126, 1998.

RAPPOLEE, D. A.; WERB, Z. mRNA phenotyping for studying gene expression in small numbers of cells: platelet-derived growth factor and other growth factor in wound-derived macrophages. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 2, n. 1, p. 3-10, 1990.

RAY, D. E. Pesticides derivated from plants and other organism. In: **Handbook of pesticide toxicology**. San Diego, Califórnia, USA.; Academic Press, Inc., v. 2, p. 585-595, 1991.

RIGHI, D. A. **Efeitos da administração da cialotrina (piretróide tipo II) sobre o comportamento e atividade de macrófagos de ratos**. 2003. 135 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

RIGHI, D. A.; PALERMO NETO, J. Effects of type II pyrethroid cyhalothrin on peritoneal macrophage activity in rats. **Toxicology**, v. 212, p. 98-106. 2005.

RIGHI, D. A.; PALERMO NETO, J. Behavioral effects of type II pyrethroid cyhalothrin in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 191, p. 167-176. 2003.

RIGHI, D. A.; PINHEIRO, S. R.; GUERRA, J. L.; PALERMO NETO, J. Effects of diazepam on Mycobacterium bovis – induced infection in hamster. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, v. 32, p. 1145–1153, 1999.

RIVIER, C.; BROWNSTEIN, M.; SPIESS, J.; RIVIER, J.; VALE, W. In vivo corticotropin-releasing factor-induced secretion of adrenocorticotropin, beta-endorphin, and corticosterone. **Endocrinology**, v. 110, p. 272-278, 1982.

RODRIGUES-GALAN, M. C.; CORREA, S. G.; CEJAS, H.; SOTOMAYOR, C. E. Impaired activity of phagocytic cells in candida albicans infection after exposure to chronic varied stress. **Neuroimmunomodulation**, v. 4, p. 193-202, 2001.

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

ROSENWASSER, L.; DINARELLO, C. A. Ability of human leukocytic pyrogen to enhance phytohemagglutinin induce murine thymocyte proliferation. **Cellular immunology**, v. 63, p. 134-142, 1981.

ROTHER, G.; VALET, G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 20 ,70 dichlorofluorescein. **The Journal of Leukocytes Biology**, v. 47, p. 440–448, 1990.

SAGAR, S. M.; SHARP, F. R.; CURRAN, T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. **Science**, v. 240, p. 1328-1331, 1988.

SALGADO, V. L.; NARAHASHI, T. Immobilization of sodium channel gating charge in crayfish giant axons by the insecticide fenvalerate. **Molecular Pharmacology**, v. 53, p. 626-34, 1993.

SAKLATVALA, J. Glucocorticoids: do we know how they work? **Arthritis Research**, v. 4, n. 3, p. 146-50, 2002.

SANDERS, V. M.; KASPROWICZ, D. J.; KOHM, A. P. Neurotransmitter receptors in lymphocytes and other lymphoid cells. In: ADER, R.; FELTEN, D.; CHOEN, N. (Ed.). **Psychoneuroimmunology**, 3. ed. San Diego, CA: Academic Press, 2001. p. 161–196.

SANNOMIYA, P.; ANTEGHINI, E. S. O.; VIANNA, A. P.; GARCIA-LEME, J. Involvement of lymphocytes in non-immune inflammation: dual effect of glucocorticoids. **Agents and Actions**, v. 16, p. 552-557, 1985.

SANTONI, G.; CANTALAMESSA, F.; SPREGHINI, E.; SAGRETTI, O.; STAFFFOLANI, M.; PICCOLI, M. Alterations of T cell distribution and functions in prenatally cypermethrin-exposed rats; possible involvement of catecholamines. **Toxicology**, v. 138, p. 175-187, 1999.

SASADA, M.; PABST, M. J.; JOHNSTON, R. B. Activation of mouse peritoneal macrophage by lipopolysaccharide alters the kinetic parameters of the superoxide producing NADPH oxidase. **Journal of Biological Chemical**, v. 258, p. 9631-9635, 1983.

SCHLUMPF, M.; PARMAR, R.; RAMSEIER, H. R.; LICHTENSTEIGER, W. Prenatal diazepam induced immuno suppression: possible involvement of peripheral benzodiazepine site. **Developmental pharmacology and therapeutics**, v. 15, p. 178-185, 1990.

SCHWARTZ, M. J.; CHIANG, S.; MULLER, N.; ACKNHEIL, M. T-helper-1 and T-helper-2 responses in psychiatric disorders. **Brain, Behaviour and Immunity**, v. 15, p. 340-370, 2001.

SCOTT, L. V.; DINAN, T. G. Vassopressin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: implications for the pathophysiology of depression. **Life science**, v. 62, p. 1985-1998, 1998.

SHAFFER, T. J.; MEYER, D. A. Effects of pyrethroids on voltage-sensitive calcium channels: a critical evaluation of strengths, weaknesses, data needs, and relationship to assessment of cumulative neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 196, p. 303-318, 2004.

SIGOLA, L. B.; ZINYAMA, R. B. Adrebaline inhibits macrophage nitric oxide production through β_1 and β_2 adrenergic receptors. **Immunology**, v. 100, p. 359-363, 2000.

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

- SMITH, E. M.; BLALOCK, J. E. Human lymphocyte production of corticotropin and endorphin - like substances: association with leukocyte interferon. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. USA**, v. 78, p. 7530–7534, 1981.
- SOBRIAN, S. K.; VAUGHN, V. T.; ASHE, W. K.; MARKOVIC, B.; DJURIC, V.; JANKOVIC, B. D. Gestacional exposure to loud noise alters the development and postnatal responsiveness of humoral and cellular components of the immune system in offspring. **Environmental Research**, v. 73, p. 227-241, 1997.
- SODERLUND, D. M.; CLARK, J. M.; SHEETS, L. P.; MULLIN, L. S.; PICCIRILLO, V. J.; SARGENT, D.; STEVENS, J. T.; WEINER, M. L. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v. 17, p. 3-59, 2002.
- SOLOMON, G. F. Psychoneuroimmunology: Interaction between central nervous system and immune system. **Journal of neuroscience Research**, v. 18, p. 1-9, 1987.
- SPINOSA, H. S.; SILVA, Y. M. A.; NICOLAU, A. A.; BERNARDI, M. M.; LUCISANO, A. Possible anxiogenic effects of fenvalerate, a type II pyrethroid pesticide, in rats. **Physiologist & Behaviour**, v. 67, n. 4, p. 611-615, 1999.
- SRIDARAN, R.; PHILIP, G. H.; LI, H.; CULTY, M.; LIU, Z.; STOCCO, D. M.; PAPADOPOULOS, V. GnRH agonist treatment decreases progesterone synthesis, luteal peripheral benzodiazepine receptor mRNA, ligand and steroidogenic acute regulatory protein expression during pregnancy. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 22, p. 45–54, 1999.
- STANKEVICIUS, D. **Ansiedade induzida pela picrotoxina: reflexos comportamentais, bioquímicos e sobre a atividade de macrófagos peritoneais**. 2004. 128 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- TAKEMURA, R.; ZENA, W. Secretory products of macrophages and their physiological functions. **The American journal of physiology**, v. 246, p. 1-9, 1984.
- TECOMA, E.; HUEY, L. Psychic distress and the immune response. **Life Science**, v. 36, p. 1799-1782, 1985.
- UNDEGER, U.; BASARAN, N. Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage. **Archive of Toxicology**, v. 79, p. 169-176, 2005.
- VOCCIA, I.; BLAKELY, B.; BROUSSEAU, P.; FORUNIER, M. Immunotoxicity of pesticides: a review. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, p. 119-132, 1999.
- VEIRA, M. Phagosome maturation: aging gracefully. **The Biochemical journal**, v. 366, p. 689-704, 2002.

VERHOF, J.; WALDVOGEL, F. A. Testing phagocytic cell function. **European Journal of Clinical Microbiology**, v. 4, p. 379-391, 1985.

VERCHOYLE, R. D.; ALDRIDGE, W. N. Strusturactivity relationship of some pyrethroid in rats. **Arch. Toxic.**, v. 45, p. 325-29, 1980.

WEI, X.; CHARLES, L. G.; SMITH, A. Altered immune response in mice lacking inducible nitric oxide synthetase. **Nature**, v. 375, p. 408, 1995.

WERB, Z.; BANDA, M. J.; JONES, P. A. Degradation of connective tissue matrices by macrophages. I. Proteolysis of elastin, glycoproteins, and collagen by proteinases isolated from macrophages culture. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 152, p. 1340-1357, 1980.

WERB, Z.; CHIN, J. R. Apoprotein E is synthesized and secreted by resident and thioglycolate-elicited macrophages but not by pyran copolymer or bacillus Calmette Guerin-activated macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 243, p. 1240-1253, 1981.

WERB, Z.; FOLEY, R.; MUNCK, A. Interaction of glucocorticoids with macrophages. Identification of glucocorticoid receptors on monocytes and macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 154, p. 1684, 1978.

WINFRED, M.; BROWN, D. M.; KREYLING, W. G.; STONE, V. Ultrafine particles cause cytoskeletal dysfunctions in macrophages: role of intracellular calcium. **Particle and Fiber Toxicology**, v. 2, n. 7, p.1-12, 2005.

WU, Y.; SHI, N.; WANG, S.; LI, T.; CHEN, J.; ZHOU, L.; CHEN, L.; DONG, J. Effects of deltamethrin on cell survival rate and intracellular free Ca^{2+} concentration in primary cultured astrocytes of rat. **Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi**, v. 21, n. 3, p. 194-196, 2003.

YANG, E. V.; GLASSER, R. Stress-induced immunomodulation and the implications for health. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 315-324, 2002.

ZAVALA, F.; LENFANT, M. Peripheral benzodiazepine enhance the respiratory burst of macrophage-like P388D1 cells stimulated by arachidonic acid. **International Immunopharmacology.**, v. 9, p. 269-274, 1987.

ZAVALA, F.; MASSON, A.; BRYSS, L.; BAETSELIER, P.; DESCAMPS-CATSCHA, B. A monoclonal antibody against peripheral benzodiazepine receptor activities the human neutrophil NADPH oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 176, n. 3, p. 1577-1563, 1991.

ZAVALA, F.; TAUPIN, V.; DESCAMPS-LATSHA, B. In vivo treatment with benzodiazepines inhibits murine phagocyte oxidative metabolism and production of

interleukin 1, tumor necrosis factor and interleukin 6. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 255, p. 442–450, 1990.

ZWILLING, B. S.; BROWN, D.; FENG, N.; SHERIDAN, J.; PEARL, D. The effect of adrenalectomy on the restraint stress induced suppression of MHC class II expression by murine peritoneal macrophages. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 7, p. 29-33, 1993.

ZWILLING, B. S.; DINKINS, M.; CHRISTNER, R.; FARIS, M.; GRIFFIN, A.; HILBURGER, M.; MCPEEK, M.; PEARL, D. Restraint stress induced suppression of major histocompatibility class I expression by murine peritoneal macrophages. **Journal of Neuroimmunology**, v. 29, p. 125-130, 1990.

ZWILLING, B. S.; LAFUSE, W. P.; BROWN, D.; PEARL, D. Characterization of ACTH mediated suppression of MHC class II expression by murine macrophages. **Journal of Neuroimmunology**, v. 39, p. 133-138, 1992.