EDUARDO KENJI HAMASATO
Participação glutamatérgica nos efeitos induzidos pela anfetamina na resposta inflamatória alérgica pulmonar de camundongos
São Paulo
2011

EDUARDO KENJI HAMASATO

Participação glutamatérgica nos efeitos induzidos pela anfetamina na resposta inflamatória alérgica pulmonar de camundongos

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

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. João Palermo-Neto

São Paulo

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

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'APICE FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA USP

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2484

FMVZ

Hamasato, Eduardo Kenji

Participação glutamatérgica nos efeitos induzidos pela anfetamina na resposta inflamatória alérgica pulmonar de camundongos / Eduardo Kenji Hamasato. -- 2011.

102 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada. Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. João Palermo-Neto.

1. Neuroimunomodulação. 2. Anfetamina. 3. Inflamação alérgica pulmonar. 3. Corticosterona. 4. MK-801. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO





FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Participação glutamatérgica e encefalinérgica nos efeitos induzidos pela anfetamina na resposta alérgica pulmonar de camundongos", protocolado sob o nº1633/2009, utilizando 126 (cento e vinte e seis) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Palermo Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 20/05/09.

We certify that the Research "Glutamatergic and enkephalinergic participation in effects induced by amphetamine on the mice's pulmonary allergic inflammatory response", utilizing 126 (one hundred twenty six) mice, protocol number 1633/2009, under the Prof. Dr. João Palermo Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/20/09.

São Paulo, 21 de maio de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni Presidente da Comissão de Bioética FMVZ/USP



FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: HAMASATO, Eduardo Kenji	
Título: Participação glutamatérgica nos resposta inflamatória alérgica pulmona	•
	Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências
Data://	
Banca Ex	xaminadora:
Prof.Dr.	_Instituição
Assinatura	_Julgamento
Prof.Dr	_Instituição
Assinatura	_Julgamento
Prof.Dr.	_Instituição
Assinatura	_Julgamento

DEDICATÓRIAS

Dedico esta dissertação

Aos meus pais Takashi e Luiza
Por terem colocado a minha educação como prioridade
Por terem me apoiado em todos os momentos
Pelo amor, carinho e incentivo

A minha irmã Gabriela
Pelo apoio constante e pela amizade

Amo vocês!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Professor Dr. João Palermo-Neto, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa, pela orientação neste trabalho e pelos ensinamentos.

Um exemplo de dedicação ao ensino e à ciência.

Muito Obrigado Dr. João!

AGRADECIMENTOS

- À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).
- Ao Departamento de Patologia e Toxicologia (VPT) da FMVZ-USP, local onde este trabalho foi realizado.
 - Ao Programa de Patologia Experimental e Comparada, programa pelo qual este trabalho foi desenvolvido.
 - Aos professores do Departamento de Patologia (FMVZ-USP).
- Ao Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima (ICB-USP) por disponibilizar o seu laboratório para os experimentos de reatividade das vias aéreas.
- Ao Prof. Dr. Amílcar Sabino Damazo (UFMT) pela ajuda no experimento de histologia.
- A Profa. Dra. Cristina de Oliveira Massoco (FMVZ USP) pela ajuda nas discussões do presente trabalho.
 - A pesquisadora Ana Paula Ligeira de Oliveira pelo apoio em todos os momentos da realização dessa dissertação.
 - A doutoranda Viviane Ferraz de Paula pelo apoio no início da pós-graduação.
- Aos pesquisadores Adriana, Alison, Ana Paula, Daniel, Milena, Viviane, Wanderley pela ajuda nos experimentos, conselhos e discussões do presente trabalho.
 - Aos funcionários do Biotério (VPT-FMVZ): Cláudia, Idalina, Luciana, Rosiris, Nelson, Mauro pela dedicação e atenção diária aos alunos e aos animais.
- Aos funcionários e ex-funcionários do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia (VPT-FMVZ-USP): Priscila, Magali, Ricardo, Herculano e Wagner pela ajuda e atenção presente nos experimentos.
 - As secretárias do Departamento de Patologia VPT: Adriana, Cristina e Milena.
 - As secretárias da pós-graduação FMVZ: Cláudia e Daura.
- A todos os funcionários da biblioteca da FMVZ-USP, em especial para Solange, Helena e Elza.
 - Ao Rodrigo Vieira (secretário do Dr. João) pela amizade e por toda a ajuda prestada.
 - A todos os colegas da pós-graduação que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho.
- A todo o Grupo de Neuroimunomodulação pelo apoio, amizade e crescimento científico proporcionado.
 - A todos que contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho.



RESUMO

HAMASATO, E. K. Participação glutamatérgica nos efeitos induzidos pela anfetamina na resposta inflamatória alérgica pulmonar de camundongos. [Glutamatergic involvement in amphetamine-induced effects on pulmonary allergic inflammatory response in mice]. 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a participação do sistema glutamatérgico nos efeitos induzidos pela anfetamina em camundongos sensibilizados e desafiados com ovalbumina, através do tratamento prévio com MK-801, um antagonista de receptores glutamatérgicos NMDA. Em relação aos animais tratados apenas com anfetamina, observamos que o tratamento prévio com MK-801: 1) reverteu a diminuição no número de leucócitos totais bem como o número de eosinófilos e neutrófilos no lavado broncoalveolar (LBA); 2) reverteu a diminuição da porcentagem de expressão das moléculas L-selectina e ICAM-1 em granulócitos do LBA; 3) reverteu a diminuição das citocinas IL-10 e IL-13 no sobrenadante do LBA; 4) reverteu a diminuição na contração da traquéia; 5) reverteu a desgranulação de mastócitos pulmonares; 6) não alterou a produção de IgE total e IgE-OVA; 7) não reduziu os níveis de corticosterona plasmáticos. Tomados em seu conjunto, quer nos parecer que os efeitos induzidos pela anfetamina implicam na ativação do sistema glutamatérgico via receptores NMDA. Possivelmente, as diferenças dos efeitos do MK-801, da anfetamina ou a combinação de fármacos se devam a uma ativação (modulação) diferenciada sobre o eixo hipotálamo pituitária adrenal (HPA) e/ou sistema nervoso autônomo simpático (SNAS) o que poderia explicar os efeitos opostos observados na resposta inflamatória alérgica pulmonar camundongos.

Palavras-chave: Neuroimunomodulação. Anfetamina. Inflamação alérgica pulmonar. Corticosterona. MK-801.

ABSTRACT

HAMASATO, E. K. Glutamatergic involvement in amphetamine-induced effects on pulmonary allergic inflammatory response in mice. [Participação glutamatérgica nos efeitos induzidos pela anfetamina na resposta inflamatória alérgica pulmonar de camundongos]. 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The aim of this study was to evaluate the involvement of the glutamatergic system in the effects induced by amphetamine in mice OVA-sensitized and challenged by the pretreatment with MK-801, an NMDA glutamate receptor antagonist. In relation to animals treated only with amphetamine we found that pretreatment with MK-801: 1) reverted the decrease in the total leukocytes and in the total number of eosinophils and neutrophils within the bronchoalveolar lavage fluid (BAL) 2) reverted the decrease in the percentage of expression of adhesion molecules L-selectin and ICAM-1 in BAL granulocytes, 3) reverted the decrease in IL-10 and IL-13 in BAL supernatant and 4) reverted the decrease in methacoline-induced tracheal contraction; 5) reverted the degranulation of mast cells in the lungs; 6) did not alter the production of total IgE and IgE-OVA, 7) did not decrease the plasma levels of corticosterone. Taken together, it seems feasible to suggest that the effects induced by amphetamine requires the participation of the glutamatergic system via NMDA receptors. Possibly, differences in MK-801, amphetamine or MK-801 + amphetamine effects on hypothalamic pituitary adrenal axis (HPA) and/or sympathetic autonomic nervous system (SNAS) might explain the opposite effects now observed for these drugs given alone or in combination in the pulmonary allergic inflammatory response in mice.

Keyword: Neuroimmunomodulation. Amphetamine. Allergic lung inflammation. Corticosterone. MK-801.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	- Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre a distribuição de células no LBA, sangue periférico e medula óssea de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801	48
Tabela 2 -	Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre a contagem diferencial de leucócitos no LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801	50
Tabela 3 -	Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre a desgranulação de mastócitos de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801	52
Tabela 4 -	Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre a quantificação da produção de IFN-γ, IL-5, IL-13 e IL-10 no sobrenadante do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801	54
Tabela 5 -	Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre os níveis de IgE total e IgE OVA-específica no soro de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801	57
Tabela 6 -	Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre os níveis de corticosterona no plasma de camundongos após o tratamento prévio com MK-801	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Protocolo de indução da inflamação alérgica pulmonar em camundongos. Onde: Dia 0: imunização, Dia 7: reforço e Dia 13 e Dia 14 desafio por nebulização de OVA pela M(manhã) e T (tarde)	40
Figura 2 -	Formação do grupos experimentais. Onde: Grupo S - animal alérgico tratado com NaCl; Grupo A – animal alérgico tratado com anfetamina; Grupo MKS – animal alérgico pré-tratado com MK-801 e tratado com NaCl e Grupo MKA – animal alérgico pré-tratado com MK-801 e tratado com anfetamina. ANF: anfetamina; OVA: nebulização durante 20 minutos	41
Figura 3 -	Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre o número de células totais do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801. Onde, ⁽¹⁾ p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo B, ⁽²⁾ p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo S, ⁽³⁾ p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo MKS. O significado dos grupos foi colocado na legenda da tabela 1. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 6 animais por grupo	48
Figura 4 -	Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre o número de células totais da medula óssea de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801. Onde, ⁽¹⁾ p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo B, ⁽²⁾ p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo S. O significado dos grupos foi colocado na legenda da tabela 1. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 6 animais por grupo	49
Figura 5 -	Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre o número de células totais do sangue periférico de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801. Onde, ⁽¹⁾ p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo B. O significado dos grupos foi colocado na legenda da tabela 1. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 6 animais por grupo	49
Figura 6 -	Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre a contagem diferencial de leucócitos no LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após tratamento prévio com MK-801. Onde, ⁽¹⁾ p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo B, ⁽²⁾ p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo S, ⁽³⁾ p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo MKS. O significado dos grupos foi colocado na legenda da tabela 2. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 6 animais por grupo	50

Figura 7 -	Análise dos mastócitos no tecido pulmonar. Mastócitos no tecido pulmonar evidenciando grânulos metacromáticos no citoplasma. Animais do grupo B (Figura 7A) evidenciando mastócitos intactos. No grupo S (Figura 7B), observam-se vários mastócitos desgranulados, evidenciados pelos grânulos metacromáticos dispersos na matriz extracelular e leucócitos. Já os grupos A (figura 7C) e MKS (Figura7D) apresentam redução da desgranulação. Enquanto que o grupo MKA (Figura 7E) apresentam vários mastócitos desgranulados. Coloração: azul de toluidina. Barra: 5 μm	52
Figura 8 -	Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre a quantificação da produção de IFN-γ no sobrenadante do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801. O significado dos grupos foi colocado na legenda da tabela 4. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 5 animais por grupo	54
Figura 9 -	Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre a quantificação da produção de IL-5 no sobrenadante do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801. Onde, ⁽¹⁾ p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo B, ⁽²⁾ p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo S e ⁽³⁾ p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo MKS. O significado dos grupos foi colocado na legenda da tabela 4. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 5 animais por grupo	55
Figura 10	-Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre a quantificação da produção de IL-13 no sobrenadante do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801. Onde, (1)p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo B, (2)p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo S e (3)p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo MKS. O significado dos grupos foi colocado na legenda da tabela 4. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 5 animais por grupo	55
Figura 11	-Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre a quantificação da produção de IL-10 no sobrenadante do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801. Onde, (1)p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo B, (2)p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo S e (3)p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo MKS. O significado dos grupos foi colocado na legenda da tabela 4. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 5 animais por grupo	56
Figura 12	-Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre os níveis de IgE total no soro de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801. Onde, ⁽¹⁾ p<0,05 em relação ao grupo B. O significado dos grupos foi colocado na legenda da tabela 5. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 5 animais por grupo	58

Figura 13-	Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre os níveis de IgE-OVA específica no soro de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801. Onde, ⁽¹⁾ p<0,05 em relação ao grupo B. O significado dos grupos foi colocado na legenda da tabela 5. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 5 animais por grupo	58
Figura 14 -	Porcentagem de células mononucleares (A) e granulócitos (B) obtidos do LBA decamundongos OVA sensibilizados e desafiados após tratamento prévio com MK-801 e tratamento com anfetamina. Os valores estão representados em Dot plot (C). Onde, ⁽¹⁾ p<0,05 em relação ao grupo B, ⁽²⁾ p<0,05 em relação ao grupo S, ⁽³⁾ p<0,05 em relação ao grupo MKS. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 8 animais por grupo	60
-	-Porcentagem de expressão de L-selectina (B) em células mononucleares do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após tratamento prévio com MK-801 e tratamento com anfetamina. Os valores estão representados em histogramas (A) . Onde, ⁽¹⁾ p<0,05 em relação ao grupo S. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 8 animais por grupo.	61
Figura 16 -	Porcentagem de expressão de L-selectina (B) em granulócitos do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após tratamento prévio com MK-801 e tratamento com anfetamina. Os valores estão representados em histogramas (A). Onde, ⁽¹⁾ p<0,05 em relação ao grupo B, ⁽²⁾ p<0,05 em relação ao grupo B, ⁽²⁾ p<0,05 em relação ao grupo MKS. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 8 animais por grupo	63
Figura 17 -	Porcentagem de expressão de ICAM-1 (A) e VCAM-1 (B) em células mononucleares do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após tratamento prévio com MK-801 e tratamento com anfetamina. Os valores estão representados em Dot plot (C). Onde, ⁽¹⁾ p<0,05 em relação ao grupo B, ⁽²⁾ p<0,05 em relação ao grupo S, ⁽³⁾ p<0,05 em relação ao grupo MKS. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 8 animais por grupo	64
Figura 18 -	Porcentagem de expressão de ICAM-1 (A) e VCAM-1 (B) em granulócitos do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após tratamento prévio com MK-801 e tratamento com anfetamina. Os valores estão representado em Dot plot (C). Onde, ⁽¹⁾ p<0,05 em relação ao grupo B, ⁽²⁾ p<0,05 em relação ao grupo S, ⁽³⁾ p<0,05 em relação ao grupo MKS. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 8 animais por grupo	66
Figura 19 -	Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre a reatividade a metacolina das vias aéreas in vitro de camundongos OVA sensibilizados e	

:	desafiados. Onde, p<0,05 em relação ao grupo B, °p<0,05 em relação ao grupo S. Onde, B: animal basal, S: animal alérgico tratado com salina, A: animal alérgico tratado com anfetamina. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 6 animais por grupo	67
	Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre a reatividade a metacolina das vias aéreas <i>in vitro</i> de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801. Onde, *p<0,05 em relação ao grupo S, ^θ p<0,05 em relação ao grupo A. Onde, S: animal alérgico tratado com salina, A: animal alérgico tratado com anfetamina, MKS: animal alérgico tratado com salina e MKA: animal alérgico tratado com anfetamina. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 6 animais por grupo	68
	-Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre os níveis de corticosterona no plasma de camundongos após o tratamento prévio com MK-801. Onde, ⁽¹⁾ p<0,05 em relação ao grupo B, ⁽²⁾ p<0,05 em relação ao grupo S, ⁽³⁾ p<0,05 em relação ao grupo MKS. O significado dos grupos foi colocado na legenda da Tabela 6. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 10 animais por grupo	70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	NEUROIMUNOMODULAÇÃO	20
2.2	INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR	25
2.3	ANFETAMINA	31
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVO GERAL	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	ANIMAIS	38
4.2	FÁRMACOS	38
4.3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	39
4.3.1	Modelo de Inflamação Alérgica Pulmonar em Camundongos	39
4.3.2	Formação dos Grupos Experimentais	40
4.3.3	Contagem de Leucócitos do Sangue Periférico	41
4.3.4	Contagem de Leucócitos do LBA	42
4.3.5	Contagem da Celularidade da Medula Óssea	42
4.3.6	Fixação, Processamento e Inclusão do Tecido Pulmonar para Avaliação da Desgranulação de Mastócitos	43
4.3.7	Quantificação de Citocinas e Imunoglobulinas	43
4.3.8	Quantificação da Expressão das Moléculas de Adesão L-Selectina, Icam-1 e Vcam-1 em Células do LBA	44
4.3.9	Avaliação da Reatividade das Vias Aéreas <i>In Vitro</i> através da Traquéia Isolada	45
4.3.10	Dosagem dos Níveis de Corticosterona Plasmáticos	45
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS	47
5.1	EXPERIMENTO 1 - AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO MK-801 NOS EFEITOS INDUZIDOS PELA ANFETAMINA SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR NO LBA, SANGUE PERIFÉRICO E MEDULA ÓSSEA	47
5.2	EXPERIMENTO 2 - AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO MK-801 NOS EFEITOS INDUZIDOS PELA ANFETAMINA SOBRE A	

	DESGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS EM BRÔNQUIO INTRAPULMONAR	51
5.3	EXPERIMENTO 3 - AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO MK-801 NOS EFEITOS INDUZIDOS PELA ANFETAMINA SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-5, IL-10, IL-13 E INF-γ NO SOBRENADANTE DO LBA	53
5.4	EXPERIMENTO 4 - AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO MK-801 NOS EFEITOS INDUZIDOS PELA ANFETAMINA SOBRE OS NÍVEIS DAS IMUNOGLOBULINAS IgE-TOTAL e IgE-OVA ESPECÍFICA NO SORO	56
5.5	EXPERIMENTO 5 - AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO MK-801 NOS EFEITOS INDUZIDOS PELA ANFETAMINA SOBRE A EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO L-SELECTINA, VCAM-1 E ICAM-1 EM CÉLULAS DO LBA	59
5.6	EXPERIMENTO 6 - AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO MK-801 NOS EFEITOS INDUZIDOS PELA ANFETAMINA SOBRE A REATIVIDADE DAS VIAS AÉREAS <i>IN VITRO</i>	66
5.7	EXPERIMENTO 7 – AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE MK-801 E ANFETAMINA SOBRE OS NÍVEIS DE CORTICOSTERONA	68
6	DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÕES	84
7.1	CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	84
7.2	CONCLUSÕES GERAIS	85
	REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO¹

Neuroimunomodulação ou Psiconeuroimunologia é o ramo da ciência que estuda o relacionamento direto e bidirecional do Sistema Neuroendócrino com o Sistema Imune. Estudos "in vivo" e "in vitro" têm mostrado que estados emocionais, como o estresse e a ansiedade, bem como substâncias químicas de ação central, interferem na atividade do sistema imunológico de animais de laboratório.

Nas últimas duas décadas, tem-se documentado a capacidade que inúmeras drogas de abuso como, por exemplo, anfetamina, ecstasy, cocaína, opióides e canabinóides, têm de prejudicar muitos aspectos de funções do sistema imune, atuando diretamente em células imunes e/ou indiretamente por via neuroimune, visto que exercem profundos efeitos comportamentais, neuroquímicos e neuroendócrinos. A anfetamina, em especial, ao modificar a atividade do sistema nervoso autônomo simpático (SNAS) e neuroendócrino, influencia a atividade do sistema imune e o início, o desenvolvimento e o tratamento de diversas doenças, dentre elas, a asma.

A asma é uma doença inflamatória crônica que envolve, simultaneamente, a participação de diversas células, citocinas e mediadores inflamatórios, caracterizada principalmente por aumento do número de células inflamatórias e hiperreatividade das vias aéreas, uma perda do epitélio brônquico e uma alta produção de imunoglobulina E (IgE).

Em nossos laboratórios, estudando os efeitos do tratamento agudo com anfetamina em um modelo de inflamação alérgica pulmonar, Ligeiro-Oliveira et al. (2004) observaram diminuição do número de células inflamatórias no lavado broncoalveolar (LBA) e no sangue periférico e aumento do número de células na medula óssea de ratos sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA). Atribuíram os efeitos que observaram a uma provável mudança de responsividade do eixo hipófise-pituitária-adrenal (HPA) às condições de estresse impostas pelo desafio com OVA após o uso da anfetamina, muito provavelmente, através de uma ação da corticosterona em células da medula óssea. Neste sentido, os efeitos que

¹ Todas as referências bibliográficas encontram-se na Revisão de Literatura.

observaram foram reduzidos, mas não anulados pelo tratamento prévio com metirapona, um inibidor da síntese de corticosterona. De igual forma, um tratamento prévio com reserpina, também reduziu os efeitos observados na migração celular, presumivelmente pelas interações, que ela tem com o transportador vesicular de monoaminas do tipo 2 (VTMA-2), local de ação da anfetamina. Uma vez que esses pré-tratamentos não aboliram os efeitos da anfetamina, sugeriu-se a participação de outros mecanismos nos efeitos dessa droga sobre a migração celular em animais OVA – sensibilizados e desafiados.

Neste sentido, estudos recentes têm demonstrado que o glutamato atua não apenas como um neurotransmissor, mas também, como importante modulador imune por atuar em receptores presentes em células do sistema imune. Mais que isso, mostrou-se a presença desse neurotransmissor em células imunes, assim como a expressão de seus transportadores, receptores e enzimas de síntese nestas células. Desta forma, o glutamato tem sido considerado um importante elo de conexão entre os sistemas nervoso central e imune.

Desta forma, pareceu-nos relevante abordar, a participação do sistema glutamatérgico nos efeitos induzidos pela anfetamina no modelo de inflamação alérgica pulmonar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO

A Neuroimunomodulação ou Psiconeuroimunologia é uma área da ciência que estuda as complexas relações bidirecionais existentes entre o Sistema Neuroendócrino e o Sistema Imune (BLALOCK; SMITH, 2007). As interações entre os mecanismos endócrinos e nervosos e a consequente regulação ou modulação de várias funções orgânicas são bem conhecidas e estudadas desde há muito tempo. Contudo, nos últimos anos, maior atenção tem sido centrada à análise das complexas relações existentes entre o Sistema Neuroendócrino e o Sistema Imune.

Desde o trabalho pioneiro de Hans Selye em 1936, sabe-se que o Sistema Nervoso Central (SNC), pela mediação que exerce sobre funções neurovegetativas durante o estresse, é capaz de influenciar respostas orquestradas pelo Sistema Imune (SI). Selye em 1936 analisou as alterações ocasionadas durante o estresse, entre outras, no tamanho das adrenais, do timo, do baço e dos linfonodos. Embasado em alterações como estas, este autor descreveu o desenvolvimento de uma síndrome que chamou de "adaptação geral". No entanto, apenas em 1977 surgiu o primeiro trabalho que descreveu a ocorrência de uma redução na função de linfócitos após uma situação de estresse (o luto pela perda de um companheiro). Este trabalho mostrou, de forma inequívoca, que uma situação de estresse de natureza psicológica foi capaz de produzir alterações da função imune de maneira independente de hormônios (BARTROP et al., 1977).

Segundo Blalock (1984) existe uma razão bioquímica lógica que justificaria as interações entre os sistemas neuroendócrino e imune. De fato, os sistemas nervoso, endócrino e imune compartilham de receptores para citocinas, neurotransmissores, hormônios e neuropeptídios. Mais que isso, produtos originalmente tidos como específicos de cada um desses sistemas coexistem em tecidos linfóide, endócrino e nervoso, ou seja, mostrou-se que há citocinas sendo produzidas no SNC e, também

hormônios como, por exemplo, ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) e TSH (hormônio tireotrófico), sendo sintetizados em células linfóides (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996). É a partir dessas observações que se começa a delinear o conceito da existência de uma extensa comunicação e relacionamento entre os sistemas neuroendócrino e imune e de que estas relações ocorrem nos dois sentidos, isto é, tanto mecanismos neuroendócrinos modulam a atividade do sistema imune, quanto este influencia a atividade do sistema neuroendócrino (MADDEN; SANDERS; FELTEN, 1995).

O sistema endócrino, em especial, o eixo HPA, é um dos responsáveis por vários dos elos de ligação entre estes dois sistemas. O hipotálamo apresenta diversas conexões neurais com o sistema límbico, que esta envolvido nos processos de adaptação e nas respostas neuroendócrinas e emocionais ao estresse. O hipotálamo recebe informações da periferia, integra-as com o ambiente interno, e promove o necessário ajuste de certas funções, como por exemplo, das secreções hormonais endócrinas de ACTH e do funcionamento do SNAS (ELENKOV et al., 2000).

Uma forma de abordagem usada para o estudo das relações entre o SNC e o SI se faz através de modelos que envolvem lesões em estruturas específicas do cérebro e da avaliação das alterações ocasionadas por estas lesões em parâmetros ligados à atividade do sistema imune (FELTEN, 1991). Dessa forma observou-se que, ratos que tiveram o *locus ceruleus* lesionado apresentaram uma menor produção de anticorpos contra BSA (albumina sérica bovina) e uma redução no tamanho do timo e da população de linfócitos CD4⁺ no sangue periférico (NIKOLIC; JOVANOVA-NESIC; JANKOVIC, 1993). Estes achados sugerem a existência de uma estreita relação entre a ativação do SNAS (sistema nervoso autônomo simpático), por exemplo, na vigência de uma situação de estresse, com o funcionamento do sistema imune. De fato, evidências anatômicas sustentam esta hipótese; já se verificou, por exemplo, que órgãos linfóides tais como timo, baço e linfonodos são intensamente inervados por fibras simpáticas (FELTEN, 1993). Além disso, células epiteliais do timo, linfócitos T, linfócitos B e macrófagos expressam receptores α e β- adrenérgicos (KOHM; SANDERS, 2001).

Outra forma de abordagem neuroimune é aquela que avalia as influências do sistema imune sobre o sistema nervoso. Nesse aspecto mostrou-se que respostas imunes e inflamatórias modulam a atividade de áreas específicas do SNC e, consequentemente o comportamento animal.

Neste sentido, Besedovsky et al. (1977), um pesquisador de grande importância para o estabelecimento deste campo de estudo, demonstrou que após a imunização de ratos ocorria um aumento na atividade elétrica de neurônios do hipotálamo ventromedial, fato que correspondia ao momento do pico da produção de anticorpos contra o antígeno. Posteriormente, outro trabalho, (SAPHIER et al., 1987), avaliou a atividade elétrica de determinadas regiões do SNC, tais como aquelas da área pré-óptica do hipotálamo anterior e do núcleo paraventricular do hipotálamo, após uma imunização de ratos com hemácias de carneiro; os resultados obtidos confirmaram os dados de Besedovsky et al. (1977), contribuindo para formar o conceito de que a atividade do sistema imune influencia a atividade de áreas específicas do cérebro.

Dados obtidos posteriormente por Besedovsky et al. (1983), dentro desta linha de pesquisa, indicaram que o aumento da atividade elétrica de áreas hipotalâmicas que se segue à imunização está relacionado à alterações no metabolismo da noradrenalina naquelas regiões; observaram um decréscimo no conteúdo de noradrenalina no hipotálamo fato que, mais uma vez, foi concomitante ao pico da produção de anticorpos. Desta forma, fortaleceu-se o conceito de que alterações na atividade do SNC podem ser provocadas pela ativação do sistema imune. Neste sentido, vale lembrar que, Besedovsky et al. já em 1975 havia descrito o fato de ser uma resposta imune capaz de alterar os níveis séricos de glicocorticóides; demonstrou que a imunização de ratos e de camundongos com diferentes antígenos levava a um aumento de até três vezes nas concentrações de corticosterona sérica (BESEDOVSKY et al., 1975).

Esses dados em seu conjunto levam a crer que a ativação do sistema imune e a consequente produção de citocinas provocava uma resposta endócrina. Assim, demonstrou-se que a injeção de IL-1, uma substância liberada, por exemplo, por macrófagos ativados, é capaz de promover um aumento dos níveis plasmáticos de ACTH e, também, de corticosterona Besedovsky et al. (1986).

A ativação do eixo HPA é entendida como um mecanismo de regulação no qual hormônios liberados exercem um papel modulador de diversas funções orgânicas, dentre as quais aquelas que controlam um processo inflamatório e/ou infeccioso (DUNN; WANG, 1995). A ativação deste eixo e a consequente liberação de ACTH e de glicocorticóides fazem parte das respostas neurovegetativas ligadas às situações de estresse e de ansiedade (RIVIER; VALE, 1983). Desta forma, a ativação do eixo HPA pela IL-1, passa a ser considerada pelo organismo como se fosse uma situação de estresse ou de ansiedade, de forma semelhante àquela desencadeada por estímulos ambientais e físicos (DUNN; WANG, 1995).

Acredita-se que a sinalização de eventos imunológicos para o SNC ocorra de duas maneiras diferentes e não excludentes. A primeira, chamada de via neural é representada pelo nervo vago (KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002). Assim, relatou-se que a liberação de IL-1 por macrófagos estimulados por LPS (lipopolisacarídeo de E.Coli) é capaz de estimular fibras aferentes vagais, que transmitiriam a informação para o SNC. De fato, a vagotomia cirúrgica evitou as manifestações de comportamento doentio induzidas pelo LPS ou IL-1 (MAIER et al., 1998; KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002). A outra via de comunicação é chamada de humoral; neste caso, as citocinas produzidas após a injeção de LPS ou a própria IL-1 alcançariam a corrente sanguínea e a sua mensagem atingiria o SNC através de dois possíveis sistemas intermediários. Um deles, seria representado pelas células endoteliais que expressam enzimas (ciclooxigenase-2 (COX-2) e prostaglandina E2 (PGE)), que quando induzidas, levam à produção de prostaglandina E2 (PGE₂). O outro, sistema intermediário é representado por células da micróglia (macrófagos) localizada em regiões específicas (plexo coróide e órgãos circunventriculares) nas quais a barreira hematoencefálica é permeável (KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002).

Nesse sentido, diversos trabalhos desenvolvidos em nossos laboratórios têm contribuído para o fortalecimento dessas ideias inicialmente propostas. Basso, De Sa-Rocha e Palermo-Neto (2001) demonstraram que camundongos imunizados com OVA desenvolvem uma aversão ao antígeno presente na dieta. Deste modo, frente à opção de ingerir água ou uma solução adocicada de clara de ovo, os animais não imunizados preferem beber a solução doce, enquanto animais imunizados com OVA

passam a evitar a solução doce que contém o antígeno, ingerindo preferencialmente água (BASSO; DE SA-ROCHA; PALERMO-NETO, 2001). Além disso, os animais imunizados com OVA e desafiados com o antígeno por via oral apresentam níveis elevados de ansiedade e maior expressão de c-Fos em áreas do SNC como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e o núcleo central da amígdala (CeA), regiões estas relacionadas à emotividade (BASSO et al., 2003).

Outro trabalho de nosso laboratório que fortalece a importância da integração entre os sistemas imune e nervoso na adaptação dos animais a estímulos do meio ambiente foi desenvolvido por Costa-Pinto et al. (2005). Assim, camundongos imunizados com OVA evitaram a exploração de um ambiente previamente associado à exposição ao antígeno por nebulização (COSTA-PINTO et al., 2005). Neste caso, a reação alérgica nas vias aéreas levou a uma resposta comportamental em que os animais passaram a evitar o lado escuro de uma caixa, supostamente mais seguro, para ficar no compartimento claro, porém, considerado desconfortável para os animais. De igual forma, esse desafio nasal levou à ativação do PVN e do CeA de animais imunizados com OVA (COSTA-PINTO et al., 2005). De fato, já havia sido demonstrado que ratos que foram expostos a um estímulo visual previamente associado com uma resposta alérgica pulmonar apresentaram alterações comportamentais, ou seja, exploraram por menos tempo os braços abertos do labirinto em cruz elevado, indicando que a reação alérgica nas vias aéreas é capaz de elevar os níveis de ansiedade de animais imunizados com OVA e que este efeito pode ser condicionado (PALERMO-NETO; GUIMARÃES, 2000).

Além da atenção dirigida à análises das relações específicas que ocorrem entre os sistemas imune e nervoso, é crescente o interesse pela investigação dos efeitos neuroimunes de alguns fármacos que atuam no SNC em especial, pela capacidade que têm de atuarem como estressores químicos, interferindo consequentemente com a atividade imune (COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010). Neste contexto, nosso grupo de pesquisa vêm estudando dentro de uma perspectiva neuroimune, fármacos como: anfetamina (LIGEIRO-OLIVEIRA et al., 2004; DE OLIVEIRA et al., 2011), ecstasy (MDMA) (DE PAULA et al., 2009), diazepam (DE LIMA et al., 2010; LAZZARINI et al., 2010; SAKAI et al., 2010), amitriptilina (VISMARI; ALVES; PALERMO-NETO, 2010), picrotoxina

(STANKEVICIUS et al., 2008) e cialotrina (QUINTEIRO-FILHO; RIGHI; PALERMO-NETO, 2009; RIGHI; XAVIER; PALERMO-NETO, 2009). Mostraram que fármacos influenciam diversos parâmetros da resposta imune e a evolução de alguns modelos de doença.

2.2 INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR

A asma é considerada a doença crônica pulmonar que mais acomete as pessoas em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que 300 milhões de pessoas no mundo sofram de asma, sendo ela a doença crônica mais comum em crianças, tendo levado mais de 255 mil pessoas à morte no ano de 2005 (OMS, 2008). Durante as últimas três décadas, houve um aumento significativo na prevalência de asma, em países desenvolvidos e, principalmente, em países em desenvolvimento, como o Brasil. Segundo a OMS, o Brasil ocupa o sexto lugar entre os países com maior incidência de diagnóstico de asma na população adulta (BOUSQUET et al., 2007). A asma é um grave problema de saúde pública, envolvendo gastos superiores aos comprometidos com a tuberculose e AIDS. No Brasil, dados do Sistema Único de Saúde (SUS) revelam que a cada ano mais de 367 mil brasileiros dão entrada nos hospitais, vítimas do problema, constituindo-se na quarta causa de hospitalização pelo SUS (2,3% do total), sendo a terceira causa de internações entre crianças e adultos jovens. Cerca de 12% de todas internações hospitalares do SUS acontecem por diagnósticos de asma, e/ou a doenças pulmonares a ela relacionadas (RIO; GALLO; SIQUEIRA, 2002). Em seu conjunto, elas representam gastos superiores a R\$ 600 milhões de reais por ano aos cofres públicos brasileiros (BRASIL, 2003).

A asma é uma doença inflamatória crônica complexa que envolve, simultaneamente, a participação de várias células, citocinas e mediadores inflamatórios, caracterizada principalmente por hiperreatividade das vias aéreas e por limitação variável do fluxo aéreo, reversível espontaneamente ou após tratamento. Observa-se na asma um aumento do número de células inflamatórias nas vias aéreas, perda do epitélio brônquico e reatividade exacerbada do músculo liso, além de uma alta produção de imunoglobulina E (IgE) (BICE; SEAGRAVE; GREEN, 2000; BLANCHET; MCNAGNY, 2009). A asma resulta de uma interação entre fatores genéticos, comportamentais, ambientais e outros fatores específicos ou não que contribuem para o desenvolvimento e manutenção dos sintomas (BUSSE; LEMANSKE, 2001; HOLGATE, 2008).

As doenças alérgicas, tais como a asma, as rinites e as alergias alimentares mediadas por IgE são, em última instância, consequência da exposição a um antígeno que acaba por gerar uma resposta imune orquestrada fundamentalmente por células Th2. Estas células são responsáveis pela produção de citocinas, tais como IL-4, IL-5, IL-13 e, também determinam a produção de IgE pelas células B. A IgE, assim como a IgG1 em camundongos e a IgG4 em humanos, são considerados anticorpos anafiláticos que se ligam à membrana dos mastócitos por meio de um receptor de alta afinidade (FcɛRI). Assim, quando um indivíduo que desenvolveu uma resposta deste tipo é exposto pela segunda vez ao mesmo antígeno, ocorre uma ligação cruzada entre este antígeno e duas moléculas de IgE presas à membrana dos mastócitos e, como consequência, há a desgranulação destas células. É o que se chama de fase imediata da reação de hipersensibilidade, portanto, mediada fundamentalmente pelos mastócitos e pela IgE. A desgranulação dos mastócitos leva à síntese e/ou liberação de mediadores pré-formados como a histamina e a serotonina e de mediadores lipídicos como as prostaglandinas e os leucotrienos, além de diversas citocinas. A reação de hipersensibilidade também apresenta uma fase tardia, que é mediada basicamente pelos eosinófilos e por citocinas do padrão Th2 (WILLS-KARP, 2001; LLOYD; HESSEL, 2010). Dessa forma, os eosinófilos são células efetoras importantes nas inflamações alérgicas. Eles desempenham um papel relevante nas reações de fase tardia, liberando mediadores bronconstritores, tais como os leucotrienos, fator ativador de plaquetas e outros quimioatraentes que causam um maior influxo de células inflamatórias para os tecidos. Os eosinófilos também produzem e liberam citocinas pró-inflamatórias e fator de crescimento de colônia granulocítica macrofágica (GM-CSF), incluindo as citocinas IL-4, IL-5, IL-13 (WILLS-KARP, 2004; PERKINS; WILLS-KARP; FINKELMAN, 2006; FINKELMAN et al., 2010)

O desenvolvimento do modelo animal de asma envolve um processo de sensibilização do mesmo a um antígeno de interesse e o subsequente desafio das vias aéreas para se obter uma resposta alérgica. Contudo, esta resposta alérgica pode diferir substancialmente entre as espécies estudadas. Isso ocorre devido a inúmeras razões, como o método de sensibilização, o antígeno utilizado e as diferenças entre as espécies, incluindo-se aqui a anatomia, a fisiologia e a resposta imunológica (ZOSKY; SLY, 2007; FINKELMAN; WILLS-KARP, 2008). O modelo murino de asma tornou-se de longe, o mais utilizado em experimentação. Os camundongos são facilmente sensibilizados por via sistêmica após a injeção do antígeno, geralmente a OVA, associada a um adjuvante, normalmente, o hidróxido de alumínio (ZOSKY et al., 2004). Este modelo resulta em resposta imunológica das vias aéreas, que apresenta algumas das características inflamatórias observadas na asma, refletindo nos dois principais achados fisiopatológicos da asma: a inflamação das vias aéreas e a hiperreatividade brônquica (SHIN; TAKEDA; GELFAND, 2009). Neste sentido, camundongos imunizados e desafiados apresentam aumento no fluxo de células inflamatórias, principalmente de eosinófilos e neutrófilos para as vias aéreas, hipersecreção de muco, altos níveis de IgE, predomínio da subpopulação de linfócitos Th2, padrão de citocinas do tipo Th2, incluindo-se aqui IL-4, IL-5 e IL-13, além de quimiocinas como a eotaxina (HOLT et al., 1999; TRIFILIEFF et al., 2000; MADDOX; SCHWARTZ, 2002; LIGEIRO-OLIVEIRA et al., 2004).

O recrutamento de leucócitos dos vasos sanguíneos para os tecidos é primordial para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória adequada à lesão ou infecção e é importante na sequência de eventos que levam às doenças inflamatórias alérgicas, como na asma. Essa migração de células inflamatórias é um processo dinâmico que depende da participação das moléculas de adesão celular. Estas são expressas nas células endoteliais pulmonares e nos leucócitos; e apresentam um papel importante no início do recrutamento de leucócitos circulantes para os locais de inflamação pulmonar (BROIDE et al., 1998; KELLY; HWANG; KUBES, 2007).

As moléculas de adesão são expressas constitutivamente na superfície celular e sua expressão é aumentada quando da ativação leucocitária. O recrutamento de leucócitos compreende três estágios: o rolamento, a adesão e a migração transendotelial. Dependendo das características moleculares comuns, as moléculas de adesão celular são classificadas em 3 principais famílias distintas, são elas: selectinas, integrinas e imunoglobulinas.

As selectinas pertencem à família de moléculas de adesão responsáveis pelo rolamento dos leucócitos. As selectinas podem ser agrupadas em 3 grupos: Lselectina, P-selectina e E-selectina. A L-selectina é normalmente expressa nos leucócitos circulantes, enquanto os seus ligantes estão presentes somente sobre o endotélio ativado. Já foi demonstrado que camundongos, geneticamente deficientes em L-selectina exibem uma diminuição no recrutamento de leucócitos após um estímulo inflamatório (TEDDER et al., 1995). A L-selectina se liga a diferentes moléculas de adesão expressas pelas células endoteliais, entre elas, a P-selectina e E-selectina. A P-selectina é expressa na superfície de células endoteliais ativadas e plaquetas. Durante a inflamação, a P-selectina atua no recrutamento de leucócitos dentro de vênulas pós capilares. As células endoteliais podem também sintetizar e expressar P-selectina em resposta a endotoxina ou citocinas. Os leucócitos normalmente expressam vários ligantes para P-selectina, incluindo a L-selectina e Pselectina ligante de glicoproteína -1 (PGSL-1) (PANÉS, 1999). Diferente da Pselectina, a E-selectina não se expressa constitutivamente nas células endoteliais; sua síntese e expressão podem ser aumentadas por citocinas, como a IL-1 e TNF-α ou por endotoxina (FRIES et al., 1993).

Um outro grupo de moléculas de adesão, as integrinas são proteínas heterodiméricas constituídas pelas subunidades alfa e beta. Essas proteínas são expressas na superfície do leucócito, onde podem mediar a adesão celular leucócito-endotélio em poucos minutos após um estímulo inflamatório (PANÉS, 1999). Além da adesão entre leucócitos e endotélio, as funções das integrinas abrangem a quimiotaxia e a fagocitose, que são reguladas pelo aumento no número de receptores na superfície celular ou por alterações morfofuncionais (SHINJI et al., 2003; HEIT; COLARUSSO; KUBES, 2005).

Já no endotélio, a família das imunoglobulinas, têm um papel importante na interação de leucócitos à parede vascular. Dentre as moléculas que se destacam no processo estão a ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 e PECAM-1. A ICAM-1 é normalmente encontrada na superfície das células endoteliais, mas a sua expressão pode ser

significativamente aumentada em consequência da ativação endotelial com citocinas ou endotoxinas. A ICAM-2 esta presente na membrana de células endoteliais e sua expressão não é induzida por estímulos inflamatórios (YUSUF-MAKAGIANSAR et al., 2002). A VCAM-1 é importante no rolamento e adesão de eosinófilos; desta forma, no endotélio de um pulmão alérgico há uma superexpressão de VCAM-1, o que implica no recrutamento de eosinófilos da circulação sanguínea para as vias aéreas. A PECAM-1 que é expressa constitutivamente em plaquetas, leucócitos e células endotelias é responsável pela adesão de plaquetas e leucócitos às células endoteliais e pela migração de leucócitos através das células endoteliais (WAKELIN et al., 1996).

A descrição apresentada mostra que as interações leucócito-endotélio mediadas pelas moléculas de adesão constituem um evento inicial e fundamental para o processo inflamatório. As expressões e atividades das moléculas de adesão, bem como, os mecanismos bioquímicos e as alterações morfológicas necessárias aos leucócitos durante sua migração são dependentes da ação de uma série de substâncias químicas produzidas por diferentes tipos celulares (WIEDLE; DUNON; IMHOF, 2001; LAU et al., 2005). Neste sentido, citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos são relevantes para a migração celular (FRANGOGIANNIS et al., 2001).

Do ponto de vista imunológico, o desencadeamento e manutenção da asma está sob forte influência de mecanismos associados à hipersensibilidade imediata, onde os mastócitos sensibilizados ocupam lugar de destaque. Os mastócitos são células secretoras multifuncionais, caracterizadas pela presença de numerosos grânulos citoplasmáticos, metacromáticos, que contém aminas biogênicas, proteoglicanos, citocinas e serinoproteinases neutras. Inicialmente, os mastócitos foram denominados de mastzellen, que significa "células bem alimentadas", devido a grande quantidade de grânulos citoplasmáticos (CRIVELLATO et al., 2004; GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008).

Os mastócitos estão amplamente distribuídos no organismo e são encontrados, principalmente, em superfícies de contato com o meio externo, como os epitélios intestinal e pulmonar e no tecido conjuntivo, intimamente associados a vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (DVORAK; DVORAK; GALLI, 1983; LONGLEY; DUFFY; KOHN, 1995). No homem e em roedores, essas células são

heterogêneas sendo que, as populações de mastócitos apresentam características fenotípicas, morfológicas, bioquímicas e funcionais distintas em diferentes regiões anatômicas (METCALFE; BARAM; MEKORI, 1997; CRIVELLATO et al., 2004). Devido à sua localização peculiar, sugere-se que os mastócitos sejam as primeiras células a iniciarem os processos imunológicos do organismo (QURESHI; JAKSCHIK, 1988; CRIVELLATO et al., 2004).

Os grânulos citoplasmáticos dos mastócitos contém uma grande variedade de mediadores inflamatórios, como a histamina, serotonina, heparina, sulfato de condroitina, proteases e citocinas. Os mastócitos também sintetizam mediadores lipídicos como os leucotrienos, prostaglandinas e o fator ativador de plaquetas. Além disso, após serem ativadas, estas células produzem e secretam citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF-α), o fator de crescimento de colônia granulocítica macrofágica (GM-CSF), as interleucinas (IL) -3, -4, -6, -10, -13, -14, e -16 e expressam algumas quimiocinas como a MCP-1 e as MIP-1α e -1β (GALLI; GORDON; WERSHIL, 1991; ABRAHAM; MALAVIYA, 1997; AJUEBOR et al., 1999; WEDEMEYER; TSAI; GALLI, 2000; METZ; MAURER, 2007). A grande variedade de mediadores pré- e neoformados, que os mastócitos liberam, indica que estas células podem influenciar outras células do microambiente em que se localizam, bem como que têm papel central no processo inflamatório.

Os mastócitos apresentam inúmeros receptores de reconhecimento de antígenos, na superfície de membrana como o receptor de alta afinidade para IgE (FcεRI), os receptores para IgG (FCεRI, FCεRII e FCεRIII) e receptores para peptídeos do sistema complemento (C3aR, C5aR, CR3 e CR5), que favorecem a sua ativação por bactérias ou partículas opsonizadas (ABRAHAM; MALAVIYA, 1997; GILFILLAN; TKACZYK, 2006; GALLI; TSAI, 2008). Além disso, estas células expressam várias moléculas de adesão e receptores para fatores quimiotáticos, para tirosina-cinases e urocinases, que favorecem a sua distribuição nos tecidos, ativação, diferenciação, sobrevivência e função pró-angiogênica, respectivamente.

A ativação dos mastócitos pode ser iniciada por duas vias distintas, associadas ou não a anticorpos. Uma das vias de ativação ocorre quando um antígeno multivalente (alergênico) se liga a anticorpos anafiláticos da classe IgE, previamente ligados a receptores de membrana específicos FcɛRI ou a receptores

de IgG (FcyRII/RIII), presentes na membrana dos mastócitos. A outra via, sem a participação de anticorpos, pode manifestar-se por ativação de receptores para patógenos, como os TLRs ou receptores para citocinas, como o de SCF, IL-1 e TNFα (GALLI; MAURER; LANTZ, 1999; GILFILLAN; TKACZYK, 2006; GALLI; TSAI, 2008; WEISSLER; MEKORI; MOR, 2008).

A desgranulação dos mastócitos pode ocorrer por dois processos distintos. O primeiro, denominado exocitose, decorre da fusão dos grânulos citoplasmáticos e destes com a membrana celular, resultando na liberação rápida de mediadores. Este mecanismo está associado a processos imunológicos, como a reação de hipersensibilidade imediata e à inflamação aguda. O segundo processo é conhecido por desgranulação lenta. Neste caso, ocorre a secreção dos mediadores estocados nos grânulos sem que estes se fundam entre si ou com a membrana celular. Este processo está associado a condições de inflamação crônica, alergias e tumores (DVORAK; KISSELL, 1991; CRIVELLATO et al., 2002; CRIVELLATO et al., 2003; CRIVELLATO et al., 2004).

Neste sentido, De Oliveira et al. (2011) demostraram que o tratamento agudo com anfetamina foi capaz de agir nos mastócitos e consequentemente, modificou a sua ativação, alterando a habilidade de desgranulação dessas células.

2.3 ANFETAMINA

Nas últimas duas décadas, tem-se documentado a capacidade que inúmeras drogas de abuso como, por exemplo, anfetamina, ecstasy, cocaína, opióides e canabinóides, têm de prejudicar muitos aspectos de funções do sistema imune, atuando diretamente em células imunes e/ou indiretamente por via neuroimune (KLEIN; FRIEDMAN; SPECTER, 1998; MELLON; BAYER, 1998; PELLEGRINO; BAYER, 1998; YU et al., 2002; FRIEDMAN; NEWTON; KLEIN, 2003; DE PAULA et al., 2009). De fato, essas drogas exercem profundos efeitos comportamentais,

neuroquímicos e neuroendócrinos (VANDERSCHUREN et al., 1999; BARR et al., 2002; GAVRILIN; MATHES; PODELL, 2002).

A anfetamina provoca uma série de alterações em sistemas de neurotransmissão do cérebro que em última instância acarretam na ativação do SNAS e do eixo HPA. A ativação destes componentes seria, então, responsável pela modulação do sistema imune após tratamento *in vivo*. Estudos que registram alterações de comportamento e/ou alterações endócrinas concomitantes com alterações de parâmetros relacionados à atividade do sistema imune após o tratamento *in vivo* com anfetamina fortalecem essa visão. Neste sentido já se observou que o tratamento agudo ou prolongado com anfetamina, além de aumentar a locomoção no campo aberto, diminuiu a proliferação de células T induzidas por concanavalina A (KUBERA et al., 2002).

Neste sentido, a anfetamina produz mudanças autonômicas e endócrinas que tipicamente se assemelham àquelas que ocorrem como parte da resposta fisiológica do estresse. A anfetamina aumenta a frequência cardíaca, a pressão sanguínea e a liberação de hormônios do eixo HPA, tais como hormônio do crescimento e corticosterona (SWERDLOW et al., 1991; SWERDLOW et al., 1993; DOMINGUES-JUNIOR et al., 2000; LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2008). Por outro lado, mostrouse que a anfetamina reduz o número de linfócitos, particularmente linfócito T citotóxicos no sangue periférico, e suprime a resposta proliferativa de esplenócitos; diminui, também, a resistência dos organismos às infecções bacterianas ou fúngicas, ao vírus do tumor mamário (MTV) e ao sarcoma Maloney (FREIRE-GARABAL et al., 1991; FREIRE-GARABAL et al., 1992; PEZZONE et al., 1992; FREIRE-GARABAL et al., 1998; DOMINGUES-JUNIOR et al., 2000; KUBERA et al., 2002).

De fato, ao modificar a atividade do sistema neuroendócrino, a anfetamina (LIGEIRO-OLIVEIRA et al., 2004; LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2008; DE OLIVEIRA et al., 2011), o ecstasy (STANKEVICIUS et al., 2010), o diazepam (PORTELA et al., 2002) e o estresse (WESSELIUS et al., 1999; PORTELA et al., 2001; PORTELA et al., 2002; PORTELA et al., 2007; QUARCOO; PAVLOVIC; JOACHIM, 2009; VIG et al., 2010) influenciam o início, o desenvolvimento e o tratamento de diversas doenças, dentre elas, a asma.

Ligeiro-Oliveira et al. (2004) estudando os efeitos de um tratamento agudo com anfetamina em um modelo de inflamação alérgica pulmonar mostraram que esse tratamento diminuiu o número de células inflamatórias no LBA e no sangue periférico de ratos sensibilizados e desafiados com OVA. Além disso, o mesmo tratamento aumentou a celularidade na medula óssea no mesmo modelo. Estes efeitos foram observados um dia após o desafio com OVA e foram reduzidos quando os animais receberam tratamento prévio com metirapona, um inibidor da síntese de corticosterona, previamente ao desafio por nebulização de OVA. Desta forma, é provável que o tratamento com anfetamina tenha mudado a responsividade do eixo HPA às condições de estresse impostas pelo desafio com OVA, diminuindo o número de leucócitos do sangue periférico e do pulmão, muito provavelmente, via ação da corticosterona em células da medula óssea. No entanto, os efeitos observados foram reduzidos, mas não anulados pela inibição da síntese de corticosterona, o que sugere a participação de outros mecanismos. Posteriormente, em outro estudo, Ligeiro de Oliveira et al. (2008) avaliaram os efeitos de um tratamento agudo e prolongado (21 dias) com anfetamina. Relataram ocorrência de efeitos opostos nessa situação; especificamente, a administração aguda de anfetamina diminuiu e a administração prolongada aumentou o número de células inflamatórias no pulmão de animais submetidos à sensibilização e desafiados com OVA. Além dos efeitos no LBA, observou-se que o tratamento agudo, mas não o prolongado, diminuiu o número de leucócitos no sangue periférico e aumentou a celularidade na medula óssea. Adicionalmente, verificaram que o tratamento com reserpina, uma droga que inibe a captação de noradrenalina pelas vesículas presentes nas terminações nervosas, diminuiu os efeitos observados na migração celular induzidos neste modelo de sensibilização e desafio com OVA, presumivelmente pelas interações, que a reserpina têm com o transportador vesicular de monoaminas do tipo 2 (VTMA-2), o local de ação da anfetamina.

Em um trabalho mais recente, De Oliveira et al. (2011) investigaram os efeitos do tratamento agudo com anfetamina sobre o influxo celular para o pulmão, permeabilidade vascular e reatividade das vias aéreas de ratos OVA sensibilizados e desafiados. Também foram avaliados, os efeitos sobre a expressão de moléculas de adesão (MAC-1, ICAM-1 e L-selectina), liberação das citocinas (IL-4 e IL-10) e sobre a desgranulação de mastócitos. Os resultados demonstraram que o tratamento com anfetamina reduziu o recrutamento celular para o pulmão, a permeabilidade vascular bem como a expressão de ICAM-1 e MAC-1 em células do LBA. Esse tratamento diminuiu os níveis de IL-4 e aumentou os níveis IL-10 encontrados no explante pulmonar. Além disso, a responsividade da traquéia à metacolina bem como o desafio *in vitro* com OVA foram reduzidos pelo tratamento com anfetamina sendo que os títulos de PCA não foram modificados pelo fármaco. Esses dados sugerem que a anfetamina regula vários parâmetros da inflamação alérgica pulmonar, tal como migração celular, permeabilidade vascular e responsividade da traquéia.

Contudo, além das vias neuroendócrina e noradrenérgica estudados em nossos laboratórios, têm sido considerados outros mecanismos através dos quais os psicoestimulantes, em especial, a anfetamina modulariam a resposta imune. Neste sentido, estudos recentes têm demonstrado que o glutamato, a dopamina e a serotonina atuam não apenas como neurotransmissores centrais, mas também, como importantes moduladores imunes por atuarem em receptores presentes em células do sistema imune (PACIFICI et al., 2004; KAVELAARS et al., 2005; PACHECO et al., 2006; PACHECO et al., 2007). Mais que isso, mostrou-se a presença de neurotransmissores como glutamato, dopamina, serotonina em células imunes assim como também a expressão de seus transportadores, receptores e enzimas de síntese (AMENTA et al., 2001; COSENTINO et al., 2002). Em especial, receptores para o glutamato já foram descritos na superfície de células T, enquanto que transportadores de glutamato foram encontrados em células apresentadoras de antígenos, tais como células dendríticas e macrófagos (PACHECO et al., 2007). Desponta, pois, o glutamato como importante elo de conexão entre o sistema nervoso central e o sistema imune (PACHECO et al., 2007). Sugeriu-se, nesse sentido, que o glutamato modularia os efeitos da anfetamina sobre o sistema imune (BOLDYREV; CARPENTER; JOHNSON, 2005). Mais especificamente sugeriu-se que tanto os receptores ionotrópicos como metabotrópicos do glutamato expressos em células imunes estariam envolvidos como moduladores da ativação celular (PACHECO et al., 2007).

A anfetamina ao aumentar a atividade do sistema dopaminérgico induz a sensibilização comportamental e à neurotoxicidade (KALIVAS; STEWART, 1991; SEGAL; KUCZENSKI, 1992; ROBINSON; BERRIDGE, 1993; VANDERSCHUREN;

KALIVAS, 2000). Entretanto, evidências indicam o envolvimento do subtipo de receptor de glutamato, o NMDA nesses efeitos. Assim, a administração de antagonistas do receptor NMDA efetivamente preveniu ou atenuou uma variedade de respostas induzidas pela anfetamina tais como a sensibilização comportamental, a degeneração neuronal e expressão gênica, indicando que a ativação do receptor NMDA é necessária para o desenvolvimento e expressão das respostas induzidas pela anfetamina (KARLER et al., 1989; LOWY, 1990; HEMRICK-LUECKE; HENDERSON; FULLER, 1992; BRISTOW et al., 1994; WANG; DAUNAIS; MCGINTY, 1994; KARLER et al., 1995; KONRADI; LEVEQUE; HYMAN, 1996). Portanto, os efeitos da anfetamina sobre a função imune, poderiam ser mediados não somente pela ativação de receptores específicos de glutamato presentes no sistema nervoso central (HAAS; SCHAUENSTEIN, 1997), por efeitos diretos desse neurotransmissor em células imunes (PELLEGRINO; BAYER, 1998; GORDON; BARNES, 2003).

Por outro lado, diversos trabalhos relatam o glutamato como tendo um papel crítico na regulação neuroendócrina (FARAH et al., 1991; JEZOVA; OLIVER; JURCOVICOVA, 1991; COSTA et al., 1992; SONG et al., 1996). Existem evidências crescentes de que os aminoácidos excitatórios, atuando através do receptor NMDA, poderiam desempenhar um papel importante no desenvolvimento do controle neuroendócrino do eixo HPA (IYENGAR et al., 1990; REYES; LUCKHAUS; FERIN, 1990; FARAH et al., 1991). É de amplo conhecimento, que o PCP, local de ligação do receptor NMDA, antagoniza a ativação dos receptores NMDA através de um bloqueio voltagem dependente do canal iônico aberto. Mostrou-se que o MK-801 apresenta uma alta afinidade e seletividade pelo receptor PCP (WONG et al., 1986: FOSTER; WONG, 1987). Neste sentido, já se demonstrou que a administração de MK-801 aumentou os níveis plasmáticos do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e da corticosterona (PECHNICK; GEORGE; POLAND, 1987; PECHNICK; GEORGE; POLAND, 1989; WEDZONY; CZYRAK, 1994; BAUMANN; ROTHMAN; ALI, 2000; KIM et al., 2009).

Mais especificamente, em relação ao uso do antagonista de receptores NMDA em modelo de inflamação, Da Cunha et al. em um trabalho recente (2010) demonstraram que o MK-801 atenuou a injúria pulmonar em um modelo de sepse

experimental. Mais especificamente, a administração de MK-801, 4 horas após o protocolo de indução da sepse experimental, diminuiu o número de células inflamatórias no LBA bem como os níveis de citocinas inflamatórias (IL-1β, TNF-α) neste LBA. Além disso, o MK-801 diminuiu os marcadores de estresse oxidativo e também as alterações histopatológicas bem como aumento da sobrevida dos animais estudados. Said et al. (2000) relataram também que o MK-801 produziu um efeito protetor sobre o pulmão, diminuindo a concentração de citocinas inflamatórias no LBA de ratos submetidos a um modelo de injúria aguda do pulmão. Esses resultados demonstram, portanto, um efeito protetor do MK-801 sobre a resposta inflamatória pulmonar (DA CUNHA et al., 2010).

Desta forma, pareceu-nos relevante abordar, a participação do sistema glutamatérgico nos efeitos induzidos pela anfetamina no modelo de inflamação alérgica pulmonar. Para esta finalidade, utilizamos tratamento prévio com o MK-801, um antagonista de receptores NMDA para bloquear a atividade de seu respectivo receptor. Na tentativa de melhor entender os resultados, foram também analisados os efeitos da anfetamina, associada ou não ao tratamento prévio com MK-801, sobre: a migração celular, a produção de citocinas e imunoglobulinas, sobre a expressão de moléculas de adesão, sobre a reatividade das vias aéreas in vitro, sobre a desgranulação de mastócitos e também sobre os níveis de corticosterona plasmático.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação do sistema glutamatérgico nos efeitos induzidos pelo tratamento agudo com anfetamina na inflamação alérgica pulmonar.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a participação do sistema glutamatérgico nos efeitos induzidos pela anfetamina em camundongos Balb/c OVA-sensibilizados e desafiados, através do tratamento prévio com MK-801, um antagonista de receptores glutamatérgicos NMDA sobre a:

- ✓ contagem de leucócitos total e diferencial no LBA e contagem de leucócitos total no sangue periférico e na medula óssea;
- ✓ expressão das moléculas de adesão L-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 em células do LBA;
- ✓ produção das citocinas IL-5, IL-10, IL-13 e INF-γ no LBA;
- ✓ produção de imunoglobulinas IgE total e IgE OVA específica no soro;
- ✓ reatividade in vitro das vias aéreas através da análise da traquéia isolada;
- √ desgranulação de mastócitos pulmonares;
- ✓ atividade do eixo HPA através da dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos adultos da linhagem BALB/C, com 8-10 semanas de idade, provenientes de proles obtidas no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ - USP). Os animais foram utilizados segundo as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório do Comitê de Ética da FMVZ – USP (Protocolo nº 1633/2009).

Antes do início dos experimentos, os animais foram alojados, por um período mínimo de 7 dias, em gaiolas de propileno (28 x 17 x 12cm) em número de 5 animais por gaiola para adaptação às condições do biotério experimental. Estas gaiolas foram devidamente acondicionadas em salas cuja temperatura ambiente (24 a 26°C) e umidade (65 a 70%) foram mantidas por mei o de aparelhos de ar condicionado central, com ventilação, exaustão e luminosidade controladas, obedecendo-se a um ciclo claro – escuro de 12 horas, com início da fase clara às 7:00 horas. Os animais foram alimentados com ração balanceada para roedores NUVILAB®. A ração e água foram fornecidas aos animais *ad libitum* durante todo o período experimental. Após um período de adaptação de no mínimo 7 dias, foram realizados os experimentos que serão descritos a seguir.

4.2 FÁRMACOS

✓ **Sulfato de Anfetamina** (Sigma® St Louis, MO, USA): dose de 2,0 mg/Kg (i.p.), que foi escolhida segundo o trabalho de Barr (2002).

✓ MK-801 (Research Biochemical International RBI[®], Natick, MA, USA): dose de 0,25mg/Kg (i.p.), que foi escolhida segundo o trabalho de Lourenço (2003) para manipulação do sistema glutamatérgico.

4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

A seguir será descrito os procedimentos experimentais realizados.

4.3.1 Modelo de Inflamação Alérgica Pulmonar em Camundongos

Os animais foram imunizados no dia D(0) com 0,4 mL de uma solução de 10 µg de OVA (Grau II) adsorvida em 10 mg de hidróxido de alumínio diluídos em PBS (phosfate-buffered saline) administrada por via intraperitoneal (i.p). No dia D(7), os animais receberam um reforço com a mesma solução pela via intraperitoneal (i.p). O desafio com o aerossol de OVA (Grau II) 2,5% diluída em PBS foi realizado, colocando-se os animais, duas vezes por dia (manhã e tarde) por um período de 20 minutos, durante os D(13) e D(14) em uma câmara (18,5 x 18,5 x 13,5) conectada a um nebulizador ultrassônico (Inalamax NS modelo S3®, Brasil), que gera um aerossol misto (tamanho médio: 0,5 – 1,0 µm). A figura 1 resume o procedimento. Este período de sensibilização e broncoprovocação foi escolhido visto que, de acordo com Coleman, Layton e Stanworth (1983) após a injeção intraperitoneal de ovalbumina emulsionada em alúmen, os níveis circulantes de imunoglobulinas E (IgE) aumentam rapidamente entre 7 e 14 dias.



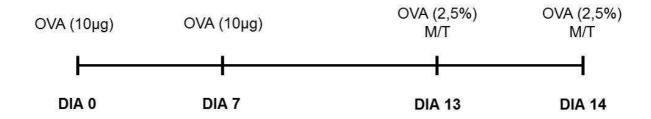


Figura 1 - Protocolo de indução da inflamação alérgica pulmonar em camundongos. Onde: Dia 0: imunização, Dia 7: reforço e Dia 13 e Dia 14 desafio por nebulização de OVA pela M(manhã) e T (tarde)

4.3.2 Formação dos Grupos Experimentais

A formação dos grupos experimentais foi realizada da seguinte forma: Os animais do grupo basal (B) não receberam qualquer tipo de tratamento sendo mantidos em suas caixas moradia durante todo o período experimental. Os animais dos demais grupos foram submetidos ao protocolo de sensibilização e desafio por OVA como ilustrado anteriormente na figura 1 e tratados no dia D(13) e D(14) com volume de 0,1 mL de solução para cada 10g de peso de cada animal. Os animais de um grupo chamado S receberam 2 injeções de solução salina (NaCl 0,9%). Os animais do grupo A receberam uma injeção de solução salina (NaCl 0,9%) e uma injeção de anfetamina. Os animais do grupo MKS receberam uma injeção de MK-801 e uma injeção de solução salina (NaCl). Por fim, os animais do grupo MKA receberam uma injeção de MK-801 e uma injeção de anfetamina. Todos os animais receberam a primeira injeção 30 minutos antes da segunda, que foi administrada 60 minutos antes do primeiro e terceiro desafio com OVA, realizado nos dias D(13) e D(14) respectivamente. Depreende-se da leitura que todos os animais em estudo receberam duas injeções para eliminar possíveis efeitos intermitentes do estresse da injeção. Todos os animais foram submetidos à eutanásia 12 horas após o último desafio com OVA no dia D(15). A figura 2 ilustra a formação dos grupos experimentais.

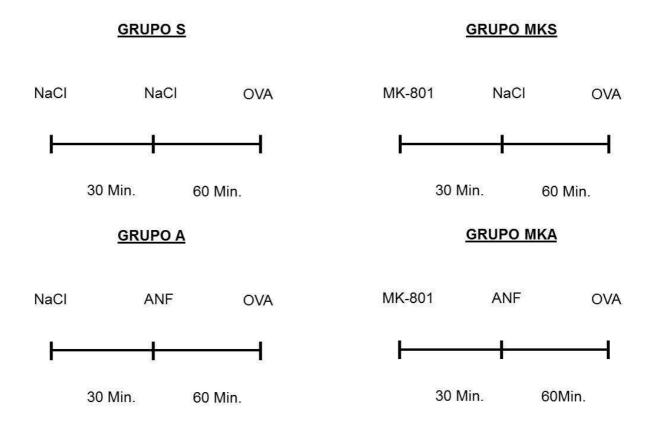


Figura 2 - Formação do grupos experimentais. Onde: Grupo S - animal alérgico tratado com NaCl; Grupo A - animal alérgico tratado com anfetamina; Grupo MKS - animal alérgico prétratado com MK-801 e tratado com NaCl e Grupo MKA – animal alérgico pré-tratado com MK-801 e tratado com anfetamina. ANF: anfetamina; OVA: nebulização durante 20 minutos

4.3.3 Contagem de Leucócitos do Sangue Periférico

Para a coleta do sangue os animais foram profundamente anestesiados (xilazina 20mg/Kg + cetamina 75 mg/Kg; i.p.), tendo-se tomado uma alíquota de sangue da aorta abdominal, com o auxílio de seringas e agulhas previamente umedecidas com EDTA 10%. A contagem de leucócitos totais foi determinada utilizando-se o contador de células ABC-Vet (Horiba ABX®) de uso veterinário.

4.3.4 Contagem de Leucócitos do LBA

Para a coleta do LBA os animais foram profundamente anestesiados (xilazina 20mg/Kg + cetamina 75 mg/Kg; i.p.) e sacrificados por exsanguinação através da aorta abdominal, 12 horas após o último desafio com OVA. Os pulmões foram lavados 2 vezes com alíquotas de 0,75 mL de PBS através de uma cânula inserida por traqueostomia. O fluido do LBA foi retirado e centrifugado (1200 rpm/10 min). O "pellet" de células foi ressuspendido em 1 mL de PBS. A contagem de leucócitos totais foi realizada após a adição de 10 µL de azul de Trypan a 90 µL da suspensão celular. Câmaras de Neubauer foram utilizadas para a contagem celular. A contagem diferencial, da suspensão celular foi realizada utilizando-se uma citocentrífuga, após coloração de Rosenfeld, empregando-se critérios morfológicos.

4.3.5 Contagem da Celularidade da Medula Óssea

Para determinar a celularidade da medula óssea, foi utilizado o fêmur direito de cada animal. O conteúdo da medula óssea foi lavado com 5,0 mL de meio PBS e a suspensão resultante foi acondicionada em tubos de polipropileno de 10,0 mL, dentro de banho de gelo. Imediatamente após realizou-se a contagem através de uma câmara de Neubauer (diluição 1:200), sendo a viabilidade celular das mesmas observadas pela coloração com azul de Trypan, aceitando o mínimo 95% de viabilidade.

Após a coleta do LBA, os animais tiveram a traquéia canulada e os pulmões insuflados com 1 mL de ar. Em seguida, os brônquios foram amarrados para evitar a perda de ar e o pulmão foi fixado em uma solução contendo paraformaldeído a 2% e glutaraldeído a 2% em tampão fosfato Sorensen 0,1 M, pH 7,4, por 24 h, a 4°C. As amostras foram lavadas no mesmo tampão, desidratadas em soluções crescentes de etanol, clarificadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes de 3 μm foram realizados no micrótomo Hyrax M60 (Zeiss, GR) sendo, posteriormente, corados com solução de azul de toluidina 0,25% e borato de sódio a 0,25% para análise histológica. As amostras (10 cortes por animal, 5 animais por grupo, n = 50 por grupo) foram avaliadas no microscópio AxioScope.A1 (Zeiss, GR). Os cortes histológicos foram analisados por morfometria através do Software Axiovision (Zeiss) para determinação das áreas teciduais e contagem dos mastócitos. As células foram expressas em média ± desvio padrão por mm² de tecido pulmonar.

4.3.7 Quantificação de Citocinas e Imunoglobulinas

A quantificação das citocinas no pulmão foi realizada do sobrenadante do LBA e a quantificação das imunoglobulinas no soro obtidos de animais sensibilizados, coletados 12 h após o último desafio antigênico. As dosagens de citocinas e imunoglobulinas foram realizadas por ELISA, utilizando-se os kits *OptEIA* para citocinas (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Neste método, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 50 μL por poço de anticorpo de captura diluído em tampão PBS e incubados por uma noite. Após 3 lavagens com 300 μL/poço de tampão de lavagem, as placas foram bloqueadas com 200 μL/poço de tampão de bloqueio por 60 minutos à temperatura ambiente. Após 3 lavagens, as amostras

foram incubadas por um período de 2 horas em temperatura ambiente. Para realização da curva padrão, citocinas foram incubadas em duplicata (50 μ L/poço) das diluições seriadas de citocinas recombinantes, conforme recomendações do fabricante. Após cinco lavagens 50 μ L/poço do anticorpo de detecção foram adicionados, com incubação por 60 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Novamente, a placa foi lavada sete vezes e 50 μ L/poço de estreptoavidina foi adicionada, sendo as placas incubada por 20 minutos, no escuro, em temperatura ambiente. Por fim, adicionou-se 50 μ L/poço de H_2SO_4 (2N) para interromper a reação e a densidade óptica foi determinada em espectofotômetro com filtro de 450nm.

4.3.8 Quantificação da Expressão das Moléculas de Adesão L-Selectina, Icam-1 e Vcam-1 em Células do LBA

A expressão das moléculas de adesão L-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 foram determinadas em amostras de células coletadas do LBA conforme descrito no item 4.3.4.. As células provenientes do LBA foram ressuspendidas em meio de cultura DMEN (*Dulbecco-modified Eagle's médium*) contendo 2% de FCS (*Fetal calf serum*). 1 x 10⁶ células/25 μl foram incubadas com o anticorpo anti-CD16/CD32 (na diluição de 1:100) por 20 min a 4°C pra bloquear as ligações não-específicas via receptor Fc. Após lavagem com tampão de FACs, essas células foram incubadas com 0,25 μg dos seguintes anticorpos FITC- (VCAM-1) (detector FL1), PE (ICAM-1) e PE-Cy (L-selectina) (detector FL2) por 30 min a 4°C de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida as células marcadas com os anticorpos foram ressuspendidas em 500 μL de paraformaldeído (1%) e acondicionadas a 4°C para leitura no citômetro de fluxo no citômetro FACalibur (BD Bioscience,San Diego, CA). Os dados foram analisados usando o software FlowJo e os resultados expressos em porcentagem de células positivas para cada molécula avaliada.

4.3.9 Avaliação da Reatividade das Vias Aéreas *In Vitro* através da Traquéia Isolada

Os animais foram profundamente anestesiados (xilazina 20mg/Kg + cetamina 75 mg/Kg; i.p.) e exsangüinados através da secção da aorta abdominal e a seguir tiveram seus tórax abertos. A traquéia foi isolada e o tecido conjuntivo adjacente removido. A seguir, segmentos de traquéia foram montados para registro isométrico de contrações em cubas para órgão isolado (15mL) contendo solução de Krebs-Henseleit aerada com 95%O₂ e 5%CO₂ com a seguinte composição (nM): NaCl, 115.0; KCl, 4.6; CaCl₂ 2. H₂O, 2,5; KH₂PO4, 1.2; MgSO₄. 7 H₂O, 2,5; NaHCO₃, 25.0 e glicose 11.0. O registro da força isométrica foi realizado usando o sistema, POWER LAB 4sp e transdutores isométricos (F-60), utilizando-se o programa *Chart* 3.4 para análise.

Os segmentos de traquéia isolada foram expostos a uma carga inicial de 1g e a análise feita a uma DDP de 500mV. Durante o período de equilíbrio (40 minutos), a solução de Krebs-Henseilet foi trocada a cada 10 minutos. Decorridos esse período, a tensão foi reajustada para 1 g. A capacidade contrátil (viabilidade tecidual) dos segmentos de traquéia foi avaliada substituindo-se o tampão Krebs-Henseilet por tampão KCl despolarizante (60 mM). As preparações dos tecidos foram expostas ao KCl a fim de se obter um padrão de contração. Após a avaliação da viabilidade das preparações, o KCl foi substituído novamente pelo tampão Krebs-Henseilet. Decorridos 20 minutos de equilíbrio foram adicionados nas cubas doses crescentes de metacolina (10⁻⁹ a 10⁻³ M) para construção das curvas concentração-efeito.

4.3.10 Dosagem dos Níveis de Corticosterona Plasmáticos

Após a coleta, o sangue dos animais foi centrifugado (2000 rpm/20 minutos em temperatura ambiente) para obtenção do plasma. Este foi armazenado em eppendorfs de polietileno em freezer -80 °C até o momento da realização das dosagens hormonais. A fim de evitar influências de variações circadianas nos níveis

plasmáticos de corticosterona, os animais dos grupos experimentais e controles foram eutanasiados de forma intercalada entre 8:00 e 10:00 horas da manhã. As dosagens para quantificação de corticosterona foram realizadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando-se o kit comercial *Enzo Life Science*.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados pelo teste de Bartlet para determinação da homogeneidade das variâncias. Os dados paramétricos foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls de comparações múltiplas, para avaliação dos contrastes. Os resultados não paramétricos foram analisados pelo teste "U" de Mann-Whitney ou por Kruskal-Wallis com sua resolução própria. Foram considerados significantes as análises com p≤ 0,05. Todas as análises estatísticas foram feitas com o auxílio do programa estatístico denominado GraphPad Prism for Windows versão 5 (2007).

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1 - AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO MK-801 NOS EFEITOS INDUZIDOS PELA ANFETAMINA SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR NO LBA, SANGUE PERIFÉRICO E MEDULA ÓSSEA

Trinta camundongos foram separados ao acaso em 5 grupos: B, S, A, MKS, MKA, sendo submetidos ou não (grupo B) aos respectivos tratamentos conforme ilustrado na **figura 2**. Os animais foram submetidos à eutanásia 12 horas após o último desafio com OVA no dia D(15), sendo coletados as células do sangue periférico, LBA e medula óssea para posterior contagem de leucócitos totais conforme descrito nos itens 4.3.3, 4.3.4. e 4.3.5.

Resultados

A tabela 1 mostra que os efeitos da administração de anfetamina sobre a contagem de leucócitos do LBA foram prevenidos pela administração prévia de MK-801 e que este tratamento não foi capaz de prevenir os efeitos da anfetamina sobre a celularidade da medula óssea. A análise estatística dos dados mostrou uma redução no número de leucócitos do LBA (F=19,22; df= 4/9; p<0,05) e um aumento da celularidade da medula óssea (F=18,79; df= 4/25; p<0,05) nos animais alérgicos tratados com anfetamina(Grupo A) em relação aos animais alérgicos e tratados com solução salina (Grupo S). Análise adicional mostrou um aumento no número de leucócitos do LBA dos animais do grupo MKA em relação aos animais do grupo A. No sangue periférico, o tratamento com anfetamina não alterou a contagem de leucócitos. As figuras 3, 4 e 5 ilustram estes resultados.

Tabela 1 - Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre a distribuição de células no LBA, sangue periférico e medula óssea de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801

Parâmetros	Grupos					
	В	S	Α	MKS	MKA	
LBA (céls. totais x10 ⁴)	18,05±0,70	77,33±20,84 ⁽¹⁾	36,67±9,07 ⁽²⁾	30,00±7,07 ⁽²⁾	98,00±12,94 ^(1,3)	
Medula óssea (céls. totais x10 ⁵)	49,67±10,03	31,86±0,73 ⁽¹⁾	37,46±2,54 ^(1,2)	32,81±1,26 ⁽¹⁾	31,70±2,84 ⁽¹⁾	
Sangue (leucócitos totais (10³/mm³)	7,300±0,26	4,733±1,72	4,460±0,95 ⁽¹⁾	5,817±1,48	4,657±0,61 ⁽¹⁾	

(1)p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo B, (2)p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo S, (3)p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo MKS. Onde, B: animal basal, S: animal alérgico tratado com salina, A: animal alérgico tratado com anfetamina, MKS: animal alérgico pré tratado com MK-801 e tratado com salina e MKA: animal alérgico pré tratado com MK-801 tratado com anfetamina. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam a média±desvio padrão de 6 animais por grupo.

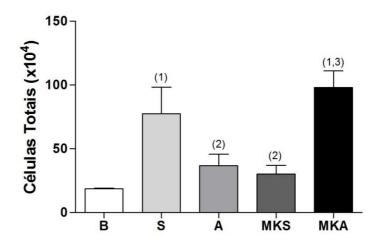


Figura 3 - Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre o número de células totais do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801. Onde, (1)p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo B, (2)p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo S, (3)p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo MKS. O significado dos grupos foi colocado na legenda da tabela 1. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 6 animais por grupo

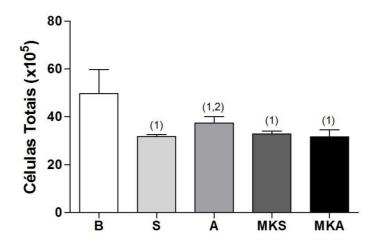


Figura 4 - Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre o número de células totais da medula óssea de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801. Onde, ⁽¹⁾p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo B, ⁽²⁾p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo S. O significado dos grupos foi colocado na legenda da tabela 1. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 6 animais por grupo

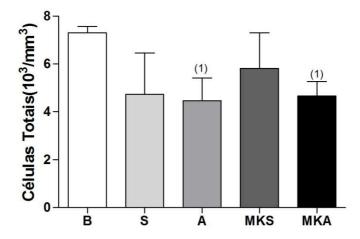


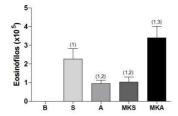
Figura 5 - Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre o número de células totais do sangue periférico de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801. Onde, (1)p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo B. O significado dos grupos foi colocado na legenda da tabela 1. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 6 animais por grupo

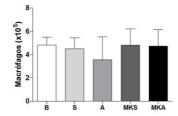
A tabela 2 mostra os efeitos da administração de anfetamina sobre a contagem diferencial de leucócitos do LBA. A análise estatística dos dados mostrou uma redução no número de eosinófilos (F= 64,29; df= 4/25; p<0,05) e neutrófilos (F=49,02; df= 4/25; p<0,05) do LBA nos animais alérgicos tratados com anfetamina (Grupo A) em relação aos animais alérgicos e tratados com solução salina (Grupo S). Análise adicional mostrou uma redução no número de eosinófilos e neutrófilos do LBA dos animais do grupo MKS em relação aos animais do grupo S. Além disso, no grupo MKA observamos um aumento no número de eosinófilos e neutrófilos em relação ao grupo MKS. Não observamos diferença significativa entre os grupos na contagem de macrófagos do LBA. A figura 6 ilustra estes resultados.

Tabela 2 - Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre a contagem diferencial de leucócitos no LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801

previo com	IVIN-60 I				
Parâmetros	Grupos				
	В	S	Α	MKS	MKA
Eosinófilos (x10 ⁵)	0.0 ± 0.0	$2,2 \pm 0,5^{(1)}$	$0,95 \pm 0,1^{(1,2)}$	$1,0 \pm 0,2^{(1,2)}$	$3,4 \pm 0,6^{(1,3)}$
Macrófagos (x10 ⁵)	4.8 ± 0.6	$4,5 \pm 0,9$	$3,5 \pm 1,9$	4.8 ± 1.4	$4,7 \pm 1,4$
Neutrófilos (x10 ⁵)	$9,5 \pm 2,6$	$38,3 \pm 5,3^{(1)}$	$28,1 \pm 3,2^{(1,2)}$	$26,3 \pm 6,4^{(1,2)}$	$48,5 \pm 6,4^{(1,3)}$

 $^{(1)}$ p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo B, $^{(2)}$ p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo S, $^{(3)}$ p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo MKS. Onde, B: animal basal, S: animal alérgico tratado com salina, A: animal alérgico tratado com anfetamina, MKS: animal alérgico tratado com salina e MKA: animal alérgico tratado com anfetamina. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam a média±desvio padrão de 6 animais por grupo.





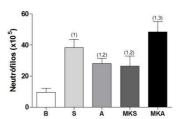


Figura 6 - Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre a contagem diferencial de leucócitos no LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após tratamento prévio com MK-801. Onde, (1)p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo B, (2)p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo S, (3)p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo MKS. O significado dos grupos foi colocado na legenda da tabela 2. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 6 animais por grupo

Vinte e cinco camundongos foram separados ao acaso em 5 grupos: B, S, A, MKS, MKA. E foram submetidos aos respectivos tratamentos conforme ilustrado na **figura 2**. Os animais foram submetidos à eutanásia 12 horas após o último desafio com OVA no dia D(15), e tiveram seus pulmões coletados e fixados para posterior análise conforme descrito no item 4.3.6.

Resultados

A **tabela 3** apresenta e a **figura 7** ilustra os efeitos da anfetamina sobre a desgranulação de mastócitos em brônquio intrapulmonar de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados.

As análises dos cortes histológicos indicaram que os animais do grupo basal (B) apresentaram mastócitos intactos no parênquima pulmonar (Figura 7A), próximos aos vasos sanguíneos. No grupo dos animais alérgicos tratados com salina (S), os mastócitos apresentavam alta porcentagem de desgranulação, apresentando seus grânulos citoplasmáticos metacromáticos dispersos no parênquima pulmonar, e leucócitos migrados para o tecido (Figura 7B). Por outro lado, os animais alérgicos tratados com anfetamina (Grupo A) apresentaram redução na desgranulação de mastócitos em comparação aos animais alérgicos tratados com solução salina (Grupo S) (Figura 7C). Já os animais do grupo MKS apresentaram uma menor quantidade de mastócitos desgranulados em relação aos do grupo S (Figura 7D), enquanto que os animais do grupo MKA apresentaram uma maior quantidade de mastócitos desgranulados em relação aos do grupo MKS (Figura 7E).

Tabela 3 - Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre a desgranula	ação de mastócitos
de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento p	révio com MK-801

Grupos	Mastócitos(células/mm²)					
	Total	Intacto	Desgranulados	% Desgran.		
В	2,2 ±0,2	2,2 ±0,2	0,0 ±0,0	0		
S	2,0 ±0,2	$0.7 \pm 0.2^{(1)}$	1,3 ±0,2 ⁽¹⁾	65		
Α	2,0 ±0,2	1,2 ±0,2 ⁽¹⁾	$0.8 \pm 0.2^{(1.2)}$	40		
MKS	2,2 ±0,2	1,5 ±0,3 ⁽¹⁾	$0.5 \pm 0.1^{(1.2)}$	23		
MKA	2,2 ±0,1	1,2 ±0,2 ⁽¹⁾	1,0 ±0,1 ⁽¹⁾	50		

Análise quantitativa dos cortes histológicos de pulmão mostrando mastócitos intactos e desgranulados. (1)p<0,05 em relação ao grupo B, (2)p<0,05 em relação ao grupo S. Onde, B: animal basal, S: animal alérgico tratado com salina, A: animal alérgico tratado com anfetamina, MKS: animal alérgico tratado com MK-801 e salina e MKA: animal alérgico tratado com MK-801 e anfetamina. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls. Os dados são expressos em média ± desvio padrão por mm² de 5 animais por grupo.

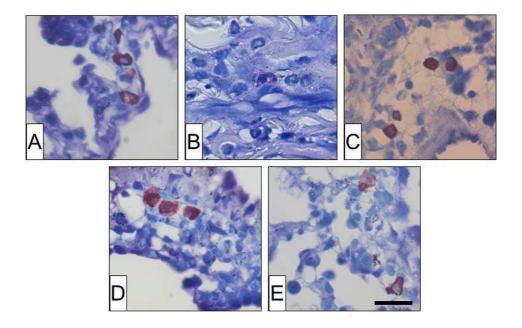


Figura 7 - Análise dos mastócitos no tecido pulmonar. Mastócitos no tecido pulmonar evidenciando grânulos metacromáticos no citoplasma. Animais do grupo B (Figura 7A) evidenciando mastócitos intactos. No grupo S (Figura 7B), observam-se vários mastócitos desgranulados, evidenciados pelos grânulos metacromáticos dispersos na matriz extracelular e leucócitos. Já os grupos A (figura 7C) e MKS (Figura7D) apresentam redução da desgranulação. Enquanto que o grupo MKA (Figura 7E) apresentam vários mastócitos desgranulados. Coloração: azul de toluidina. Barra: 5 μm

5.3 EXPERIMENTO 3 - AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO MK-801 NOS EFEITOS INDUZIDOS PELA ANFETAMINA SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-5, IL-10, IL-13 E INF-γ NO SOBRENADANTE DO LBA

Vinte e cinco camundongos foram separados ao acaso em 5 grupos: B, S, A, MKS, MKA, sendo submetidos ou não (Grupo B) aos respectivos tratamentos conforme ilustrado na figura 2. Os animais foram submetidos à eutanásia 12 horas após o último desafio com OVA no dia D(15), sendo coletado o sobrenadante do LBA para posterior determinação da produção de citocinas conforme descrito no item 4.3.7.

Resultados

A tabela 4 mostra os efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre a produção de IFN-y, IL-5, IL-13 e IL-10 no sobrenadante do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801. A análise estatística dos dados mostrou uma diminuição nos níveis de IL-5 (F=27,62; df=4/20; p<0,05), IL-13(F=9,28; df=4/20; p<0,05) e IL-10(F=4,230; df=4/20; p<0,05)4/20; p<0,05) no sobrenadante do LBA de animais alérgicos tratados com anfetamina (Grupo A) em relação aos animais alérgicos tratados com solução salina (Grupo S). Análise adicional mostrou que o tratamento prévio com MK-801 (Grupo MKA) preveniu a diminuição nos níveis de IL-13 e IL-10. Além disso, embora de forma não significante, uma tendência de aumento nos níveis de IFN-γ foi observada nos animais alérgicos tratados com anfetamina (Grupo A) em relação aos animais alérgicos tratados com salina (Grupo S). As figuras 8, 9, 10 e 11 ilustram estes resultados.

Tabela 4 - Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre a quantificação da produção de IFN-γ, IL-5, IL-13 e IL-10 no sobrenadante do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801

Parâmetros			Grupos		
	В	S	Α	MKS	MKA
IFN-γ	417±61	469±41	562±29	470±57	516±40
II-5	321±30	9043±25 ⁽¹⁾	7356±12 ^(1,2)	8470±12 ⁽¹⁾	5816±82 ^(1,3)
IL-13	9,3±4,0	95,0±20 ⁽¹⁾	9,1±9,2 ⁽²⁾	60±17 ⁽¹⁾	99,4±17 ^(1,3)
IL-10	188±21	274±23 ⁽¹⁾	159±18 ⁽²⁾	242±43 ⁽¹⁾	301±31 ^(1,3)

 $^{(1)}$ p<0,05 em relação ao grupos B, $^{(2)}$ p<0,05 em relação aos grupo S, $^{(3)}$ p< 0,05 em relação aos grupo MKS. Onde, B: animal basal, S: animal alérgico tratado com salina, A: animal alérgico tratado com anfetamina, MKS: animal alérgico pré tratado com MK-801 e tratado com salina e MKA: animal alérgico pré- tratado com MK-801 e tratado com anfetamina. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam a média±desvio padrão de 5 animais por grupo.

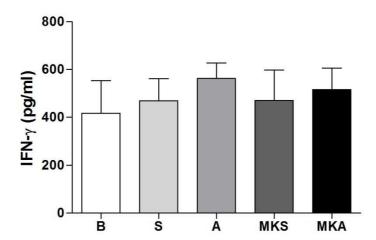


Figura 8 - Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre a quantificação da produção de IFN-γ no sobrenadante do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801. O significado dos grupos foi colocado na legenda da tabela 4. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 5 animais por grupo

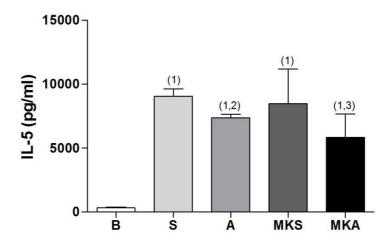
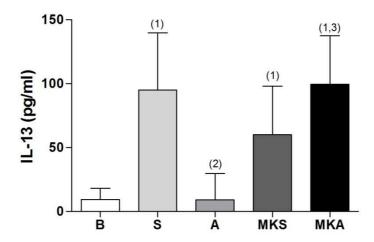


Figura 9 - Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre a quantificação da produção de IL-5 no sobrenadante do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801. Onde, (1)p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo B, (2)p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo S e (3)p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo MKS. O significado dos grupos foi colocado na legenda da tabela 4. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 5 animais por grupo



Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre a quantificação da produção de IL-13 no sobrenadante do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801. Onde, ⁽¹⁾p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo B, ⁽²⁾p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo S e (3)p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo MKS. O significado dos grupos foi colocado na legenda da tabela 4. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 5 animais por grupo

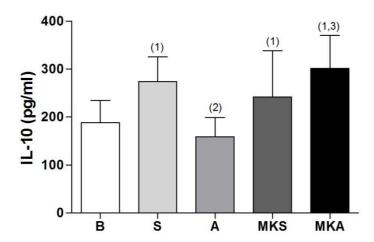


Figura 11 - Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre a quantificação da produção de IL-10 no sobrenadante do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801. Onde, (1)p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo B, (2)p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo S e (3)p<0,05 representa diferença quando comparado com o grupo MKS. O significado dos grupos foi colocado na legenda da tabela 4. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 5 animais por grupo

5.4 EXPERIMENTO 4 - AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO MK-801 NOS EFEITOS INDUZIDOS PELA ANFETAMINA SOBRE OS NÍVEIS DAS IMUNOGLOBULINAS IgE-TOTAL e IgE-OVA ESPECÍFICA NO SORO

Vinte e cinco camundongos foram separados ao acaso em 5 grupos: B, S, A, MKS, MKA, sendo submetidos ou não (Grupo B) aos respectivos tratamentos conforme ilustrado na figura 2. Os animais foram submetidos à eutanásia 12 horas após o último desafio com OVA no dia D(15), sendo coletado o soro para posterior determinação dos níveis de imunoglobulinas conforme descrito no item 4.3.7.

Resultados

A tabela 5 mostra os efeitos da administração de 2 mg/Kg de anfetamina sobre os níveis de IgE total e IgE OVA-específica no soro de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801. Os resultados mostraram que não houve diferença nos níveis de IgE total e IgE OVA-específica nos animais OVA sensibilizados e desafiados que foram tratados com anfetamina e MK-801. As figuras 12 e 13 ilustram estes resultados.

Tabela 5 - Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre os níveis de IgE total e IgE OVA-específica no soro de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801

Parâmetros	Grupos					
	В	S	Α	MKS	MKA	
IgE total	0,30±0,08	3,50±0,28 ⁽¹⁾	7,00±1,14 ⁽¹⁾	6,0±1,37 ⁽¹⁾	7,0±1,30 ⁽¹⁾	
IgE-OVA	10±1,00	2192±19 ⁽¹⁾	2189±29 ⁽¹⁾	3220±60 ⁽¹⁾	2798±18 ⁽¹⁾	

⁽¹⁾p<0,05 em relação ao grupos B. Onde, B: animal basal, S: animal alérgico tratado com salina, A: animal alérgico tratado com anfetamina, MKS: animal alérgico pré tratado com MK-801 e tratado com salina e MKA: animal alérgico pré tratado com MK-801 e tratado com anfetamina. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam a média ± desvio padrão de 5 animais por grupo.

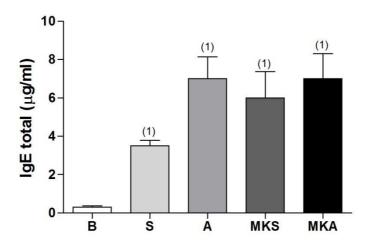


Figura 12 - Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre os níveis de IgE total no soro de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801. Onde, (1)p<0,05 em relação ao grupo B. O significado dos grupos foi colocado na legenda da tabela 5. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 5 animais por grupo

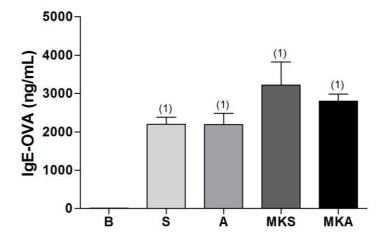


Figura 13- Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre os níveis de IgE- OVA específica no soro de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801. Onde, (1)p<0,05 em relação ao grupo B. O significado dos grupos foi colocado na legenda da tabela 5. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 5 animais por grupo

EXPERIMENTO 5 - AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO MK-801 NOS 5.5 EFEITOS INDUZIDOS PELA ANFETAMINA SOBRE A EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO L-SELECTINA, VCAM-1 E ICAM-1 EM CÉLULAS DO LBA

Quarenta camundongos foram separados ao acaso em 5 grupos: B, S, A, MKS, MKA, sendo submetidos ou não (Grupo B) aos respectivos tratamentos conforme ilustrado na figura 2. Os animais foram submetidos à eutanásia 12 horas após o último desafio com OVA no dia D(15), sendo coletado as células do LBA para posterior determinação da expressão das moléculas de adesão L-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 conforme descrito no item 4.3.8.

Resultados

A figura 14 A ilustra a porcentagem de células mononucleares e a figura 14 B ilustra a porcentagem de granulócitos, obtidos do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após tratamento prévio com MK-801 e tratamento com anfetamina. A análise estatística dos dados mostrou um aumento na porcentagem de expressão de GR-1⁺(granulócitos) (F=9,64; df=4/17; p<0,05) em células do LBA dos animais do grupo S em relação aos animais do grupo B. Além disso, o tratamento com anfetamina (grupo A) e MK-801 (grupo MKS) diminui a porcentagem de expressão de GR-1⁺ em relação ao grupo S. Nos animais do grupo MKA houve aumento na porcentagem de expressão de GR-1⁺ em relação ao grupo MKS. Observou-se também, um aumento na porcentagem de expressão de CD11b⁺ (células mononucleares) (F=5,06; df=4/23; p<0,05) nos grupos S, A, MKS e MKA em relação ao grupo B. A figura 14 C representa os valores em Dot plot.

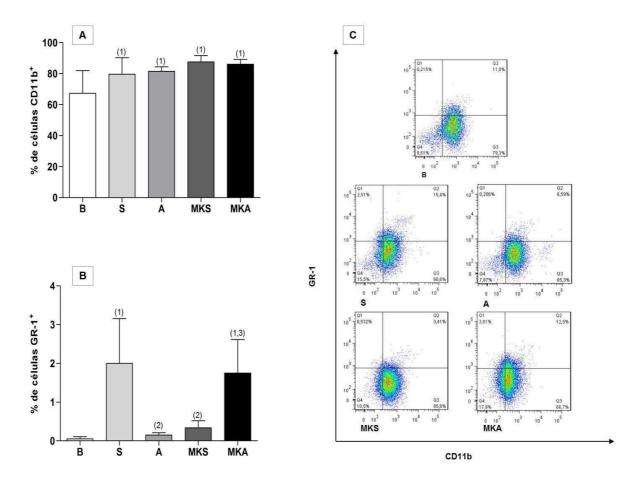
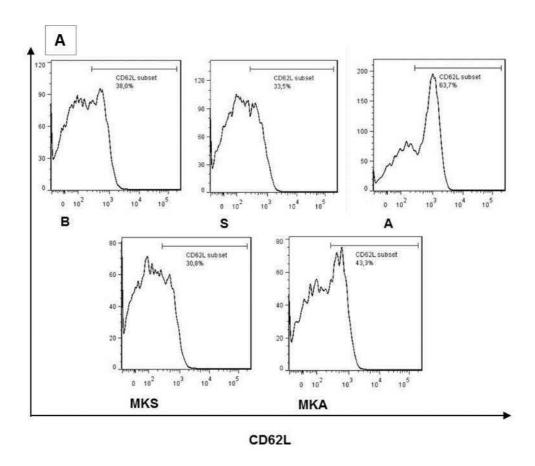


Figura 14 - Porcentagem de células mononucleares (A) e granulócitos (B) obtidos do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após tratamento prévio com MK-801 e tratamento com anfetamina. Os valores estão representados em Dot plot **(C)**. Onde, ⁽¹⁾p<0,05 em relação ao grupo B, ⁽²⁾p<0,05 em relação ao grupo S, ⁽³⁾p<0,05 em relação ao grupo MKS. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 8 animais por grupo

A figura 15 B ilustra a porcentagem de expressão de L-selectina em células mononucleares do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após tratamento prévio com MK-801 e tratamento com anfetamina. A análise estatística mostrou que houve um aumento na expressão de L-selectina (F=3,83; df=4/25; p<0,05) em células mononucleares do LBA dos animais do grupo A em relação aos do grupo S. A figura 15 A ilustra os valores representados em histogramas.



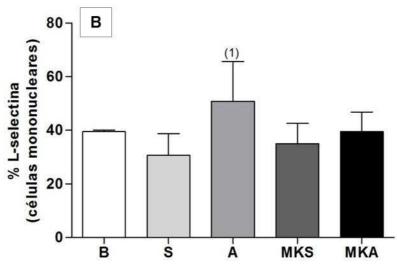
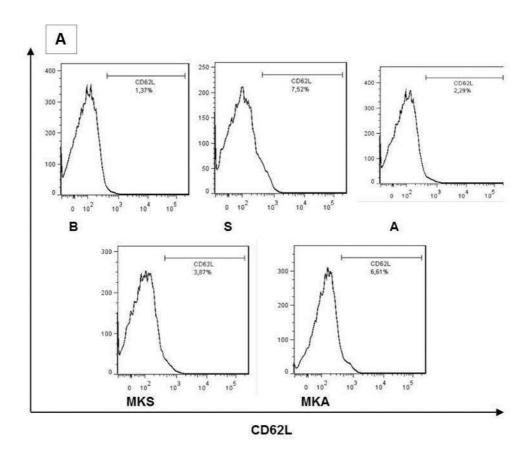


Figura 15 - Porcentagem de expressão de L-selectina (B) em células mononucleares do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após tratamento prévio com MK-801 e tratamento com anfetamina. Os valores estão representados em histogramas (A). Onde, (1)p<0,05 em relação ao grupo S. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 8 animais por grupo

A figura 16 B ilustra a porcentagem de expressão de L-selectina em granulócitos do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após tratamento prévio com MK-801 e tratamento com anfetamina. A análise estatística mostrou que houve uma redução na expressão de L-selectina (F=9,50; df=4/19; p<0,05) em granulócitos do LBA dos animais do grupo A e MKS em relação aos animais do grupo S. Os animais do grupo MKA apresentaram um aumento na expressão de L-selectina em granulócitos em relação aos animais do grupo MKS. A figura 16 A ilustra os valores representados em histogramas.



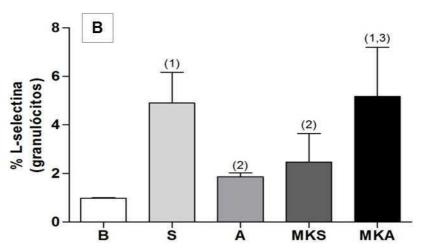
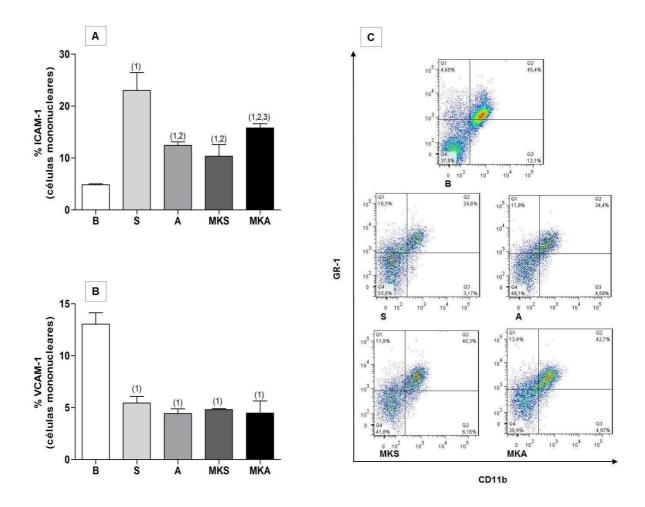


Figura 16 - Porcentagem de expressão de L-selectina (B) em granulócitos do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após tratamento prévio com MK-801 e tratamento com anfetamina. Os valores estão representados em histogramas (**A**). Onde, ⁽¹⁾p<0,05 em relação ao grupo B, ⁽²⁾p<0,05 em relação ao grupo S, ⁽³⁾p<0,05 em relação ao grupo MKS. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 8 animais por grupo

A figura 17 ilustra a expressão de ICAM-1 (A) e VCAM-1 (B) em células mononucleares do LBA. A análise dos dados mostrou que nos animais do grupo A e do grupo MKS houve uma redução na porcentagem de expressão de ICAM-1 em células mononucleares (F=48,4964; df=4/17; p<0,05) em relação aos animais do grupo S. Nos animais do grupo MKA observou-se aumento na porcentagem de expressão de ICAM-1 em relação aos animais do grupo MKS. Além disso, houve uma redução na porcentagem de expressão de VCAM-1 (F=89,73; df=4/23; p<0,05) em células mononucleares de animais do grupo S, A, MKS e MKA em relação aos do grupo B. A figura 17 C ilustra a representação dos valores em Dot plot.



Porcentagem de expressão de ICAM-1 (A) e VCAM-1 (B) em células mononucleares do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após tratamento prévio com MK-801 e tratamento com anfetamina. Os valores estão representados em Dot plot (C). Onde, ⁽¹⁾p<0,05 em relação ao grupo B, ⁽²⁾p<0,05 em relação ao grupo S, ⁽³⁾p<0,05 em relação ao grupo MKS. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 8 animais por grupo

A figura 18 ilustra a porcentagem de expressão de ICAM-1 (A) e VCAM-1 (B) em granulócitos do LBA. A análise estatística mostrou que nos animais do grupo A e do grupo MKS houve uma redução na porcentagem de expressão de ICAM-1 (F=11,96; df=4/21; p<0,05) em relação ao grupo S. Os animais do grupo MKA apresentaram uma maior expressão de ICAM-1 em relação aos animais do grupo MKS. Análise adicional mostrou que os animais do grupo S e A apresentaram redução na porcentagem de expressão de VCAM-1 (F=17,94; df=4/21; p<0,05) em relação aos animais do grupo B. Os animais do grupo MKS apresentaram aumento na porcentagem de expressão de VCAM-1 em relação aos animais do grupo S. Além disso, os animais do grupo MKA apresentaram redução na expressão de VCAM-1 em relação aos animais do grupo MKS. A figura 18 C ilustra a representação dos valores em Dot plot.

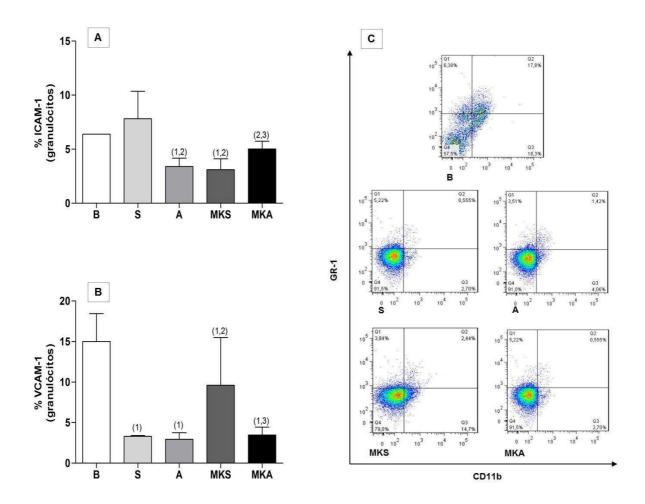


Figura 18 - Porcentagem de expressão de ICAM-1 (A) e VCAM-1 (B) em granulócitos do LBA de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após tratamento prévio com MK-801 e tratamento com anfetamina. Os valores estão representado em Dot plot (\mathbf{C}). Onde, $^{(1)}$ p<0,05 em relação ao grupo B, $^{(2)}$ p<0,05 em relação ao grupo S, $^{(3)}$ p<0,05 em relação ao grupo MKS. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 8 animais por grupo

5.6 EXPERIMENTO 6 - AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO MK-801 NOS EFEITOS INDUZIDOS PELA ANFETAMINA SOBRE A REATIVIDADE DAS VIAS AÉREAS IN VITRO

Trinta camundongos foram separados ao acaso em 5 grupos: B, S, A, MKS, MKA, sendo submetidos ou não (Grupo B) aos respectivos tratamentos conforme ilustrado na figura 2. Os animais foram submetidos à eutanásia 12 horas após o

último desafio com OVA no dia D(15). As traquéias foram isoladas e o tecido conjuntivo adjacente removido para registro isométrico de contrações em cubas para órgão isolado, conforme descrito no item 4.3.9.

Resultados

A figura 19 ilustra os efeitos da anfetamina sobre a reatividade in vitro à metacolina da traquéia de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados. Analisando-se estes dados, podemos observar um aumento de contração da traquéia isolada dos animais alérgicos tratados com salina (Grupo S), em relação aos animais do grupo basal (B). Análise adicional mostrou que a administração de anfetamina (Grupo A) diminuiu a contração da traquéia dos animais quando comparado aos animais alérgicos tratados com salina (Grupo S).

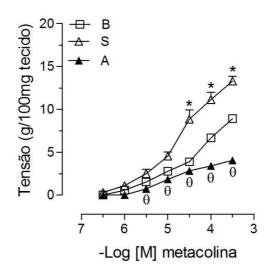
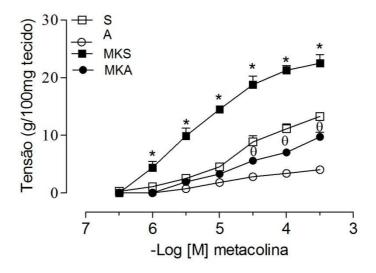


Figura 19 - Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre a reatividade a metacolina das vias aéreas in vitro de camundongos OVA sensibilizados e desafiados. Onde, *p<0,05 em relação ao grupo B, $^{\theta}$ p<0,05 em relação ao grupo S. Onde, B: animal basal, S: animal alérgico tratado com salina, A: animal alérgico tratado com anfetamina. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 6 animais por grupo

A figura 20 ilustra os efeitos da anfetamina sobre a reatividade in vitro à metacolina da traquéia de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados que receberam tratamento prévio com MK-801. Analisando-se os dados, podemos observar um aumento de contração da traquéia isolada dos animais do grupo MKS em relação aos animais grupo S. Análise adicional mostrou que o tratamento prévio com MK-801 (grupo MKA) reverteu a diminuição na contração da traquéia observada nos animais tratados com anfetamina (Grupo A).



Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre a reatividade a metacolina das vias aéreas in vitro de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801. Onde, *p<0,05 em relação ao grupo S, θp<0,05 em relação ao grupo A. Onde, S: animal alérgico tratado com salina, A: animal alérgico tratado com anfetamina, MKS: animal alérgico tratado com salina e MKA: animal alérgico tratado com anfetamina. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 6 animais por grupo

5.7 EXPERIMENTO 7 - AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE MK-801 E ANFETAMINA SOBRE OS NÍVEIS DE CORTICOSTERONA

Cinquenta camundongos foram separados ao acaso em 5 grupos: B, S, A, MKS, MKA. E foram submetidos aos respectivos tratamentos conforme ilustrado na figura 2. Os animais foram submetidos à eutanásia após a administração de anfetamina ou de MK-801, sendo coletado o plasma para posterior análise conforme descrito no item 4.3.10.

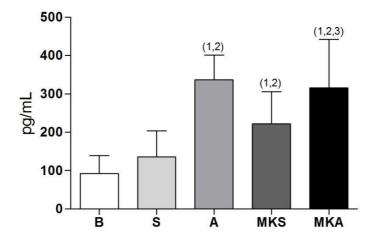
Resultados

A tabela 6 apresenta e a figura 21 ilustra os níveis de corticosterona medidos após a administração de MK-801 e anfetamina em camundongos. Analisando-se os dados podemos observar que a administração de anfetamina (Grupo A), aumentou (F=18,92; df= 4/54; p<0,05) os níveis de corticosterona em relação aos valores medidos no grupo S. Análise adicional mostrou que após a administração de MK-801 (Grupo MKS) houve aumento (p<0,05) nos níveis de corticosterona em relação aos do grupo S.

Tabela 6 - Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre os níveis de corticosterona no plasma de camundongos após o tratamento prévio com MK-801

Parâmetro	Grupos				
	В	S	Α	MKS	MKA
Corticosterona	92,14 ±	135,5 ±	336,3 ±	221,9 ±	315,7 ±
(pg/mL)	46,6	68,0	65,1 ^(1,2)	83,8(1,2)	126,8(1,2,3)

⁽¹⁾p<0,05 em relação ao grupo B, (2)p<0,05 em relação ao grupo S, (3)p<0,05 em relação ao grupo MKS. Onde, B: animal basal, S: animal tratado com salina, A: animal tratado com anfetamina, MKS: animal pré tratado com MK-801 e tratado com salina e MKA: animal pré- tratado com MK-801 e tratado com anfetamina. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam a média ± desvio padrão de 10 animais por grupo.



Efeitos da administração de 2mg/Kg de anfetamina sobre os níveis de corticosterona no plasma de camundongos após o tratamento prévio com MK-801. Onde, ⁽¹⁾p<0,05 em relação ao grupo B, ⁽²⁾p<0,05 em relação ao grupo S, ⁽³⁾p<0,05 em relação ao grupo MKS. O significado dos grupos foi colocado na legenda da Tabela 6. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Os dados representam média ± desvio padrão de 10 animais por grupo

6 DISCUSSÃO

Trabalhos anteriores de nosso laboratório mostraram a participação neuroendócrina e noradrenérgica nos efeitos induzidos pela anfetamina sobre parâmetros da inflamação alérgica pulmonar. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a participação glutamatérgica nos efeitos induzidos pela anfetamina sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar de camundongos OVA sensibilizados e desafiados.

Para avaliarmos a participação glutamatérgica nos efeitos induzidos pela anfetamina, administramos o MK-801 (0,25 mg/Kg), um antagonista dos receptores glutamatérgico do tipo NMDA, 30 minutos antes da administração de anfetamina (2mg/Kg). Os resultados mostraram que os efeitos anteriormente observados após o tratamento com anfetamina, ou seja, a diminuição do número total de leucócitos bem como o de eosinófilos e neutrófilos do lavado broncoalveolar e o aumento no número total de leucócitos na medula óssea, não foram mais observados após o tratamento MK-801 + anfetamina. Neste sentido, observamos que o número de leucócitos no grupo MK-801+ anfetamina permaneceu semelhante ao grupo controle (tratado com salina).

Deste modo, sugerimos, em um primeiro momento, que o sistema glutamatérgico via receptores NMDA tenha participado dos efeitos da anfetamina sobre a migração celular para o LBA. Neste sentido, é possível supor que tenha ocorrido uma interação entre os sistemas dopaminérgico e glutamatérgico no SNC fato já demonstrado em outras situações (KARLER et al., 1990; THOMAS; KUHN, 2005). Desta forma, uma hipótese explicativa para nossos achados seria a de que o MK-801 estaria modulando os efeitos da anfetamina sobre a migração celular por modificar os efeitos da mesma no SNC. Sugerimos, anteriormente que os efeitos da anfetamina sobre a migração celular envolveriam a liberação de corticosterona bem como de catecolaminas (LIGEIRO-OLIVEIRA et al., 2004; LIGEIRO DE OLIVEIRA 2008).

O número e a proporção de leucócitos sanguíneos caracterizam uma representação importante do estado de ativação do sistema imune e do padrão de distribuição de células imunes no corpo. Neste sentido, fatores neuroendócrinos desencadeados após a administração tanto de MK-801 como da anfetamina poderiam ter modulado o tráfego de leucócitos resultando numa redistribuição desses entre o espaço broncoalveolar, o sangue e a medula óssea e outros compartimentos imunes (OTTAWAY; HUSBAND, 1994; STEFANSKI, 2000; ENGLER et al., 2004; AZPIROZ et al., 2008).

Assim, os resultados presentemente obtidos e relativos à administração de anfetamina concordam com aqueles obtidos por Ligeiro de Oliveira et al. (2004). Do mesmo modo, diversos estudos conduzidos com animais de laboratório e com seres humanos, têm revelado que o uso dos análogos da anfetamina interfere com a imunidade por alterar principalmente as atividades do eixo HPA e/ou a atividade do SNAS (CONNOR et al., 1998; PACIFICI et al., 1999; PACIFICI et al., 2002; CONNOR, 2004; DE PAULA et al., 2009).

É de amplo conhecimento que os glicocorticóides e as catecolaminas liberados em consequência de um estímulo estressor são potentes imunomoduladores, sendo capazes de direcionar o balanço Th₁/Th₂ para uma resposta do tipo Th₂. Neste sentido, a literatura vem mostrando que o estresse agudo induz rápida e reversível mudança na distribuição de subpopulações de leucócitos do sangue periférico, sendo a corticosterona e as catecolaminas os principais mediadores dessas mudanças (DHABHAR et al., 1996; ELENKOV et al., 2000; ZHANG et al., 2009). Segundo Dhabhar (1994), os animais estressados apresentam níveis elevados de corticosterona no plasma, acompanhados por significante diminuição no número e porcentagem de linfócitos e aumento no número e porcentagem de neutrófilos; sendo estes efeitos reduzidos em animais adrenalectomizados.

Uma vez que a anfetamina reduziu o número de leucócitos no LBA e tendo em vista que o tratamento MK-801 + anfetamina reverteu essa diminuição, o passo seguinte deste trabalho foi avaliar como estaria a expressão de moléculas de adesão dos leucócitos colhidos no LBA. De fato, sabe-se que o recrutamento de leucócitos a partir da medula óssea, passando pelos vasos sanguíneos e por fim

chegando a um foco inflamatório é primordial para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória sendo importante para a sequência de eventos que levam às doenças inflamatórias de origem alérgica (KELLY; HWANG; KUBES, 2007). Para que ocorra a migração celular de leucócitos da circulação para o foco inflamatório é essencial a interação leucócito-endotélio mediada pelas moléculas de adesão. A molécula de adesão ICAM-1 está envolvida com a transmigração vascular de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos (KELLY; HWANG; KUBES, 2007). Já a L-selectina, é uma molécula de adesão expressa nos leucócitos, necessária para o rolamento de leucócitos no endotélio vascular, fato importante no início do processo de extravasamento vascular e, essencial para o desenvolvimento da inflamação das vias aéreas (ROSEN, 2006). Essas duas moléculas atuando sinergicamente têm sido descritas como modulatórias do rolamento de leucócitos no endotélio (STEEBER et al., 1999).

Iniciamos nossos trabalhos pela avaliação da expressão das moléculas de adesão L-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 em células mononucleares e granulócitos do LBA provenientes de animais que receberam tratamento com MK-801 e foram tratados ou não com anfetamina.

Nossos resultados mostraram que os granulócitos do LBA dos animais que receberam tratamento com MK-801 + anfetamina expressavam uma maior porcentagem de L-selectina e ICAM-1 em relação aos que foram tratados apenas com anfetamina. Desta forma, quer nos parecer que um maior número de células conseguiram rolar e transmigrar pelo endotélio e, consequentemente, migrar e chegar ao LBA. Justificaríamos, desta forma, o maior número de eosinófilos e neutrófilos encontrado no LBA dos animais tratados com MK-801 + anfetamina em relação àqueles que receberam apenas anfetamina.

Curiosamente, no entanto, o tratamento *per se* com MK-801 foi capaz de diminuir a expressão de ICAM-1 em células mononucleares e granulócitos e de L-selectina em granulócitos do LBA, resultando este fato em diminuição do número de células no LBA. Este resultado corrobora com dados da literatura que mostraram que o bloqueio do receptor NMDA pelo MK-801 foi capaz de inibir a inflamação, reduzindo significativamente a transmigração celular via diminuição da expressão de ICAM-1 (TEJERO-TALDO et al., 2004).

No mesmo sentido, observamos que o tratamento apenas com anfetamina diminuiu a porcentagem de expressão de L-selectina e ICAM-1 em granulócitos tomados do LBA, fato este que justificaria a menor migração destas células para o pulmão dos camundongos OVA sensibilizados e desafiados que foram tratados com anfetamina.

Quer nos parecer, então, e mais uma vez que o uso de MK-801 + anfetamina tenham efeitos opostos sobre as moléculas de adesão L-selectina e ICAM-1 aos que produzem quando administrados isoladamente. Mais uma vez um efeito contrário da associação em relação aos do MK-801 e de anfetamina usados isoladamente. Esta coincidência parece reforçar a idéia de que juntos MK-801 + anfetamina tenham efeitos opostos aos que produzem isoladamente, provavelmente por interagirem de forma diferenciada com o eixo HPA e/ou SNAS.

Portanto, a maior expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e de L-selectina em granulócitos de animais tratados que receberam tratamento com MK-801 + anfetamina poderia justificar o maior número de células encontrado no LBA. De fato, poderíamos sugerir que tanto o MK-801 como a anfetamina estariam modulando a interação leucócito-endotélio via aumento dos níveis de corticosterona ou de catecolaminas. De fato, os glicocorticóides exercem um efeito anti-inflamatório e imunosupressivo que incluem a redução na atividade funcional de fagócitos e da expressão de moléculas de adesão (GOEBEL; MILLS, 2000; CAMERON; HAMID, 2001; PITZALIS; PIPITONE; PERRETTI, 2002). Neste sentido mostrou-se que, os glicocorticóides endógenos modulam a interação leucócito-endotélio, interferindo com a expressão de L-selectina (CAVALCANTI et al., 2006). Por outro lado, as catecolaminas também modulam a aderência de leucócitos, estimulando a liberação de moléculas de adesão das células endoteliais por mecanismos envolvendo os receptores α e β adrenérgicos (VAN TITS et al., 1990; REDWINE et al., 2003).

Tendo em vista que observamos um aumento na migração celular bem como na expressão de moléculas de adesão no grupo tratado com MK-801 + anfetamina o próximo experimento avaliou a atividade funcional dessas células.

As citocinas Th2, incluindo a IL-4, IL-5 e IL-13, têm papel importante na patogênese da inflamação e hiperreatividade das vias aéreas em modelos animais

de asma (FINKELMAN et al., 2010). Estas citocinas são produzidas por vários tipos de células, como as células T, mastócitos, macrófagos e células epiteliais que são encontrados ou se infiltram no microambiente pulmonar. Tem sido relatado aumento da produção de IL-4, IL-5 e IL-13 em uma série de reações alérgicas, incluindo-se aqui a asma (LEWIS et al., 2009). Sabe-se ser a IL-4 necessária para a diferenciação de células T em células do tipo Th2, sendo este fato primordial para a mudança do isotipo IgE em células B (ROBINSON et al., 1992). A IL-5 é uma citocina que contribui para a ativação e sobrevida dos eosinófilos e seu nível é elevado na asma de origem alérgica (HOGAN; KOSKINEN; FOSTER, 1997). A IL-13 é uma citocina pleiotrópica, produzida pelas células Th2 e por outros tipos de células; esta citocina está envolvida no desenvolvimento da inflamação alérgica pulmonar (WILLS-KARP, 2004). As funções atribuídas a IL-13 muitas vezes, se sobrepõem àquelas da IL-4, visto que o receptor celular que reconhece a IL-13 é capaz de se ligar tanto a IL-4 como a IL-13 com alta afinidade (ZURAWSKI; DE VRIES, 1994). Por exemplo, a IL-13 regula a mudança de isotipo em células B, a função dos eosinófilos e, também, aumenta a produção de muco pelas células caliciformes (SHIM et al., 2001). A IL-10, por sua vez, é uma citocina antiinflamatória, produzida pelos linfócitos Th₁ e Th₂, monócitos e macrófagos; atuando na inibição da produção de citocinas por fagócitos mononucleares, células natural killer e linfócitos Th₂. Mostrou-se que a IL-10 suprime a atividade de mastócitos e eosinófilos e que reduz a síntese de IgE (SUGITA et al., 2003; TAILOR; TAMURA; OZATO, 2006)

Neste contexto, relatou-se ser a eosinofilia das vias aéreas fator essencial para o desenvolvimento de uma inflamação alérgica nestas vias (DUEZ et al., 2004). O recrutamento de eosinófilos e a subsequente ativação dessas células nas vias aéreas são reguladas principalmente pela IL-5 e IL-13, bem como pelas quimiocinas e moléculas de adesão como a eotaxina e VCAM-1 (BUSSE; LEMANSKE, 2001).

Nossos resultados mostraram que o MK-801 *per se* diminuiu o número de células no LBA em relação aos animais tratados com salina. Porém essa diminuição no número de células não foi acompanhada pela diminuição nos níveis de citocinas IL-5, IL-13 e IL-10 no LBA como observado nos animais tratados apenas com anfetamina. Portanto, do ponto de vista da presença de moléculas mediadoras da inflamação alérgica pulmonar, pode-se dizer que o MK-801 *per se* não apresenta um

efeito anti-inflamatório, pois apesar de observarmos um menor número de células no LBA, estas células estavam mais ativadas e liberando assim mais citocinas.

Uma vez que no grupo tratado somente com anfetamina observamos uma diminuição das citocinas IL-5, IL-10 e IL-13 no LBA, pode-se dizer que o tratamento MK-801 + anfetamina tenha revertido a diminuição da produção das citocinas IL-10 e IL-13. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, que esta aumentada no LBA de animais alérgicos (TAILOR; TAMURA; OZATO, 2006). Enquanto que a IL-13 induz a expressão de VCAM-1 e de eotaxina no epitélio das vias aéreas, facilitando assim o recrutamento de eosinófilos para as vias aéreas (BOCHNER et al., 1995). Uma vez que essas duas citocinas contribuem para a migração celular, estes resultados justificariam o maior número de leucócitos encontrado no LBA dos animais tratados com MK-801 + anfetamina.

Como é de amplo conhecimento, os glicocorticóides suprimem a transcrição de citocinas (FERNANDES; VALERA; ANSELMO-LIMA, 2008). Lamas, Leon e Schleimer (1991) mostraram que os glicocorticóides reduzem a transcrição gênica para expressão de citocinas interferindo com a diferenciação, ativação, quimiotaxia e capacidade de auto-regulação dos eosinófilos. No entanto, no caso do tratamento com MK-801 isoladamente, observamos aumento dos níveis de corticosterona sem que tenha havido redução nos níveis de IL-10 e IL-13. Fato que mais uma vez sugere uma ação independente para o MK-801.

Com relação a produção de anticorpos, nossos resultados mostraram ausência de diferenças tanto nos níveis de IgE como de IgE-OVA específica entre os diferentes grupos de animais alérgicos. Esse resultado mostra que tanto o tratamento com MK-801 como aquele com anfetamina *per se* ou em conjunto não mudou a produção de IgE anti-OVA, isto é, aquela que foi induzida no dia da sensibilização dos animais com solução de OVA. Desta forma, é muito concebível de se supor que as alterações da migração celular encontrados nos animais alérgicos tratados com MK-801, anfetamina ou com a combinação desses fármacos não esteja associada à diminuição na capacidade da IgE de se ligar à superfície dos mastócitos e desencadear a resposta inflamatória, visto que os níveis de IgE-OVA entre os diferentes grupos permaneceram os mesmos.

De Oliveira et al. (2011) mostraram, através da reação de anafilaxia cutânea passiva (PCA), que os títulos de IgE não foram modificados pela administração de anfetamina. Neste sentido, o tratamento com anfetamina não foi capaz de diminuir a síntese de IgE, que ao se ligar à superfície do mastócito induziria uma menor desgranulação desta célula e, por fim, diminuiria a liberação de mediadores inflamatórios.

Portanto a redução ou aumento na migração celular observado após o tratamento com anfetamina, MK-801 ou com a associação dos fármacos não estaria associada a uma menor habilidade, de ligação da IgE à superfície dos mastócitos e ao desencadeamento da resposta inflamatória.

Além da migração celular para as vias aéreas, o modelo murino de asma experimental envolve, também, alterações na reatividade das vias aéreas e ativação de células residentes (células epiteliais, macrófagos e mastócitos), que secretam mediadores químicos responsáveis, entre outras funções, pela constrição das vias aéreas e pelo influxo de leucócitos para o foco inflamatório (MARTIN; FREVERT, 2005). Assim, pareceu-nos relevante avaliar também como estaria a reatividade *in vitro* das vias aéreas de camundongos OVA sensibilizados e desafiados após o tratamento prévio com MK-801. Nossos dados mostraram que o MK-801 reverteu à diminuição da contração da traquéia observado nos animais que receberam anfetamina após o desafio com a metacolina.

A ativação de receptores NMDA tem sido associada ao controle do tônus da musculatura lisa brônquica (NASSAR et al., 2010); de fato, o glutamato, um agonista de receptores glutamatérgicos NMDA inibiu a contração das vias aéreas enquanto que o MK-801 estimulou a contração da musculatura lisa das vias aéreas em resposta à acetilcolina (NASSAR et al., 2010). Desta forma, poderíamos sugerir que a reversão agora observada da diminuição da contração da traquéia observada nos animais que receberam tratamento com MK-801 + anfetamina decorra do balanceamento de efeitos opostos, ou seja, do tratamento com MK-801 que induz a contração e com a anfetamina que induz o relaxamento da musculatura lisa da traquéia em resposta ao desafio com a metacolina.

Como relatado, observamos um maior influxo de células para o espaço broncoalveolar nos animais alérgicos que receberam tratamento com MK-801 + anfetamina. Por outro lado, observamos neste mesmo grupo de animais uma menor contratilidade do músculo liso da traquéia em relação ao observado em animais alérgicos que receberam tratamento prévio com MK-801 e foram tratados com salina. Neste sentido, e segundo a literatura, o aumento do influxo de células para o espaço broncoalveolar não necessariamente precisa coexistir com um aumento da reatividade das vias aéreas, visto que esses eventos podem ocorrer de forma dissociada (TOURNOY et al., 2000; LINO DOS SANTOS FRANCO et al., 2006).

Os efeitos de agonistas muscarínicos sobre a traquéia se assemelham aos de uma estimulação parassimpática. Neste sentido, a metacolina é utilizada como ferramenta experimental em estudos de reatividade das vias aéreas, por se ligar aos receptores muscarínicos; estes quando estimulados, ativam a fosfolipase do tipo C liberando o diacilglicerol (DAG) e o inositol-trifosfato (IP₃) resultando em um aumento das concentrações intracelulares de cálcio, induzindo contração da musculatura lisa (DEKKER; PARKER, 1997). Os receptores de serotonina, em especial, o 5HT_{2A} estão também ligados à ativação da fosfolipase C e, portanto, promovem à formação do IP₃/DAG, intensificando a contração do músculo liso (ALLEN; YADAV; ROTH, 2008). Desta forma, sendo a anfetamina um potente liberador de serotonina, podemos descartar a participação da serotonina nos efeitos da anfetamina sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas de camundongos OVA sensibilizados e desafiados; possivelmente outros mediadores como por exemplo, a adrenalina e a noradrenalina estariam envolvidas com a diminuição da contração da traquéia observados.

Nossos resultados mostraram um aumento da contração do músculo liso da traquéia no grupo dos animais alérgicos tratados com salina. Provavelmente, este aumento de reatividade esteja relacionado à secreção de mediadores inflamatórios pelos mastócitos. Neste sentido, sabe-se que a histamina contribui com a contração da musculatura lisa das vias aéreas, sendo que a histamina liberada por mastócitos ativados atua em receptores H₁ provocando a contração do músculo liso das vias aéreas, constituindo um dos principais mediadores que causam redução do fluxo de ar na asma brônquica (LINDSTEDT; KOVANEN, 2006).

Observamos nos animais alérgicos tratados apenas com MK-801 uma maior contratilidade do músculo liso da traquéia, em relação ao observado em animais alérgicos tratados com salina. Desta forma, poderíamos supor que o MK-801, ao agir diretamente nos mastócitos tenha modificado sua ativação, alterado a sua desgranulação. De fato, ao ser sensibilizado, os mastócitos secretam em poucos minutos mediadores inflamatórios que incluem a histamina, citocinas, proteases, eicosanoides e serotonina (RIVERA; GILFILLAN, 2006). Os mastócitos contribuem para o desenvolvimento da resposta alérgica por ativação de células residentes e células vasculares para secretar mediadores e induzir o recrutamento celular para o foco inflamatório (WEISSLER; MEKORI; MOR, 2008; CRIVELLATO; RIBATTI, 2010).

Desta forma, visto ser a desgranulação de mastócitos o componente central das doenças alérgicas, avaliamos os efeitos do tratamento com anfetamina, e a participação do MK-801 sobre o número e a atividade de mastócitos pulmonares. Nossos dados mostraram nos animais alérgicos tratados com salina, uma alta porcentagem de mastócitos desgranulados isto é, apresentando grânulos citoplasmáticos metacromáticos dispersos no parênquima pulmonar e leucócitos migrados para o tecido. Por outro lado, nos animais alérgicos tratados com anfetamina, observamos redução da desgranulação de mastócitos. Neste sentido, nossos resultados concordam e reforçam aqueles anteriormente obtidos em nossos laboratórios após tratamento agudo com anfetamina (DE OLIVEIRA et al., 2011) e MDMA (STANKEVICIUS et al., 2010) em modelos de inflamação alérgica pulmonar. Esses dados em seu conjunto sugerem que a redução na migração de células para o foco inflamatório e a diminuição na permeabilidade vascular após o tratamento com anfetamina poderiam ser, em parte, decorrentes de ações das catecolaminas e dos glicocorticóides liberados após a administração da anfetamina sobre a desgranulação de mastócitos. De fato, as catecolaminas (UNDERWOOD et al., 1997) bem como os glicocorticóides (ZHOU et al., 2008) são descritos como capazes de diminuir a desgranulação de mastócitos.

Neste sentido, os animais alérgicos tratados apenas com MK-801 apresentaram uma menor quantidade de mastócitos desgranulados em relação aos animais tratados com salina. Este dado corrobora com os resultados de Purcell et al. (1996) que mostraram que a administração de MK-801 inibiu a secreção de

histamina de mastócitos. Diante desse dado, podemos sugerir que a diminuição na desgranulação de mastócitos de animais tratados com MK-801, tenha diminuído a liberação de mediadores inflamatórios, dentre eles a histamina e consequentemente diminuído a migração celular para o LBA. De fato a histamina liberada em consequência da desgranulação do mastócito é o principal mediador da inflamação aguda e das reações alérgicas. Essas ações são mediadas principalmente pelos receptores H₁ de histamina, que incluem a vasodilatação, o aumento de permeabilidade vascular, edema e, no tecido pulmonar, a broncoconstrição.

Por outro lado, e em relação a animais do grupo controle, não observamos diferença na desgranulação de mastócitos entre os animais que foram tratados com MK-801 + anfetamina (50% dos mastócitos desgranulados) em relação aos animais tratados com salina (65% dos mastócitos desgranulados). Desta forma, e mais uma vez, este resultado mostra que a combinação dos fármacos, MK-801 + anfetamina, apresenta efeito contrário sobre a desgranulação se comparado ao observado no tratamento com MK-801 e anfetamina isoladamente. Ou seja, o efeito da anfetamina e do MK-801, diminuindo a desgranulação de mastócitos não é mais observado após o tratamento conjunto. De qualquer forma, os dados são coerentes uma vez que, neste grupo de animais o maior número de mastócitos desgranulados resultaria em uma maior liberação de mediadores inflamatórios, o que levaria, consequentemente, a um aumento do número de eosinófilos e neutrófilos no LBA.

A literatura tem relatado que a administração do MK-801 efetivamente previne ou atenua uma variedade de respostas induzidas pela anfetamina tais como a sensibilização comportamental, neurotoxicidade, degeneração neuronal, expressão gênica e a proliferação de linfócitos indicando que a ativação do receptor NMDA é necessária para o desenvolvimento e expressão de respostas induzidas pela anfetamina (WOLF; KHANSA, 1991; BRISTOW et al., 1994; WANG; DAUNAIS; MCGINTY, 1994; KARLER et al., 1995; VANDERSCHUREN; KALIVAS, 2000; ASSIS et al., 2009).

Neste sentido, poderíamos sugerir que o efeito da anfetamina sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar também implicaria na ativação de receptores NMDA, visto que, o MK-801 mostrou-se capaz de modular as respostas induzidas pela anfetamina sobre a migração de leucócitos, expressão de moléculas de

adesão, liberação de citocinas, reatividade das vias aéreas e desgranulação de mastócitos.

Têm sido relatadas a participação tanto dos glicocorticóides como das catecolaminas na modulação das respostas observadas após administração de anfetamina. Swerdlow et al. (1993) mostraram que a administração aguda de anfetamina nas doses de 1,0 e 5,0 mg/Kg aumentou os níveis plasmáticos de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) e de corticosterona, o que configurou ocorrência de uma ativação do eixo HPA. De fato, resultados prévios obtidos em nossos laboratórios, utilizando manipulação farmacológica, mostraram que o tratamento prévio com metirapona, um inibidor da síntese de corticosterona, preveniu em parte, a inibição da migração de células inflamatórias induzidas pela anfetamina em um modelo de inflamação alérgica pulmonar (LIGEIRO-OLIVEIRA et al., 2004); mais que isto, mostrou-se após administração de anfetamina na dose de 1 mg/Kg, produziu um aumento significante dos níveis de corticosterona plasmáticos (LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2008). Neste mesmo sentido, Stankevicius et al. (2010) confirmaram a participação da corticosterona na modulação da distribuição dos leucócitos após o uso do ecstasy (MDMA), um derivado anfetamínico. De fato, o pré-tratamento com RU-486, um antagonista dos receptores de glicocorticóides, alterou o padrão da resposta ao tratamento com ecstasy (MDMA); isto é, o RU-486 reverteu a redução induzida pelo MDMA no número de leucócitos presentes no LBA em um modelo de inflamação alérgica pulmonar.

Contudo, em nossos experimentos ao avaliarmos os níveis plasmáticos de corticosterona nos grupos de animais que foram tratados com MK-801 + anfetamina, observamos que eles se encontravam estatisticamente semelhantes aos encontrados no grupo de animais tratados apenas com anfetamina. Uma vez que o MK-801 per se, assim como a anfetamina também aumentaram os níveis de corticosterona, em relação aos animais do grupo controle, é possível que a associação dos fármacos não tenha aumentado ainda mais os níveis de corticosterona uma vez que isoladamente já estariam produzindo seus efeitos máximos. Neste sentido, o tratamento com MK-801 foi capaz de per se diminuir o número total bem como o número de eosinófilos e neutrófilos no LBA, dados que concordam com aqueles obtidos por Da Cunha et al. (2010). Este resultado do MK-801, embora surpreendente em relação ao que produziu em associação com a

anfetamina, é coerente do ponto de vista da participação do eixo HPA. De fato, assim como Baumann, Rothman e Ali (2000) observamos que o tratamento com MK-801 *per se*, aumentou os níveis plasmáticos de corticosterona em relação aos animais do grupo controle. Assim, uma vez que o MK-801 reverteu os efeitos da anfetamina sobre a migração, é possível que outro mecanismo, que não o da corticosterona, esteja a este fato relacionado. Neste sentido, mostrou-se que o agonista de receptores glutamatérgico do tipo NMDA, o N-metil-d-aspartato estimula a liberação de catecolaminas no plasma, enquanto que o MK-801 reduziu este efeito (OKADA et al., 2008). Desta forma, sugerimos que não apenas a corticosterona liberada em resposta a ativação do eixo HPA participe da modulação dos efeitos induzidos pelo MK-801, mas também o SNAS através da liberação de catecolaminas.

Neste sentido, a participação das catecolaminas na modulação dos efeitos da anfetamina sobre o sistema imune também têm sido considerada. Em nossos laboratórios, observamos que o tratamento com reserpina, uma droga que inibe a captação de noradrenalina pelas vesículas presentes nas terminações nervosas, atenuou os efeitos da anfetamina na migração celular para o LBA em idêntico modelo experimental (LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2008).

Neste contexto, o MK-801 por diminuir a liberação de catecolaminas, estaria antagonizando os efeitos da anfetamina sobre a atividade do SNAS, e consequente a migração de leucócitos para o LBA. Desta forma, uma hipótese que poderia explicar os efeitos opostos do tratamento com MK-801 + anfetamina é que o tratamento com MK-801 reduzindo os níveis de catecolaminas, liberadas pela anfetamina produziria um efeito que culminaria com um aumento na migração celular para o LBA. Se verdadeira, esta hipótese implica que a atividade do SNAS sobre a migração celular após uso do MK-801 + anfetamina tenha se sobressaído àquela que ambos exercem via aumento da liberação de corticosterona. Neste sentido, vias neurais diferenciadas existentes no SNC para o glutamato e para as catecolaminas em direções ao eixo HPA e/ou centros hipotalâmicos do SNAS poderiam justificar os presentes achados. Futuros trabalhos dosando os níveis de catecolaminas plasmáticos após a administração do MK-801 *per se* ou do MK-801 + anfetamina poderiam trazer informações adicionais.

Os nossos resultados mostraram que o glutamato possui papel importante nos efeitos induzidos pela anfetamina. De fato, diversos autores demostraram que a administração de anfetamina aumenta a liberação de glutamato no estriato (DEL ARCO et al., 1999; RAWLS; MCGINTY, 2000). De forma interessante, esse aumento também foi observado na periferia, onde o glutamato possui efeito anti-inflamatório (LEE et al., 2011). Este trabalho demonstrou que o poli ácido glutâmico-y (PGA-y), um polímero de glutamato, promoveu um desvio para um perfil Th1 de resposta, inibindo o desenvolvimento de células Th2 em modelo de asma experimental. De forma interessante, já foi demonstrado também que a utilização do MK-801 in vivo foi capaz de reduzir o grau de encefalomielite experimental auto-imune (EAE) (BOLTON; PAUL, 1997). Por outro lado, cada vez mais estudos demonstram a expressão de receptores glutamatérgicos NMDA em células do sistema imune, como células T e células dendríticas (MASHKINA et al., 2010). Neste sentido, já foi demonstrado que células dendríticas esplênicas secretam grandes quantidades de glutamato durante a apresentação antigênica. Desta forma, não podemos descartar a possibilidade de que o glutamato esteja também agindo diretamente em células do sistema imune. Neste contexto, estudos complementares acerca da dosagem dos níveis de glutamato induzida pela anfetamina durante o processo de inflamação alérgica pulmonar poderiam trazer resultados adicionais.

Nossos resultados, como um todo, sugerem que o aumento do número de leucócitos observado no LBA de animais OVA sensibilizados e desafiados e tratados com MK-801 + anfetamina tenha sido decorrente: do aumento da expressão de moléculas de adesão L-selectina e ICAM-1 em células do LBA, do aumento da liberação das citocinas IL-13 e IL-10 no LBA e da maior desgranulação de mastócitos pulmonares. Tomados em seu conjunto, quer nos parecer que os efeitos induzidos pela anfetamina implicam na ativação do sistema glutamatérgico via receptores NMDA. Possivelmente, as diferenças dos efeitos do MK-801, da anfetamina ou a combinação de fármacos se devam a uma modulação diferenciada do eixo hipotálamo pituitária adrenal (HPA) e o sistema nervoso autônomo simpático (SNAS). Não se descarta, também, uma ação direta do MK-801 em células imunes. Futuros trabalhos poderão trazer informações que permitam melhor caracterizar os mecanismos de ação inerentes aos interessantes efeitos agora relatados.

7 CONCLUSÕES

As conclusões serão divididas em específicas e gerais

7.1 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

O tratamento com MK-801 antes da administração de anfetamina em camundongos OVA sensibilizados e desafiados:

- ✓ Reverteu a diminuição no número de leucócitos totais bem como o número de eosinófilos e neutrófilos no LBA;
- ✓ Reverteu a diminuição da porcentagem de expressão das moléculas Lselectina e ICAM-1 em granulócitos do LBA;
- ✓ Reverteu a diminuição das citocinas IL-10 e IL-13 no sobrenadante do LBA;
- ✓ Reverteu a diminuição na contração da traquéia;
- ✓ Reverteu a diminuição da desgranulação de mastócitos pulmonares;
- √ Não modificou a produção de IgE total e IgE OVA;
- √ Não diminuiu os níveis de corticosterona plasmáticos;

Observamos, ainda e de relevância que o tratamento com MK-801 per se:

✓ Diminuiu o número de leucócitos totais bem como o número de eosinófilos e neutrófilos no LBA;

- ✓ Diminuiu a porcentagem de expressão das moléculas L-selectina e ICAM-1 em granulócitos do LBA;
- ✓ Não alterou a produção de citocinas no sobrenadante do LBA;
- ✓ Aumentou a contração da traquéia;
- ✓ Diminuiu a desgranulação de mastócitos pulmonares;
- √ Não modificou a produção de IgE total e IgE OVA;
- ✓ Aumentou os níveis de corticosterona plasmáticos.

7.2 CONCLUSÕES GERAIS

Tomados em seu conjunto, quer nos parecer que os efeitos induzidos pela anfetamina implicam na ativação do sistema glutamatérgico via receptores NMDA, uma vez que o antagonista deste receptor, o MK-801 modulou os efeitos sobre: a migração celular, expressão de moléculas de adesão, liberação de citocinas reatividade das vias aéreas e a desgranulação de mastócitos pulmonares induzidos pela anfetamina.

Possivelmente as diferenças em como o MK-801, anfetamina ou a combinação de fármacos interagem com o eixo HPA e o SNAS poderiam explicar os efeitos opostos observados na resposta inflamatória alérgica pulmonar de camundongos OVA sensibilizados e desafiados. Quer nos parecer que os efeitos do SNAS sejam preponderante em relação à ativação do eixo HPA no que se refere à redução da inflamação alérgica pulmonar provocada pela anfetamina. Acreditamos ser importante a realização de estudos que elucidem o papel do SNAS sobre os fenômenos descritos nesta dissertação, assim como existir efeitos diretos do MK-801 sobre células imunes.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S. N.; MALAVIYA, R. Mast cells in infection and immunity. **Infection and immunity**, v. 65, n. 9, p. 3501-3508, 1997.
- AJUEBOR, M. N.; DAS, A. M.; VIRAG, L.; FLOWER, R. J.; SZABO, C.; PERRETTI, M. Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. **Journal of immunology**, v. 162, n. 3, p. 1685-1691, 1999.
- ALLEN, J. A.; YADAV, P. N.; ROTH, B. L. Insights into the regulation of 5-HT2A serotonin receptors by scaffolding proteins and kinases. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 6, p. 961-968, 2008.
- AMENTA, F.; BRONZETTI, E.; CANTALAMESSA, F.; EL-ASSOUAD, D.; FELICI, L.; RICCI, A.; TAYEBATI, S. Identification of dopamine plasma membrane and vesicular transporters in human peripheral blood lymphocytes. **Journal of neuroimmunology**, v. 117, n. 1-2, p. 133-142, 2001.
- ASSIS, M.; HANSEN, C.; LUX-LANTOS, V.; CANCELA, L. Sensitization to amphetamine occurs simultaneously at immune level and in met-enkephalin of the nucleus accumbens and spleen: an involved NMDA glutamatergic mechanism. **Brain, behavior, and immunity**, v. 23, n. 4, p. 464-473, 2009.
- AZPIROZ, A.; DE MIGUEL, Z.; FANO, E.; VEGAS, O. Relations between different coping strategies for social stress, tumor development and neuroendocrine and immune activity in male mice. **Brain, behavior, and immunity**, v. 22, n. 5, p. 690-698, 2008.
- BARR, A.; HOFMANN, C.; WEINBERG, J.; PHILLIPS, A. Exposure to repeated, intermittent d-amphetamine induces sensitization of HPA axis to a subsequent stressor. **Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 3, p. 286-294, 2002.
- BARTROP, R. W.; LUCKHURST, E.; LAZARUS, L.; KILOH, L. G.; PENNY, R. Depressed lymphocyte function after bereavement. **Lancet**, v. 1, n. 8016, p. 834-836, 1977.
- BASSO, A. S.; DE SA-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Immune-induced flavor aversion in mice: modification by neonatal capsaicin treatment.

 Neuroimmunomodulation, v. 9, n. 2, p. 88-94, 2001.
- BASSO, A. S.; PINTO, F. A.; RUSSO, M.; BRITTO, L. R.; DE SA-ROCHA, L. C.; PALERMO NETO, J. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **Journal of neuroimmunology**, v. 140, n. 1-2, p. 69-77, 2003.

BAUMANN, M. H.; ROTHMAN, R. B.; ALI, S. F. Comparative neurobiological effects of ibogaine and MK-801 in rats. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 59, n. 2, p. 143-151, 2000.

BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocrine reviews**, v. 17, n. 1, p. 64-102, 1996.

BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; DA PRADA, M.; BURRI, R.; HONEGGER, C. The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons. **Science**, v. 221, n. 4610, p. 564-566, 1983.

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

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

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

BICE, D.; SEAGRAVE, J.; GREEN, F. Animal models of asthma: potential usefulness for studying health effects of inhaled particles. **Inhallation Toxicology**, v. 12, n. 9, p. 829-862, 2000.

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

BLALOCK, J. E.; SMITH, E. M. Conceptual development of the immune system as a sixth sense. **Brain, behavior, and immunity**, v. 21, n. 1, p. 23-33, 2007.

BLANCHET, M. R.; MCNAGNY, K. M. Stem cells, inflammation and allergy. **Allergy, asthma, and clinical immunology**, v. 5, n. 1, p. 13, 2009.

BOCHNER, B. S.; KLUNK, D. A.; STERBINSKY, S. A.; COFFMAN, R. L.; SCHLEIMER, R. P. IL-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. **Journal of immunology**, v. 154, n. 2, p. 799-803, 1995.

BOLDYREV, A.; CARPENTER, D.; JOHNSON, P. Emerging evidence for a similar role of glutamate receptors in the nervous and immune systems. **Journal of Neurochemistry**, v. 95, n. 4, p. 913-918, 2005.

BOLTON, C.; PAUL, C. MK-801 Limits Neurovascular Dysfunction during Experimental Allergic Encephalomyelitis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 282, n. 1, p. 397-402, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Cooperação técnica: MS assina acordo com Sociedade de Pneumologia para prevenção de doenças respiratórias. [2003]. Disponível em:

http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/visualizar_texto.cfm?idtxt=28166|>. Acesso em: 25 mar. 2011.

BRISTOW, L. J.; THORN, L.; TRICKLEBANK, M. D.; HUTSON, P. H. Competitive NMDA receptor antagonists attenuate the behavioural and neurochemical effects of amphetamine in mice. **European journal of pharmacology**, v. 264, n. 3, p. 353-359, 1994.

BROIDE, D.; SULLIVAN, S.; GIFFORD, T.; SRIRAMARAO, P. Inhibition of pulmonary eosinophilia in P-selectin- and ICAM-1-deficient mice. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 18, n. 2, p. 218-225, 1998.

BUSSE, W.; LEMANSKE, R. J. Asthma. **The New England journal of medicine**, v. 344, n. 5, p. 350-362, 2001.

CAMERON, L.; HAMID, Q. Regulation of allergic airways inflammation by cytokines and glucocorticoids. **Current allergy and asthma reports**, v. 1, n. 2, p. 153-163, 2001.

CAVALCANTI, D. M.; LOTUFO, C. M.; BORELLI, P.; TAVASSI, A. M.; PEREIRA, A. L.; MARKUS, R. P.; FARSKY, S. H. Adrenal deficiency alters mechanisms of neutrophil mobilization. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 249, n. 1-2, p. 32-39, 2006.

COLEMAN, J. W.; LAYTON, G. T.; STANWORTH, D. R. The kinetics of in vivo sensitization of rat peritoneal and lung mast cells: temporal dissociation from circulating levels of IgE. **European journal of immunology**, v. 13, n. 12, p. 994-998, 1983.

CONNOR, T. J.; MCNAMARA, M. G.; FINN, D.; CURRID, A.; O'MALLEY, M.; REDMOND, A. M.; KELLY, J. P.; LEONARD, B. E. Acute 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) administration produces a rapid and sustained suppression of immune function in the rat. **Immunopharmacology**, v. 38, n. 3, p. 253-260, 1998.

CONNOR, T. Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'Ecstasy'): a stressor on the immune system. **Immunology**, v. 111, n. 4, p. 357-367, 2004.

COSENTINO, M.; ZAFFARONI, M.; MARINO, F.; BOMBELLI, R.; FERRARI, M.; RASINI, E.; LECCHINI, S.; GHEZZI, A.; FRIGO, G. Catecholamine production and tyrosine hydroxylase expression in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients: effect of cell stimulation and possible relevance for activation-induced apoptosis. **Journal of neuroimmunology**, v. 133, n. 1-2, p. 233-240, 2002.

- COSTA, A.; YASIN, S. A.; HUCKS, D.; FORSLING, M. L.; BESSER, G. M.; GROSSMAN, A. Differential effects of neuroexcitatory amino acids on corticotropin-releasing hormone-41 and vasopressin release from rat hypothalamic explants. **Endocrinology**, v. 131, n. 6, p. 2595-2602, 1992.
- COSTA-PINTO, F. A.; BASSO, A. S.; BRITTO, L. R.; MALUCELLI, B. E.; RUSSO, M. Avoidance behavior and neural correlates of allergen exposure in a murine model of asthma. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 19, n. 1, p. 52-60, 2005.
- COSTA-PINTO, F. A.; PALERMO-NETO, J. Neuroimmune interactions in stress. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 3, p. 196-199, 2010.
- CRIVELLATO, E.; BELTRAMI, C. A.; MALLARDI, F.; RIBATTI, D. The mast cell: an active participant or an innocent bystander? **Histology and histopathology**, v. 19, n. 1, p. 259-270, 2004.
- CRIVELLATO, E.; NICO, B.; MALLARDI, F.; BELTRAMI, C. A.; RIBATTI, D. Piecemeal degranulation as a general secretory mechanism? **The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology**, v. 274, n. 1, p. 778-784, 2003.
- CRIVELLATO, E.; NICO, B.; VACCA, A.; DAMMACCO, F.; REBATTI, D. Mast cell heterogeneity in B-cell non-Hodgkin's lymphomas: an ultrastructural study. **Leukemia & lymphoma**, v. 43, n. 11, p. 2201-2205, 2002.
- CRIVELLATO, E.; RIBATTI, D. The mast cell: an evolutionary perspective. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 85, n. 2, p. 347-360, 2010.
- DA CUNHA, A.; PAULI, V.; SACIURA, V.; PIRES, M.; CONSTANTINO, L.; DE SOUZA, B.; PETRONILHO, F.; RODRIGUES DE OLIVEIRA, J.; RITTER, C.; ROMÃO, P.; BOECK, C.; ROESLER, R.; QUEVEDO, J.; DAL-PIZZOL, F. N-methyl-D-aspartate glutamate receptor blockade attenuates lung injury associated with experimental sepsis. **Chest**, v. 137, n. 2, p. 297-302, 2010.
- DE LIMA, C. B.; SAKAI, M.; LATORRE, A. O.; MOREAU, R. L.; PALERMO-NETO, J. Effects of different doses and schedules of diazepam treatment on lymphocyte parameters in rats. **International immunopharmacology**, v. 10, n. 11, p. 1335-1343, 2010.
- DE OLIVEIRA, A. P.; LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, A.; HAMASATO, E. K.; QUINTEIRO-FILHO, W.; HEBEDA, C. B.; DAMAZO, A. S.; FARSKY, S. H.; TAVARES-DE-LIMA, W.; PALERMO-NETO, J. Amphetamine modulates cellular recruitment and airway reactivity in a rat model of allergic lung inflammation. **Toxicology letters**, v. 200, n. 1-2, p. 117-123, 2011.
- DE PAULA, V. F.; RIBEIRO, A.; PINHEIRO, M. L.; SAKAI, M.; LACAVA, M. C.; LAPACHINSKE, S. F.; MOREAU, R. L.; PALERMO-NETO, J. Methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy) decreases neutrophil activity and alters leukocyte distribution in bone marrow, spleen and blood. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 3, p. 191-200, 2009.

- DEKKER, L. V.; PARKER, P. J. Regulated binding of the protein kinase C substrate GAP-43 to the V0/C2 region of protein kinase C-delta. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 19, p. 12747-12753, 1997.
- DEL ARCO, A.; GONZÁLEZ-MORA, J. L.; ARMAS, V. R.; MORA, F. Amphetamine increases the extracellular concentration of glutamate in striatum of the awake rat: involvement of high affinity transporter mechanisms. **Neuropharmacology**, v. 38, n. 7, p. 943-954, 1999.
- DHABHAR, F. S.; MILLER, A. H.; MCEWEN, B. S.; SPENCER, R. L. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. **Journal of immunology**, v. 157, n. 4, p. 1638-1644, 1996.
- DHABHAR, F. S.; MILLER, A. H.; STEIN, M.; MCEWEN, B. S.; SPENCER, R. L. Diurnal and acute stress-induced changes in distribution of peripheral blood leukocyte subpopulations. **Brain, behavior, and immunity**, v. 8, n. 1, p. 66-79, 1994.
- DOMINGUES-JUNIOR, M.; PINHEIRO, S. R.; GUERRA, J. L.; PALERMO-NETO, J. Effects of Treatment with Amphetamine and Diazepam on Mycobacterium Bovis-Induced Infection in Hamsters. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 22, n. 3, p. 555-574, 2000.
- DUEZ, C.; DAKHAMA, A.; TOMKINSON, A.; MARQUILLIES, P.; BALHORN, A.; TONNEL, A. B.; BRATTON, D. L.; GELFAND, E. W. Migration and accumulation of eosinophils toward regional lymph nodes after airway allergen challenge. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 114, n. 4, p. 820-825, 2004.
- DUNN, A. J.; WANG, J. Cytokine effects on CNS biogenic amines. **Neuroimmunomodulation**, v. 2, n. 6, p. 319-328, 1995.
- DVORAK, A. M.; DVORAK, H. F.; GALLI, S. J. Ultrastructural criteria for identification of mast cells and basophils in humans, guinea pigs, and mice. **The American review of respiratory disease**, v. 128, n. 2 Pt 2, p. S49-52, 1983.
- DVORAK, A. M.; KISSELL, S. Granule changes of human skin mast cells characteristic of piecemeal degranulation and associated with recovery during wound healing in situ. **Journal of leukocyte biology**, v. 49, n. 2, p. 197-210, 1991.
- ELENKOV, I. J.; WILDER, R. L.; CHROUSOS, G. P.; VIZI, E. S. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 595-638, 2000.
- ENGLER, H.; BAILEY, M. T.; ENGLER, A.; SHERIDAN, J. F. Effects of repeated social stress on leukocyte distribution in bone marrow, peripheral blood and spleen. **Journal of neuroimmunology**, v. 148, n. 1-2, p. 106-115, 2004.
- FARAH, J. M., JR.; RAO, T. S.; MICK, S. J.; COYNE, K. E.; IYENGAR, S. N-methyl-D-aspartate treatment increases circulating adrenocorticotropin and luteinizing hormone in the rat. **Endocrinology**, v. 128, n. 4, p. 1875-1880, 1991.

- FELTEN, D. L. Direct innervation of lymphoid organs: substrate for neurotransmitter signaling of cells of the immune system. **Neuropsychobiology**, v. 28, n. 1-2, p. 110-112, 1993.
- FELTEN, D. L. Neurotransmitter signaling of cells of the immune system: important progress, major gaps. **Brain, behavior, and immunity**, v. 5, n. 1, p. 2-8, 1991.
- FERNANDES, A. M.; VALERA, F. C.; ANSELMO-LIMA, W. T. Mechanism of action of glucocorticoids in nasal polyposis. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v. 74, n. 2, p. 279-283, 2008.
- FINKELMAN, F.; HOGAN, S.; HERSHEY, G.; ROTHENBERG, M.; WILLS-KARP, M. Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. **Journal of immunology**, v. 184, n. 4, p. 1663-1674, 2010.
- FINKELMAN, F.; WILLS-KARP, M. Usefulness and optimization of mouse models of allergic airway disease. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 121, n. 3, p. 603-606, 2008.
- FOSTER, A. C.; WONG, E. H. The novel anticonvulsant MK-801 binds to the activated state of the N-methyl-D-aspartate receptor in rat brain. **British Journal of Pharmacology**, v. 91, n. 2, p. 403-409, 1987.
- FRANGOGIANNIS, N.; MENDOZA, L.; LEWALLEN, M.; MICHAEL, L.; SMITH, C.; ENTMAN, M. Induction and suppression of interferon-inducible protein 10 in reperfused myocardial infarcts may regulate angiogenesis. **The FASEB journal**, v. 15, n. 8, p. 1428-1430, 2001.
- FREIRE-GARABAL, M.; BALBOA, J.; NÚÑEZ, M.; CASTAÑO, M.; LLOVO, J.; FERNÁNDEZ-RIAL, J.; BELMONTE, A. Effects of amphetamine on T-cell immune response in mice. **Life sciences**, v. 49, n. 16, p. PL107-112, 1991.
- FREIRE-GARABAL, M.; NÚÑEZ, M.; BALBOA, J.; FERNÁNDEZ-RIAL, J.; BELMONTE, A. Effects of amphetamine on the activity of phagocytosis in mice. **Life sciences**, v. 51, n. 15, p. PL145-148, 1992.
- FREIRE-GARABAL, M.; NUÑEZ-IGLESIAS, M.; REY-MÉNDEZ, M.; PEREIRO-RAPOSO, M.; RIVEIRO, P.; FERNÁNDEZ-RIAL, J.; LOSADA, C.; GANDOY, M.; MAYÁN, J. Effects of amphetamine on the development of Moloney sarcoma virus-induced tumors in mice. **Oncology reports**, v. 5, n. 2, p. 381-383, 1998.
- FRIEDMAN, H.; NEWTON, C.; KLEIN, T. Microbial infections, immunomodulation, and drugs of abuse. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 2, p. 209-219, 2003.
- FRIES, J.; WILLIAMS, A.; ATKINS, R.; NEWMAN, W.; LIPSCOMB, M.; COLLINS, T. Expression of VCAM-1 and E-selectin in an in vivo model of endothelial activation. **The American journal of pathology**, v. 143, n. 3, p. 725-737, 1993.
- GALLI, S. J.; GORDON, J. R.; WERSHIL, B. K. Cytokine production by mast cells and basophils. **Current opinion in immunology**, v. 3, n. 6, p. 865-872, 1991.

- GALLI, S. J.; MAURER, M.; LANTZ, C. S. Mast cells as sentinels of innate immunity. **Current opinion in immunology**, v. 11, n. 1, p. 53-59, 1999.
- GALLI, S. J.; TSAI, M. Mast cells: versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis. **Journal of dermatological science**, v. 49, n. 1, p. 7-19, 2008.
- GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 445-454, 2008.
- GAVRILIN, M.; MATHES, L.; PODELL, M. Methamphetamine enhances cell-associated feline immunodeficiency virus replication in astrocytes. **Journal of neurovirology**, v. 8, n. 3, p. 240-249, 2002.
- GILFILLAN, A. M.; TKACZYK, C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 3, p. 218-230, 2006.
- GOEBEL, M. U.; MILLS, P. J. Acute Psychological Stress and Exercise and Changes in Peripheral Leukocyte Adhesion Molecule Expression and Density. **Psychosomatic Medicine**, v. 62, n. 5, p. 664-670, 2000.
- GORDON, J.; BARNES, N. Lymphocytes transport serotonin and dopamine: agony or ecstasy? **Trends in immunology**, v. 24, n. 8, p. 438-443, 2003.
- HAAS, H. S.; SCHAUENSTEIN, K. Neuroimmunomodulation via limbic structures-the neuroanatomy of psychoimmunology. **Progress in Neurobiology**, v. 51, n. 2, p. 195-222, 1997.
- HEIT, B.; COLARUSSO, P.; KUBES, P. Fundamentally different roles for LFA-1, Mac-1 and alpha4-integrin in neutrophil chemotaxis. **Journal of cell science**, v. 118, n. Pt 22, p. 5205-5220, 2005.
- HEMRICK-LUECKE, S. K.; HENDERSON, M. G.; FULLER, R. W. MK801 antagonism of the prolonged depletion of striatal dopamine by amphetamine in iprindole-treated rats. **Life sciences**, v. 50, n. 6, p. PL31-33, 1992.
- HOGAN, S. P.; KOSKINEN, A.; FOSTER, P. S. Interleukin-5 and eosinophils induce airway damage and bronchial hyperreactivity during allergic airway inflammation in BALB/c mice. **Immunology and cell biology**, v. 75, n. 3, p. 284-288, 1997.
- HOLGATE, S. T. Pathogenesis of Asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 38, n. 6, p. 872-897, 2008.
- HOLT, P.; MACAUBAS, C.; STUMBLES, P.; SLY, P. The role of allergy in the development of asthma. **Nature**, v. 402, n. 6760 Suppl, p. B12-17, 1999.
- IYENGAR, S.; MICK, S.; DILWORTH, V.; MICHEL, J.; RAO, T. S.; FARAH, J. M.; WOOD, P. L. Sigma receptors modulate the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis centrally: evidence for a functional interaction with NMDA receptors, in vivo. **Neuropharmacology**, v. 29, n. 3, p. 299-303, 1990.

- JEZOVA, D.; OLIVER, C.; JURCOVICOVA, J. Stimulation of adrenocorticotropin but not prolactin and catecholamine release by N-methyl-aspartic acid. **Neuroendocrinology**, v. 54, n. 5, p. 488-492, 1991.
- KALIVAS, P. W.; STEWART, J. Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. **Brain research Brain research reviews**, v. 16, n. 3, p. 223-244, 1991.
- KARLER, R.; CALDER, L.; CHAUDHRY, I.; TURKANIS, S. Blockade of "reverse tolerance" to cocaine and amphetamine by MK-801. **Life sciences**, v. 45, n. 7, p. 599-606, 1989.
- KARLER, R.; CALDER, L.; THAI, L.; BEDINGFIELD, J. The dopaminergic, glutamatergic, GABAergic bases for the action of amphetamine and cocaine. **Brain research**, v. 671, n. 1, p. 100-104, 1995.
- KARLER, R.; CHAUDHRY, I.; CALDER, L.; TURKANIS, S. Amphetamine behavioral sensitization and the excitatory amino acids. **Brain research**, v. 537, n. 1-2, p. 76-82, 1990.
- KAVELAARS, A.; COBELENS, P.; TEUNIS, M.; HEIJNEN, C. Changes in innate and acquired immune responses in mice with targeted deletion of the dopamine transporter gene. **Journal of neuroimmunology**, v. 161, n. 1-2, p. 162-168, 2005.
- KELLY, M.; HWANG, J. M.; KUBES, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 120, n. 1, p. 3-10, 2007.
- KIM, D.-H.; JUNG, J.-S.; MOON, Y.-S.; SONG, D.-K. Central or peripheral norepinephrine depletion enhances MK-801-induced plasma corticosterone level in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 1, p. 45-48, 2009.
- KLEIN, T.; FRIEDMAN, H.; SPECTER, S. Marijuana, immunity and infection. **Journal of neuroimmunology**, v. 83, n. 1-2, p. 102-115, 1998.
- KOHM, A. P.; SANDERS, V. M. Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 4, p. 487-525, 2001.
- KONRADI, C.; LEVEQUE, J. C.; HYMAN, S. E. Amphetamine and dopamine-induced immediate early gene expression in striatal neurons depends on postsynaptic NMDA receptors and calcium. **The Journal of neuroscience**, v. 16, n. 13, p. 4231-4239, 1996.
- KONSMAN, J. P.; PARNET, P.; DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. **Trends in neurosciences**, v. 25, n. 3, p. 154-159, 2002.
- KUBERA, M.; FILIP, M.; BASTA-KAIM, A.; NOWAK, E.; BUDZISZEWSKA, B.; TETICH, M.; HOLAN, V.; KORZENIAK, B.; PRZEGALIŃSKI, E. The effect of

- amphetamine sensitization on mouse immunoreactivity. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 53, n. 2, p. 233-242, 2002.
- LAMAS, A.; LEON, O.; SCHLEIMER, R. Glucocorticoids inhibit eosinophil responses to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **The Journal of Immunology**, v. 147, n. 1, p. 254-259, 1991.
- LAU, D.; MOLLNAU, H.; EISERICH, J.; FREEMAN, B.; DAIBER, A.; GEHLING, U.; BRÜMMER, J.; RUDOLPH, V.; MÜNZEL, T.; HEITZER, T.; MEINERTZ, T.; BALDUS, S. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 2, p. 431-436, 2005.
- LAZZARINI, R.; SAKAI, M.; COSTA-PINTO, F.; PALERMO-NETO, J. Diazepam decreases leukocyte-endothelium interactions in situ. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 32, n. 3, p. 402-409, 2010.
- LEE, K.; KIM, S. H.; YOON, H. J.; PAIK, D. J.; KIM, J. M.; YOUN, J. Bacillus-derived poly-γ-glutamic acid attenuates allergic airway inflammation through a Toll-like receptor-4-dependent pathway in a murine model of asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 41, n. 8, p. 1143-1156, 2011.
- LEWIS, C.; ARONOW, B.; HUTTON, J.; SANTELIZ, J.; DIENGER, K.; HERMAN, N.; FINKELMAN, F.; WILLS-KARP, M. Unique and overlapping gene expression patterns driven by IL-4 and IL-13 in the mouse lung. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 123, n. 4, p. 795-804.e798, 2009.
- LIGEIRO DE OLIVEIRA, A. P.; LAZZARINI, R.; CAVRIANI, G.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; TAVARES DE LIMA, W.; PALERMO-NETO, J. Effects of single or repeated amphetamine treatment and withdrawal on lung allergic inflammation in rats. **International immunopharmacology**, v. 8, n. 9, p. 1164-1171, 2008.
- LIGEIRO-OLIVEIRA, A. P.; FIALHO DE ARAUJO, A. M.; LAZZARINI, R.; SILVA, Z. L.; DE NUCCI, G.; MUSCARA, M. N.; TAVARES DE LIMA, W.; PALERMO-NETO, J. Effects of amphetamine on immune-mediated lung inflammatory response in rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 11, n. 3, p. 181-190, 2004.
- LINDSTEDT, K. A.; KOVANEN, P. T. Isolation of mast cell granules. In: BONIFACINO, J. S. et al. (Ed.). **Current protocols in cell biology.** New York: John Wiley & Sons, chap. 3. 2006.
- LINO DOS SANTOS FRANCO, A.; DAMAZO, A. S.; BERALDO DE SOUZA, H. R.; DOMINGOS, H. V.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; OLIANI, S. M.; COSTA, S. K.; TAVARES DE LIMA, W. Pulmonary neutrophil recruitment and bronchial reactivity in formaldehyde-exposed rats are modulated by mast cells and differentially by neuropeptides and nitric oxide. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 214, n. 1, p. 35-42, 2006.
- LLOYD, C. M.; HESSEL, E. M. Functions of T cells in asthma: more than just TH2 cells. **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 12, p. 838-848, 2010.

- LONGLEY, J.; DUFFY, T. P.; KOHN, S. The mast cell and mast cell disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 32, n. 4, p. 545-561; quiz 562-544, 1995.
- LOURENCO DA SILVA, A.; HOFFMANN, A.; DIETRICH, M. O.; DALL'IGNA, O. P.; SOUZA, D. O.; LARA, D. R. Effect of riluzole on MK-801 and amphetamine-induced hyperlocomotion. **Neuropsychobiology**, v. 48, n. 1, p. 27-30, 2003.
- LOWY, M. T. MK-801 antagonizes methamphetamine-induced decreases in hippocampal and striatal corticosteroid receptors. **Brain research**, v. 533, n. 2, p. 348-352, 1990.
- MADDEN, K. S.; SANDERS, V. M.; FELTEN, D. L. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 35, p. 417-448, 1995.
- MADDOX, L.; SCHWARTZ, D. The pathophysiology of asthma. **Annual review of medicine**, v. 53, p. 477-498, 2002.
- MAIER, S. F.; GOEHLER, L. E.; FLESHNER, M.; WATKINS, L. R. The role of the vagus nerve in cytokine-to-brain communication. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 840, p. 289-300, 1998.
- MARTIN, T. R.; FREVERT, C. W. Innate immunity in the lungs. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 2, n. 5, p. 403-411, 2005.
- MASHKINA, A.; CIZKOVA, D.; VANICKY, I.; BOLDYREV, A. NMDA Receptors are Expressed in Lymphocytes Activated Both In Vitro and In Vivo. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 30, n. 6, p. 901-907, 2010.
- MELLON, R.; BAYER, B. Evidence for central opioid receptors in the immunomodulatory effects of morphine: review of potential mechanism(s) of action. **Journal of neuroimmunology**, v. 83, n. 1-2, p. 19-28, 1998.
- METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast cells. **Physiological reviews**, v. 77, n. 4, p. 1033-1079, 1997.
- METZ, M.; MAURER, M. Mast cells--key effector cells in immune responses. **Trends in immunology**, v. 28, n. 5, p. 234-241, 2007.
- NASSAR, T.; YAROVOI, S.; FANNE, R. A.; AKKAWI, S. E.; JAMMAL, M.; ALLEN, T. C.; IDELL, S.; CINES, D. B.; HIGAZI, A. A.-R. Regulation of Airway Contractility by Plasminogen Activators through N-Methyl-D-Aspartate Receptor-1. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 43, n. 6, p. 703-711, 2010.
- NIKOLIC, V.; JOVANOVA-NESIC, K.; JANKOVIC, B. D. Locus ceruleus and immunity. I. Suppression of plaque-forming cell response and antibody production in rats with lesioned locus ceruleus. **The International journal of neuroscience**, v. 68, n. 3-4, p. 283-287, 1993.
- OKADA, S.; YAMAGUCHI-SHIMA, N.; SHIMIZU, T.; ARAI, J.; YORIMITSU, M.; YOKOTANI, K. Centrally administered N-methyl-d-aspartate evokes the adrenal

secretion of noradrenaline and adrenaline by brain thromboxane A2-mediated mechanisms in rats. **European journal of pharmacology**, v. 586, n. 1-3, p. 145-150, 2008.

OMS. WORLD HEALTH ORGANIZATION (OMS). Chronic respiratory diseases: asthma. 2008. Disponível em: http://www.who.int/respiratory/asthma/en/index.html>. 2008 Acesso em: 25 mar. 2011.

OTTAWAY, C. A.; HUSBAND, A. J. The influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration. **Immunology today**, v. 15, n. 11, p. 511-517, 1994.

PACHECO, R.; GALLART, T.; LLUIS, C.; FRANCO, R. Role of glutamate on T-cell mediated immunity. **Journal of neuroimmunology**, v. 185, n. 1-2, p. 9-19, 2007.

PACHECO, R.; OLIVA, H.; MARTINEZ-NAVÍO, J.; CLIMENT, N.; CIRUELA, F.; GATELL, J.; GALLART, T.; MALLOL, J.; LLUIS, C.; FRANCO, R. Glutamate released by dendritic cells as a novel modulator of T cell activation. **Journal of immunology**, v. 177, n. 10, p. 6695-6704, 2006.

PACIFICI, R.; PICHINI, S.; ZUCCARO, P.; FARRÉ, M.; SEGURA, M.; ORTUÑO, J.; DI CARLO, S.; BACOSI, A.; ROSET, P.; SEGURA, J.; DE LA TORRE, R. Paroxetine inhibits acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on the immune system in humans. **Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 309, n. 1, p. 285-292, 2004.

PACIFICI, R.; ZUCCARO, P.; FARRE, M.; PICHINI, S.; DI CARLO, S.; ROSET, P. N.; ORTUNO, J.; SEGURA, J.; DE LA TORRE, R. Immunomodulating properties of MDMA alone and in combination with alcohol: a pilot study. **Life sciences**, v. 65, n. 26, p. PL309-316, 1999.

PACIFICI, R.; ZUCCARO, P.; FARRÉ, M.; PICHINI, S.; DI CARLO, S.; ROSET, P. N.; PALMI, I.; ORTUÑO, J.; MENOYO, E.; SEGURA, J.; DE LA TORRE, R. Cell-Mediated Immune Response in MDMA Users After Repeated Dose Administration. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 965, n. 1, p. 421-433, 2002.

PALERMO-NETO, J.; GUIMARÃES, R. Pavlovian conditioning of lung anaphylactic response in rats. **Life sciences**, v. 68, n. 6, p. 611-623, 2000.

PANÉS, J. Adhesion molecules: their role in physiopathology and treatment of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology & hepatology**, v. 22, n. 10, p. 514-524, 1999.

PECHNICK, R. N.; GEORGE, R.; POLAND, R. E. Characterization of the effects of the acute and repeated administration of MK-801 on the release of adrenocorticotropin, corticosterone and prolactin in the rat. **European journal of pharmacology**, v. 164, n. 2, p. 257-263, 1989.

PECHNICK, R. N.; GEORGE, R.; POLAND, R. E. MK-801 stimulates the release of adrenocorticotrophin but not does affect the release of prolactin in the rat. **European journal of pharmacology**, v. 141, n. 2, p. 323-324, 1987.

- PELLEGRINO, T.; BAYER, B. In vivo effects of cocaine on immune cell function. **Journal of neuroimmunology**, v. 83, n. 1-2, p. 139-147, 1998.
- PERKINS, C.; WILLS-KARP, M.; FINKELMAN, F. IL-4 induces IL-13-independent allergic airway inflammation. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 118, n. 2, p. 410-419, 2006.
- PEZZONE, M.; RUSH, K.; KUSNECOV, A.; WOOD, P.; RABIN, B. Corticosterone-independent alteration of lymphocyte mitogenic function by amphetamine. **Brain**, **behavior**, **and immunity**, v. 6, n. 3, p. 293-299, 1992.
- PITZALIS, C.; PIPITONE, N.; PERRETTI, M. Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 966, p. 108-118, 2002.
- PORTELA CDE, P.; MASSOCO CDE, O.; DE LIMA, W. T.; PALERMO-NETO, J. Stress-induced increment on total bronchoalveolar cell count in OVA-sensitized rats. **Physiology & behavior**, v. 72, n. 3, p. 415-420, 2001.
- PORTELA CDE, P.; TIBERIO IDE, F.; LEICK-MALDONADO, E. A.; MARTINS, M. A.; PALERMO-NETO, J. Effects of diazepam and stress on lung inflammatory response in OVA-sensitized rats. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 282, n. 6, p. L1289-1295, 2002.
- PORTELA, C.; LEICK-MALDONADO, E.; KASAHARA, D.; PRADO, C.; CALVO-TIBÉRIO, I.; MARTINS, M.; PALERMO-NETO, J. Effects of stress and neuropeptides on airway responses in ovalbumin-sensitized rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 14, n. 2, p. 105-111, 2007.
- PURCELL, W. M.; DOYLE, K. M.; WESTGATE, C.; ATTERWILL, C. K. Characterisation of a functional polyamine site on rat mast cells: association with a NMDA receptor macrocomplex. **Journal of neuroimmunology**, v. 65, n. 1, p. 49-53, 1996.
- QUARCOO, D.; PAVLOVIC, S.; JOACHIM, R. Stress and airway reactivity in a murine model of allergic airway inflammation. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 5, p. 318-324, 2009.
- QUINTEIRO-FILHO, W. M.; RIGHI, D. A.; PALERMO-NETO, J. Effect of cyhalothrin on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 42, n. 10, p. 912-917, 2009.
- QURESHI, R.; JAKSCHIK, B. A. The role of mast cells in thioglycollate-induced inflammation. **Journal of immunology**, v. 141, n. 6, p. 2090-2096, 1988.
- RAWLS, S. M.; MCGINTY, J. F. Delta opioid receptors regulate calcium-dependent, amphetamine-evoked glutamate levels in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. **Brain research**, v. 861, n. 2, p. 296-304, 2000.
- REDWINE, L.; SNOW, S.; MILLS, P.; IRWIN, M. Acute Psychological Stress: Effects on Chemotaxis and Cellular Adhesion Molecule Expression. **Psychosomatic Medicine**, v. 65, n. 4, p. 598-603, 2003.

- REYES, A.; LUCKHAUS, J.; FERIN, M. Unexpected inhibitory action of N-methyl-D,L-aspartate or luteinizing hormone release in adult ovariectomized rhesus monkeys: a role of the hypothalamic-adrenal axis. **Endocrinology**, v. 127, n. 2, p. 724-729, 1990.
- RIGHI, D. A.; XAVIER, F. G.; PALERMO-NETO, J. Effects of type II pyrethroid cyhalothrin on rat innate immunity: a flow cytometric study. **International immunopharmacology**, v. 9, n. 1, p. 148-152, 2009.
- RIO, E. M.; GALLO, P. R.; SIQUEIRA, A. A. [Asthma mortality in the city of Sao Paulo, Brazil]. **Revista de saude publica**, v. 36, n. 2, p. 149-154, 2002.
- RIVERA, J.; GILFILLAN, A. M. Molecular regulation of mast cell activation. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 117, n. 6, p. 1214-1225; quiz 1226, 2006.
- RIVIER, C.; VALE, W. Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropinreleasing factor, catecholamines and vasopressin. **Nature**, v. 305, n. 5932, p. 325-327, 1983.
- ROBINSON, D. S.; HAMID, Q.; YING, S.; TSICOPOULOS, A.; BARKANS, J.; BENTLEY, A. M.; CORRIGAN, C.; DURHAM, S. R.; KAY, A. B. Predominant TH2-like Bronchoalveolar T-Lymphocyte Population in Atopic Asthma. **New England Journal of Medicine**, v. 326, n. 5, p. 298-304, 1992.
- ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. **Brain research. Brain research reviews**, v. 18, n. 3, p. 247-291, 1993.
- ROSEN, S. D. Homing in on L-selectin. **Journal of immunology**, v. 177, n. 1, p. 3-4, 2006.
- SAID, S.; PAKBAZ, H.; BERISHA, H.; RAZA, S. NMDA receptor activation: critical role in oxidant tissue injury. **Free radical biology & medicine**, v. 28, n. 8, p. 1300-1302, 2000.
- SAKAI, M.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; PINHEIRO, M. L.; RIBEIRO, A.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; RONE, M. B.; MARTINEZ-ARGUELLES, D. B.; DAGLI, M. L.; PAPADOPOULOS, V.; PALERMO-NETO, J. Translocator protein (18 kDa) mediates the pro-growth effects of diazepam on Ehrlich tumor cells in vivo. **European journal of pharmacology**, v. 626, n. 2-3, p. 131-138, 2010.
- SAPHIER, D.; ABRAMSKY, O.; MOR, G.; OVADIA, H. Multiunit electrical activity in conscious rats during an immune response. **Brain, behavior, and immunity**, v. 1, n. 1, p. 40-51, 1987.
- SEGAL, D. S.; KUCZENSKI, R. Repeated cocaine administration induces behavioral sensitization and corresponding decreased extracellular dopamine responses in caudate and accumbens. **Brain research**, v. 577, n. 2, p. 351-355, 1992.
- SHIM, J. J.; DABBAGH, K.; UEKI, I. F.; DAO-PICK, T.; BURGEL, P. R.; TAKEYAMA, K.; TAM, D. C.; NADEL, J. A. IL-13 induces mucin production by stimulating

- epidermal growth factor receptors and by activating neutrophils. **American journal of physiology.** Lung cellular and molecular physiology, v. 280, n. 1, p. L134-140, 2001.
- SHIN, Y.; TAKEDA, K.; GELFAND, E. Understanding asthma using animal models. **Allergy, asthma & immunology research**, v. 1, n. 1, p. 10-18, 2009.
- SHINJI, H.; SEKI, K.; TAJIMA, A.; UCHIDA, A.; MASUDA, S. Fibronectin bound to the surface of Staphylococcus aureus induces association of very late antigen 5 and intracellular signaling factors with macrophage cytoskeleton. **Infection and immunity**, v. 71, n. 1, p. 140-146, 2003.
- SONG, D. K.; SUH, H. W.; JUNG, J. S.; WIE, M. B.; SONG, J. H.; KIM, Y. H. Involvement of NMDA receptor in the regulation of plasma interleukin-6 levels in mice. **European journal of pharmacology**, v. 316, n. 2-3, p. 165-169, 1996.
- STANKEVICIUS, D. Aspectos neuroimunológicos do ecstasy (N-metil-3,4-metilenodioximetanfetamina-MDMA), na inflamação alérgica pulmonar em camundongos. 2010. 189 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- STANKEVICIUS, D.; RODRIGUES-COSTA, E. C.; CAMILO FLORIO, J.; PALERMO-NETO, J. Neuroendocrine, behavioral and macrophage activity changes induced by picrotoxin effects in mice. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 2, p. 300-308, 2008.
- STEEBER, D. A.; TANG, M. L.; GREEN, N. E.; ZHANG, X. Q.; SLOANE, J. E.; TEDDER, T. F. Leukocyte entry into sites of inflammation requires overlapping interactions between the L-selectin and ICAM-1 pathways. **Journal of immunology**, v. 163, n. 4, p. 2176-2186, 1999.
- STEFANSKI, V. Social stress in laboratory rats: hormonal responses and immune cell distribution. **Psychoneuroendocrinology**, v. 25, n. 4, p. 389-406, 2000.
- SUGITA, M.; KURIBAYASHI, K.; NAKAGOMI, T.; MIYATA, S.; MATSUYAMA, T.; KITADA, O. Allergic bronchial asthma: airway inflammation and hyperresponsiveness. **Internal medicine**, v. 42, n. 8, p. 636-643, 2003.
- SWERDLOW, N. R.; KOOB, G. F.; CADOR, M.; LORANG, M.; HAUGER, R. L. Pituitary-adrenal axis responses to acute amphetamine in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 45, n. 3, p. 629-637, 1993.
- SWERDLOW, N.R.; HAUGER, R.; IRWIN, M.; KOOB, G.; BRITTON, K.; PULVIRENTI, L. Endocrine, immune, and neurochemical changes in rats during withdrawal from chronic amphetamine intoxication. **Neuropsychopharmacology**, v. 5, n. 1, p. 23-31, 1991.
- TAILOR, P.; TAMURA, T.; OZATO, K. IRF family proteins and type I interferon induction in dendritic cells. **Cell research**, v. 16, n. 2, p. 134-140, 2006.
- TEDDER, T.; STEEBER, D.; CHEN, A.; ENGEL, P. The selectins: vascular adhesion molecules. **The FASEB journal**, v. 9, n. 10, p. 866-873, 1995.

- TEJERO-TALDO, M. I.; CHMIELINSKA, J. J.; GONZALEZ, G.; MAK, I. T.; WEGLICKI, W. B. N-Methyl-d-aspartate Receptor Blockade Inhibits Cardiac Inflammation in the Mg2+-Deficient Rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 311, n. 1, p. 8-13, 2004.
- THOMAS, D. M.; KUHN, D. M. MK-801 and dextromethorphan block microglial activation and protect against methamphetamine-induced neurotoxicity. **Brain research**, v. 1050, n. 1-2, p. 190-198, 2005.
- TOURNOY, K. G.; KIPS, J. C.; SCHOU, C.; PAUWELS, R. A. Airway eosinophilia is not a requirement for allergen-induced airway hyperresponsiveness. **Clinical and experimental allergy**, v. 30, n. 1, p. 79-85, 2000.
- TRIFILIEFF, A.; EL-HASIM, A.; CORTELING, R.; OWEN, C. Abrogation of lung inflammation in sensitized Stat6-deficient mice is dependent on the allergen inhalation procedure. **British journal of pharmacology**, v. 130, n. 7, p. 1581-1588, 2000.
- UNDERWOOD, D. C.; MATTHEWS, J. K.; OSBORN, R. R.; BOCHNOWICZ, S.; TORPHY, T. J. The Influence of Endogenous Catecholamines on the Inhibitory Effects of Rolipram Against Early- and Late-Phase Response to Antigen in the Guinea Pig. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 280, n. 1, p. 210-219, 1997.
- VAN TITS, L. J.; MICHEL, M. C.; GROSSE-WILDE, H.; HAPPEL, M.; EIGLER, F. W.; SOLIMAN, A.; BRODDE, O. E. Catecholamines increase lymphocyte beta 2-adrenergic receptors via a beta 2-adrenergic, spleen-dependent process. **American Journal of Physiology Endocrinology And Metabolism**, v. 258, n. 1, p. E191-E202, 1990.
- VANDERSCHUREN, L.; KALIVAS, P. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. **Psychopharmacology**, v. 151, n. 2-3, p. 99-120, 2000.
- VANDERSCHUREN, L.; SCHMIDT, E.; DE VRIES, T.; VAN MOORSEL, C.; TILDERS, F.; SCHOFFELMEER, A. A single exposure to amphetamine is sufficient to induce long-term behavioral, neuroendocrine, and neurochemical sensitization in rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 21, p. 9579-9586, 1999.
- VIG, R.; GORDON, J.; THÉBAUD, B.; BEFUS, A.; VLIAGOFTIS, H. The effect of early-life stress on airway inflammation in adult mice. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 4, p. 229-239, 2010.
- VISMARI, L.; ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Amitriptyline and acute inflammation: a study using intravital microscopy and the carrageenan-induced paw edema model. **Pharmacology**, v. 86, n. 4, p. 231-239, 2010.
- WAKELIN, M.; SANZ, M.; DEWAR, A.; ALBELDA, S.; LARKIN, S.; BOUGHTON-SMITH, N.; WILLIAMS, T.; NOURSHARGH, S. An anti-platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 antibody inhibits leukocyte extravasation from mesenteric microvessels in vivo by blocking the passage through the basement membrane. **The Journal of experimental medicine**, v. 184, n. 1, p. 229-239, 1996.

- WANG, J. Q.; DAUNAIS, J. B.; MCGINTY, J. F. NMDA receptors mediate amphetamine-induced upregulation of zif/268 and preprodynorphin mRNA expression in rat striatum. **Synapse**, v. 18, n. 4, p. 343-353, 1994.
- WEDEMEYER, J.; TSAI, M.; GALLI, S. J. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. **Current opinion in immunology**, v. 12, n. 6, p. 624-631, 2000.
- WEDZONY, K.; CZYRAK, A. The role of corticosteroids in the acquisition of sensitization to locomotor stimulant effects of MK-801. **Brain research**, v. 657, n. 1-2, p. 351-356, 1994.
- WEISSLER, A.; MEKORI, Y. A.; MOR, A. The role of mast cells in non-allergic inflammation. **The Israel Medical Association journal**, v. 10, n. 12, p. 843-845, 2008.
- WESSELIUS, L.; WILLIAMS, W.; BAILEY, K.; VAMOS, S.; O'BRIEN-LADNER, A.; WIEGMANN, T. Iron uptake promotes hyperoxic injury to alveolar macrophages. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 159, n. 1, p. 100-106, 1999.
- WIEDLE, G.; DUNON, D.; IMHOF, B. Current concepts in lymphocyte homing and recirculation. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 38, n. 1, p. 1-31, 2001.
- WILLS-KARP, M. IL-12/IL-13 axis in allergic asthma. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 107, n. 1, p. 9-18, 2001.
- WILLS-KARP, M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. **Immunological Reviews**, v. 202, p. 175-190, 2004.
- WOLF, M. E.; KHANSA, M. R. Repeated administration of MK-801 produces sensitization to its own locomotor stimulant effects but blocks sensitization to amphetamine. **Brain research**, v. 562, n. 1, p. 164-168, 1991.
- WONG, E. H.; KEMP, J. A.; PRIESTLEY, T.; KNIGHT, A. R.; WOODRUFF, G. N.; IVERSEN, L. L. The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 18, p. 7104-7108, 1986.
- YU, Q.; ZHANG, D.; WALSTON, M.; ZHANG, J.; LIU, Y.; WATSON, R. Chronic methamphetamine exposure alters immune function in normal and retrovirus-infected mice. **International immunopharmacology**, v. 2, n. 7, p. 951-962, 2002.
- YUSUF-MAKAGIANSAR, H.; ANDERSON, M.; YAKOVLEVA, T.; MURRAY, J.; SIAHAAN, T. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. **Medicinal Research Reviews**, v. 22, n. 2, p. 146-167, 2002.
- ZHANG, S.; SHEN, Z.; HU, G.; LIU, R.; ZHANG, X. Effects of endogenous glucocorticoids on allergic inflammation and TH1/TH2 balance in airway allergic disease. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 103, n. 6, p. 525-534, 2009.

ZOSKY, G.; SLY, P. Animal models of asthma. **Clinical and experimental allergy**, v. 37, n. 7, p. 973-988, 2007.

ZOSKY, G.; VON GARNIER, C.; STUMBLES, P.; HOLT, P.; SLY, P.; TURNER, D. The pattern of methacholine responsiveness in mice is dependent on antigen challenge dose. **Respiratory Research**, v. 5, p. 15, 2004.

ZURAWSKI, G.; DE VRIES, J. E. Interleukin 13 elicits a subset of the activities of its close relative interleukin 4. **Stem cells**, v. 12, n. 2, p. 169-174, 1994.