FÁBIO RIBEIRO DA SILVA

**Efeitos de benzodiazepínicos sobre a atividade de
neutrófilos de ratos avaliados por citometria de fluxo**

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

Departamento:
Patologia

Área de concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientador:
Prof. Dr. João Palermo-Neto

**São Paulo
2003**

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1283
FMVZ

Silva, Fábio Ribeiro da

Efeitos de benzodiazepínicos sobre a atividade de neutrófilos de ratos avaliados por citometria de fluxo / Fábio Ribeiro da Silva. – São Paulo : F. R. Silva, 2003.
179 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2003.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. João Palermo-Neto.

1. Benzodiazepínicos. 2. Neutrófilos. 3. Burst oxidativo.
4. Fagocitose. 5. PBR. 6. Citometria de fluxo. I. Título.

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da administração de benzodiazepínicos sobre a atividade de neutrófilos: uma avaliação por citometria de fluxo", protocolo nº323/2003, utilizando 120 ratas albino (wistar), sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Palermo Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Benzodiazepines effects on neutrophil activity: a flow cytometric evaluation" protocol number 323/2003, utilizing 120 rats, under the responsibility of Prof. Dr. João Palermo Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Biotic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum").

São Paulo, 12 de junho de 2003

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVA, Fábio Ribeiro da

Título: Efeitos de benzodiazepínicos sobre a atividade de neutrófilos de ratos avaliados por citometria de fluxo

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

Ao concluir este trabalho, fiquei olhando para trás por alguns longos minutos e pude perceber toda a ajuda e o apoio que recebi de algumas pessoas, cada uma dentro de um contexto diferente, é claro, mas que juntas, foram de suma importância para mim e sem elas, provavelmente eu não teria conseguido concluir esta etapa de minha vida. A estas pessoas agora eu peço licença para prestar uma pequena homenagem, dedicando-lhes algumas palavras como agradecimento.

Aos meus pais

“O filho que encontra no lar uma escola de amor e trabalho, de disciplina e compreensão, jamais esquecerá as lições ali apreendidas. Além das palavras de orientação, é muito importante o exemplo da boa conduta. Por mais duros que sejam os embates da vida, ele saberá sempre escolher e trilhar os melhores caminhos, agradecendo aos pais, que souberam educá-lo com amor”.

E é exatamente isto que eu estou fazendo agora:

MUITO OBRIGADO POR TUDO !!!

Quero que saibam que se um dia tiver um filho e representar para ele apenas 10% do que vocês representam para mim, já estarei totalmente satisfeito.

EU AMO VOCÊS !!!

À Heloísa, minha namorada

A você meu amor, só posso agradecer por ter suportado com paciência todas as minhas ausências, meu mau humor, meu gênio difícil e mesmo assim ainda torcer por mim, e ficar sempre ao meu lado. Você é uma pessoa admirável. Sua maneira de ser, seus princípios e todas as dificuldades que você enfrenta foram, e ainda são, um grande aprendizado e motivo de orgulho para mim.

Saiba que você teve um papel extremamente importante durante todo este período e que esta vitória também é sua.

Ao Prof.Dr. João Palermo-Neto

Entre os muitos ensinamentos que você já me passou ao longo de todos estes anos de convivência, gostaria que soubesse, ao final desta jornada, que um deles com certeza me acompanhará pelo resto da vida e diz o seguinte:

Jamais se deixe vencer pelo desânimo. Aprenda a começar e a recomeçar. Se caiu, levante-se e recomece. Se cometeu algum erro, peça desculpas e recomece.

Muito obrigado por acreditar em mim e ter me dado a oportunidade para recomeçar.

Para mim você é e será sempre um exemplo de profissionalismo, dedicação e amor à pesquisa e também um grande amigo.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Sá-Rocha

“A gratidão nunca é suficiente para se retribuir algo; é melhor oferecer gentilezas e estar à disposição ao longo da vida”.

Muito obrigado por tudo companheiro e conte sempre comigo, para o que você precisar.

À Dra. Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes

“As pessoas verdadeiramente importantes e especiais são modestas. Elas não precisam estar anunciando suas virtudes, seu poder e sua sabedoria. Os fatos se encarregam de demonstrar isso a todo instante”

À Profa. Dra. Ingrid Dragan Taricano

“Há pessoas que surgem em nossa vida, e reconhecemos imediatamente o sentido de sua presença; elas servem a algum tipo de propósito: nos ensinam uma lição ou nos ajudam a compreender quem somos.”

*Tenha certeza que você, em muitos momentos da minha vida,
já fez as duas coisas.*

Agradecimentos Especiais

Primeiramente, à DEUS , por me mostrar que, quando temos fé, podemos escutar sua voz silenciosa em nosso íntimo nos acalmando e nos guiando pelo melhor caminho, principalmente nos momentos mais difíceis de nossa vida.

À minha irmã DANIELA, que esteve sempre presente e disposta a ajudar no que fosse necessário.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pelo prazer de ter sido seu aluno de pós-graduação.

Ao Departamento de Patologia (VPT), pela satisfação e orgulho de ter trabalhado e usufruído de suas dependências por todos estes anos.

Ao Prof. Dr. Benjamin Eurico Malucelli pela amizade, apoio, incentivo e orientação sempre presentes.

A Dra. Silvia Morgulis por todos os conselhos e ensinamentos que me passou sempre. Desculpe por ter dado tanto trabalho!

A todos os professores do Departamento de Patologia pela oportunidade e pela satisfação do convívio.

Ao Departamento de Reprodução Animal (VRA) na pessoa do Prof. Dr. Cláudio Alvarenga e, em especial, à Érica do laboratório de dosagens hormonais (LDH) pelas dosagens de corticosterona.

Ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas do VPT, em especial ao Marco Aurélio Gattamorta, pela replicação da *Staphylococcus aureus* utilizada neste trabalho.

Aos meus amigos Alexandra Alves Nicolau, Paulo Maiorka e Carla Andréa Tieppo pela constante troca de idéias e discussões profissionais, além do respeito e da admiração mútua que existe entre nós.

A todos os meus colegas de pós-graduação: Ricardo, Alexandre Basso, Daniel, Eduardo, Elaine, Vanessa, Fred, Carol, Evelise, Mônica, Glaucie, Gláucia, Isabel, Adriana Portela, Nato, Luciana, Renata Geiss, Renatinha, Soraia, Marcela, Domênica, Ísis, Marcos, Benito, Helena, Breno, Adriana Valera, Aline, Letícia, Carlos Portela e Maria Rita.

Ao técnico do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia (LABFAT) do VPT, Ricardo Souza (Jibóia), pela constante ajuda e agradável companhia durante a realização dos experimentos.

Aos demais técnicos do LABFAT, Priscila e Magali pelo apoio durante os experimentos.

A todos os funcionários do bioterio do VPT, Cláudia, Nelsinho, Seu Luis, Idalina e Rosiris pelo carinho e dedicação na criação dos animais.

Às funcionárias da secretaria do VPT, Cris, Marguiti e Dona Romeika pela amizade e pela convivência.

Ao Claudinho e ao Luciano do laboratório de histopatologia pela amizade e por estarem sempre à disposição para ajudar.

E a todos os demais funcionários do VPT que de uma forma ou de outra tornam nosso dia a dia mais agradável.

Ao Prof. Dr. Sílvio e às secretárias da pós graduação Sandra, Cláudia e Deise, pela amizade e por toda a colaboração.

A todas as funcionárias da biblioteca pelo excelente atendimento e atenção a todos que as procuram.

À Maria Aparecida Dalboni (Fundação Oswaldo Ramos-UNIFESP) pelo fornecimento inicial da *Staphylococcus aureus* conjugada com PI e pela disponibilidade e orientação na conjugação da bactéria e na técnica de citometria de fluxo.

Ao Prof. Dr. Vassilios Papadopoulos (Georgetown University-Medical Center, NW, Washington, D.C.) pelo fornecimento do anticorpo anti-PBR.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida durante a realização deste trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido ao Projeto Temático (99/04228-7) da qual este trabalho faz parte.

Agradecimentos

À **UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO – UNISA**, na pessoa do Magnífico Reitor, Dr. Sidney Storch Dutra pela confiança e oportunidade que me concedeu de poder realizar um trabalho maravilhoso, e que hoje, é uma das coisas mais importante da minha vida.

À Pró Reitoria da UNISA, agradeço todo o apoio e confiança na pessoa dos
Pró Reitores:

Pró Reitor Acadêmico , Prof. José Douglas Dallora;
Pró Reitor Administrativo, Prof. Samuel Jacobs;
Pró Reitor Pós Graduação e Pesquisa, Prof. Josmar Sionti Arrais de Mattos.

À Diretora Acadêmica Pedagógica, Profa. Denise Sawaia Tofik, pelo prazer da convivência, por todo o apoio, pela clareza e total liberdade de trabalho.

À Profa. Dra. Lucienne Colombo Martini Zincaglia pela alegria, pelo apoio e por estar sempre presente e disposta a ajudar no que for necessário.

Ao Maurizio Batista de Souza pela realização da diagramação da tese e pela simpatia e simplicidade sempre presentes.

Ao amigo José Eduardo Andrade, pela amizade, pelo convívio diário e por trabalhar sempre disposto a fazer o melhor possível, em todas as situações.

À todos os Professores da Faculdade de Farmácia da UNISA que me dão a certeza que somos um time e que todos estão empenhados, juntamente comigo, em fazer esta Faculdade cada vez melhor.

À todos os alunos da Faculdade de Farmácia da UNISA. Vocês são a razão de tudo. São o meu combustível para continuar sempre procurando melhorar cada vez mais. Graças à vocês, hoje eu posso dizer que sei o que é trabalhar por prazer, por um ideal.

E a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

RESUMO

SILVA, F. R. **Efeitos de benzodiazepínicos sobre a atividade de neutrófilos de ratos avaliados por citometria de fluxo.** [Effects of benzodiazepines on rat neutrophil activity measured by flow cytometry]. 2003. 179 f. Tese (Doutorado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Benzodiazepínicos (BDZ) são fármacos ansiolíticos que se caracterizam por atuar em receptores GABA_A presentes no sistema nervoso central. Além dos receptores centrais os BDZ também possuem afinidade por sítios ligantes periféricos presentes em vários tecidos, dentre eles nas glândulas adrenais e em células polimorfonucleares. O presente experimento analisou os efeitos de BDZ sobre a atividade de neutrófilos e sobre os níveis séricos de corticosterona de ratos. Especificamente, o *burst* e a fagocitose de neutrófilos foram estudados após o tratamento *ex vivo* e *in vitro* com diazepam, RO 5-4864, clonazepam e/ou PK 11195. Os efeitos do diazepam sobre a atividade de neutrófilos também foram avaliados após o uso prolongado deste fármaco. Finalmente, os efeitos *in vitro* dos BDZ foram estudados após a incubação com um bloqueador do canal de cálcio (Ca²⁺) o L-verapamil. Os resultados mostraram que (1) o tratamento agudo *ex vivo* com diazepam (10 mg/kg) produziu um aumento do *burst* oxidativo e da fagocitose induzida por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus*; (2) o tratamento prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg) produziu um aumento do *burst* oxidativo induzido pelos mesmos estímulos e reduziu a fagocitose dos neutrófilos (porcentagem e intensidade); (3) o tratamento agudo *ex vivo* com diazepam, mas não o prolongado, aumentou os níveis séricos de corticosterona; (4) os efeitos da adição *in vitro* de diazepam (100 nM) foram na mesma direção daqueles observados após o tratamento agudo; (5) o RO 5-4864 (100 nM) induziu *in vitro* efeitos similares aos obtidos *ex vivo* (10 mg/kg) e *in vitro* (100 nM) com diazepam; (6) o tratamento *ex vivo* com clonazepam (10 mg/kg) diminuiu o *burst* oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* enquanto que o tratamento com este fármaco na dose

de 1 mg/kg aumentou o *burst* oxidativo destas células frente a todos os estímulos; (7) o tratamento *ex vivo* (1 e 10 mg/kg) e *in vitro* (100 nM) com clonazepam não alterou a fagocitose de neutrófilos; (8) os efeitos da adição *in vitro* de clonazepam sobre a atividade de neutrófilos vão na mesma direção daqueles observados após o tratamento *ex vivo* na dose de 1 mg/kg; (9) o clonazepam (1 e 10 mg/kg) aumentou os níveis séricos de corticosterona; (10) a adição *in vitro* do PK 11195 (100 nM) *per se* ou associado com diazepam (100 nM) ou RO 5-4864 (100 nM) aumentou o *burst* oxidativo e diminuiu a fagocitose realizada pelos neutrófilos; (11) a adição *in vitro* do PK 11195 (100 nM) associado com o clonazepam (100 nM) diminuiu o *burst* oxidativo induzido por PMA e diminuiu a fagocitose realizada por estas células; finalmente, (12) a pré incubação por 2 minutos com *L*-verapamil (100 nM) bloqueou todos os efeitos do diazepam sobre a atividade de neutrófilos estimulada por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e reverteu os efeitos do RO 5-4864 no *burst* oxidativo induzido por PMA. Esses resultados sugeriram que os efeitos dos BDZ não estão relacionados com a ativação de PBR nas células da glândula adrenal e também que eles não estão relacionados a um aumento dos níveis séricos de corticosterona. Indicaram que os BDZ tenham produzido mudanças na concentração do Ca^{2+} intracelular dos neutrófilos através da ativação de PBR seguida de um aumento da permeabilidade da membrana plasmática ao Ca^{2+} através da abertura de canais sensíveis ao *L*-verapamil, permitindo a entrada do Ca^{2+} . Os diferentes efeitos dos BDZ sobre o *burst* oxidativo e a fagocitose de neutrófilos foram atribuídos a ações específicas deste fármaco em subtipos de PBR presentes nos neutrófilos e nas membranas mitocondriais. Finalmente, os resultados sugeriram o desenvolvimento de tolerância aos efeitos do diazepam sobre os níveis séricos de corticosterona mas não sobre a atividade de neutrófilos.

Palavras-chave: Benzodiazepínicos, Neutrófilos, *Burst* Oxidativo, Fagocitose, PBR, Citometria de fluxo.

ABSTRACT

SILVA, F. R. **Effects of benzodiazepines on rat neutrophil activity measured by flow cytometry.** [Efeitos de benzodiazepínicos sobre a atividade de neutrófilos de ratos avaliados por citometria de fluxo]. 2003. 179 f. Tese (Doutorado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Benzodiazepines (BDZ) exert their anxiolytic effects via specific binding sites coupled to neuronal GABA_A receptors. They also affect a second, pharmacologically different type of receptor, which has been found in many sites such as blood polymorphonuclear cells and adrenals. The present experiment was designed to analyze the effects of BDZ on neutrophil activity and corticosterone serum levels in rats. Specifically, neutrophil oxidative *burst* and phagocytosis were studied after *ex vivo* and *in vitro* treatments with diazepam, Ro 5-4864, clonazepam and/or PK 11195. Diazepam effects on neutrophil activity were also taken after long-term treatment. Finally, *in vitro* effects of BDZ were studied after incubation with *L*-verapamil, a Ca²⁺ channel blocking agent. Results showed that (1) acute and *ex vivo* diazepam (10.0 mg/kg) treatment induced an increment on PMA, LPS and *Staphylococcus aureus* induced oxidative *burst* and phagocytosis (2) long-term (21 days, 10 mg/kg/day) diazepam treatment increased the oxidative *burst* induced by the same stimuli and reduced both intensity of phagocytosis and the percentage of neutrophil performing phagocytosis; (3) acute and *ex vivo* diazepam treatment, but not long-term diazepam treatment increased corticosterone serum levels; (4) the effects induced by *in vitro* addition of diazepam (100 nM) were in the same direction of those observed after acute treatment; (5) Ro 5-4864 (100 nM) induced similar effects to those of diazepam after *ex vivo* (10.0 mg/kg) and *in vitro* (100 nM) treatments; (6) *ex vivo* (10.0 mg/kg) clonazepam treatment decreased the neutrophil oxidative *burst* induced by PMA and *S. aureus* after a 1.0 mg/kg dose and decreased these parameters after a higher (10 mg/kg) dose; (7) *ex vivo* (1.0 and 10.0 mg/kg) and *in vitro* (100 nM) clonazepam treatments did not change neutrophil phagocytosis; (8) *in vitro* clonazepam (100 nM) induced effects on neutrophil activity that were in the same direction of those

observed after the 1.0 mg/kg dose (9) clonazepam (1.0 and 10.0 mg/kg) increased corticosterone serum levels; (10) *in vitro* PK 11195 (100 nM) *per se* or associated with diazepam (100 nM) or Ro 5-4864 (100 nM) increased PMA, LPS and *S. aureus* induced neutrophil oxidative *burst* and decreased cell phagocytosis; (11) *in vitro* PK 11195 (100 nM) together with clonazepam (100 nM) decreased PMA-induced oxidative *burst* and decreased *S. aureus* phagocytosis; finally, (12) *in vitro* L-verapamil (100 nM) incubation for 2 minutes prevented all effects induced by diazepam on PMA, LPS and *S. aureus* -induced neutrophil activity and reverted the effects induced by Ro 5-4864 (100 nM) on PMA-induced oxidative *burst*. These results suggest that BDZ effects on neutrophil activity were not related to PBR activation within the adrenal gland cells, leading to increments on corticosterone serum levels. They suggest instead that BDZ induced $[Ca^{2+}]_i$ changes in neutrophils through PBR activation followed by an increase in plasma membrane permeability due to L-verapamil sensitive Ca^{2+} channels and subsequent extracellular Ca^{2+} entry. The differences of BDZ effects on neutrophil oxidative *burst* and phagocytosis were attributed to specific actions on different PBR subtypes present on neutrophil and mitochondrial membranes. Finally, results suggest the development of tolerance to diazepam effects on corticosterone serum levels but not on neutrophil activity.

Key-words: Benzodiazepines, Neutrophil, Oxidative *Burst*, Phagocytosis, PBR, Flow Cytometry.

LISTA DE ABREVIATURAS E SEUS SIGNIFICADOS

ADP	– adenosina di-fosfato
ANC	– proteína carreadora do nucleotídeo adenina
ATCC25923	– cepa de Staphylococcus aureus
ATP	– adenosina trifosfato
B max	– binding máximo para receptores
BCG	– cepa atenuada do bacilo Calmette-Guerin
BDZ	– Benzodiazepínicos
BSA	– albumina sérica bovina
CBR	– receptor benzodiazepínico central
CRF	– fator liberador de corticotrofina
DAG	– diacil glicerol
DBI	– diazepam binding inhibitor
DCFH-DA	– 2'7' diacetato de diclorofluoresceína
ERO	– espécies reativas do oxigênio
FITC	– isotiocianato fluorescente
FMLP	– peptídeo quimiotático N-formilmetionilleucilfenilalanina
FSC	– feixe de luz que indica tamanho da célula
GABAA	– subunidade a do receptor gabaérgico
GM-CSF	– fator estimulador de colônia granulócito macrófago
HPA	– eixo hipotálamo hipófise adrenal
HRPO	– Horseradish peroxidase
IP-3	– fosfatidil inositol-3
Kd	– constante de afinidade
KDA	– kilodawtons
LPS	– lipopolissacáride
MPO	– enzima mieloperoxidase
NADPH-oxidase	– enzima responsável pela produção de ERO
OVA	– ovalbumina
PBR	– receptor benzodiazepínico periférico
PE	– phicoeritrina
PGE2	– prostaglandina E2
PI	– iodeto de propídio
PKC	– fosfoquinase-C
PLC	– fosfolipase-C
PMN	– células polimorfonucleares
PPG	– propilenoglicol
PRAX-1	– proteína-1 associada ao PBR
SAPI	– Staphylococcus aureus conjugada com iodeto de propídio
SI	– sistema imunológico
SNC	– sistema nervoso central
SSC	– feixe de luz que indica a granulosidade da célula
VDAC	– canal ânion voltagem dependente de 32 Kda
RO 5-4864	– agonista de receptores benzodiazepínicos periféricos
PK 11195	– antagonista de receptores benzodiazepínicos periféricos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação dos componentes e do funcionamento do citômetro de fluxo	44
Figura 2a – Representação esquemática da sequência de reagentes utilizados na técnica de <i>burst</i> e fagocitose.....	62
Figura 2b – Citômetro de fluxo modelo FACScalibur da Becton Dickinson acoplado a um computador Macintosh (G4) da Apple utilizado neste trabalho	66
Figura 3a – Citograma de leucócitos circulantes de ratos incubados apenas com o DCFH.....	74
Figura 3b – Histograma de neutrófilos incubados apenas com o DCFH.....	74
Figura 4a – Citograma de leucócitos circulantes de ratos incubados com o PMA.....	75
Figura 4b – Histograma de neutrófilos incubados com o PMA.....	76
Figura 5a – Citograma de leucócitos circulantes de ratos incubados com o LPS	76
Figura 5b – Histograma de neutrófilos incubados com o LPS	77
Figura 6a – Citograma de leucócitos circulantes de ratos incubados com o <i>S. aureus</i>	77
Figura 6b – Histograma de neutrófilos incubados com o <i>S. aureus</i>	78
Figura 7a – Citograma de neutrófilos circulantes de ratos incubados com o <i>S. aureus</i> realizando fagocitose	78
Figura 7b – Histograma de neutrófilos incubados com <i>S. aureus</i> realizando fagocitose. (1 e 2).....	79
Figura 7b – Histograma da intensidade de fagocitose de <i>S. aureus</i> pelos neutrófilos (3).	79
Figura 8 – Efeitos do tratamento agudo com diazepam (10 mg/kg) sobre o <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e <i>S. aureus</i>	81
Figura 9 – Efeitos do tratamento agudo com diazepam (10 mg/kg) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos	82
Figura 10 – Peso corporal de ratos após o tratamento prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg)	85
Figura 11 – Efeitos do tratamento prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg) sobre o <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e <i>S. aureus</i>	87
Figura 12 – Efeitos do tratamento prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos	88
Figura 13 – Efeitos do tratamento agudo com clonazepam (10 mg/kg) sobre o <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e <i>S. aureus</i>	91
Figura 14 – Efeitos do tratamento agudo com clonazepam (10 mg/kg) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos	92
Figura 15 – Efeitos do tratamento agudo com clonazepam (1 mg/kg) sobre o <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e <i>S. aureus</i>	95
Figura 16 – Efeitos do tratamento agudo com clonazepam (10 mg/kg) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos	96

Figura 17 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com diazepam (100 nM) sobre o <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e <i>S. aureus</i>	99
Figura 18 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com diazepam (100 nM) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos	100
Figura 19 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com RO 5-4864 (100 nM) sobre o <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e <i>S. aureus</i>	103
Figura 20 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com RO-4864 (100 nM) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos	104
Figura 21 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com clonazepam (100 nM) sobre o <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e <i>S. aureus</i>	107
Figura 22 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com clonazepam (100 nM) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos	108
Figura 23 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com PK 11195 (100 nM) sobre o <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e <i>S. aureus</i>	111
Figura 24 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com PK 11195 (100 nM) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos	112
Figura 25 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com diazepam+PK 11195 (100 nM) sobre o <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e <i>S. aureus</i>	115
Figura 26 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com diazepam+PK 11195 (100 nM) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos	116
Figura 27 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com RO 5-4864+PK 11195 (100 nM) sobre o <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e <i>S. aureus</i>	119
Figura 28 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com RO 5-4864+PK 11195 (100nM) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos	120
Figura 29 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com clonazepam+PK 11195 (100 nM) sobre o <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos induzido pelo PMA, LPS e <i>S. aureus</i>	123
Figura 30 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com clonazepam+PK 11195 (100 nM) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos	124
Figura 31 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com diazepam+L-verapamil (100 nM) sobre o <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e <i>S.aureus</i>	127
Figura 32 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com diazepam+L-verapamil (100 nM) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos	128
Figura 33 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com RO 5-4894+L-verapamil (100 nM) sobre o <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e <i>S. aureus</i>	131
Figura 34 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com RO 5-4864+L-verapamil (100 nM) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos	132
Figura 35 – Níveis séricos de corticosterona após o tratamento agudo e prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg) em ratos	134
Figura 36 – Níveis séricos de corticosterona após o tratamento agudo com clonazepam nas doses de 10 mg/kg e 1 mg/kg em ratos	136

Figura 37 – Leucócitos circulantes de ratos incubados com anticorpo anti-PBR.....	137
Figura 38 – Comparação das % de médias dos tratamentos agudos <i>ex vivo</i> com benzodiazepínicos sobre o <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos.....	139
Figura 39 – Comparação das % de médias dos tratamentos agudos <i>ex vivo</i> com benzodiazepínicos sobre a fagocitose de neutrófilos	140
Figura 40 – Comparação das % de médias dos tratamentos do diazepam, do RO 5-4864, do clonazepam e do PK 11195 <i>in vitro</i> na concentração de 100 nM sobre o <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos.....	141
Figura 41 – Comparação das % de médias dos tratamentos <i>in vitro</i> com diazepam, RO 5-4864, clonazepam e PK 11195 na concentração de 100 nM sobre a fagocitose de neutrófilos.....	142
Figura 42 – Comparação das % de médias do diazepam, do RO 5-4864 e do clonazepam <i>in vitro</i> na concentração de 100 nM sobre o <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos pré-incubados com PK 11195.....	144
Figura 43 – Comparação das % de médias do diazepam, do RO 5-4864 e do clonazepam <i>in vitro</i> na concentração de 100 nM sobre a fagocitose de neutrófilos pré-tratados com PK 11195	145
Figura 44 – Comparação das % de médias do diazepam e do RO 5-4864 <i>in vitro</i> na concentração de 100 nM sobre o <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos pré-tratados com L-verapamil	146
Figura 45 – Comparação das % de médias do diazepam e do RO 5-4864 <i>in vitro</i> na concentração de 100 nM sobre a fagocitose de neutrófilos pré-tratados com L-verapamil.....	147

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos do tratamento agudo com diazepam (10 mg/kg) sobre o <i>burst</i> oxidativo e a fagocitose de neutrófilos	84
Tabela 2 – Efeitos do tratamento prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg) sobre o <i>burst</i> oxidativo e a fagocitose de neutrófilos.....	89
Tabela 3 – Efeitos do tratamento agudo com clonazepam (10 mg/kg) sobre o <i>burst</i> oxidativo e a fagocitose de neutrófilos	93
Tabela 4 – Efeitos do tratamento agudo com clonazepam (1 mg/kg) sobre o <i>burst</i> oxidativo e a fagocitose de neutrófilos	97
Tabela 5 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com diazepam na concentração de 100 nM sobre o <i>burst</i> oxidativo e a fagocitose de neutrófilos	101
Tabela 6 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com RO 5-4864 na concentração de 100 nM sobre o <i>burst</i> oxidativo e a fagocitose de neutrófilos	105
Tabela 7 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com clonazepam na concentração de 100 nM sobre o <i>burst</i> oxidativo e a fagocitose de neutrófilos	109
Tabela 8 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com PK 11195 na concentração de 100 nM sobre o <i>burst</i> oxidativo e a fagocitose de neutrófilos	113
Tabela 9 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com diazepam na concentração de 100 nM sobre o <i>burst</i> oxidativo e a fagocitose de neutrófilos pré-tratados com PK 11195 na mesma dose	117
Tabela 10 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com RO 5-4864 na concentração de 100 nM sobre o <i>burst</i> oxidativo e a fagocitose de neutrófilos pré-tratados com PK 11195 na mesma dose	121
Tabela 11 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com clonazepam na concentração de 100 nM sobre o <i>burst</i> oxidativo e a fagocitose de neutrófilos pré-tratados com PK 11195 na mesma dose	125
Tabela 12 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com diazepam na concentração de 100 nM sobre o <i>burst</i> oxidativo e a fagocitose de neutrófilos pré-tratados com L-verapamil na mesma dose.....	129
Tabela 13 – Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com RO 5-4864 na concentração de 100 nM sobre o <i>burst</i> oxidativo e a fagocitose de neutrófilos pré-tratados com L-verapamil na mesma dose.....	133
Tabela 14 – Níveis séricos de corticosterona após o tratamento agudo e prolongado (21 dias) de diazepam (10 mg/kg) em ratos	135
Tabela 15 – Níveis séricos de corticosterona após o tratamento agudo com clonazepam nas doses de 10 mg/kg e 1 mg/kg em ratos	136

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 Neuroimunomodulação	23
2.2 Receptores benzodiazepínicos periféricos (PBR)	28
2.3 Os Neutrófilos	38
2.4 Princípios básicos em citometria de fluxo.....	42
2.5 Avaliação de fagócitos por citometria de fluxo.	47
3 OBJETIVOS	51
3.1 Objetivo Geral	51
3.2 Objetivos Específicos	51
4 MATERIAIS E MÉTODOS	54
4.1 Animais.....	54
4.2 Drogas e reagentes.....	55
4.2.1 <i>Drogas</i>	55
4.2.2 <i>Reagentes</i>	55
4.3 Procedimentos experimentais.....	57
4.3.1 <i>Administração do Diazepam</i>	57
4.3.2 <i>Reagentes e Estímulos para a verificação do <u>Burst</u> Oxidativo</i>	58
4.3.2.1 Preparo das Soluções:.....	58
4.3.2.2 Preparo dos Reagentes:	59
4.3.2.3 Preparo dos Estímulos:.....	60
4.3.3 <i>Avaliação do <u>Burst</u> Oxidativo e da Fagocitose de Neutrófilos por Citometria de Fluxo:</i>	62
4.3.4 <i>O Citômetro de Fluxo</i>	65
4.3.5 <i>Dosagem dos níveis séricos de Corticosterona</i>	66
4.3.6 <i>Imunoistoquímica</i>	68
4.3.7 <i>Documentação fotográfica</i>	70
4.4 Análise Estatística	70
5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS	72
5.1 Experimento 1 - Avaliar <i>ex vivo</i> e por citometria de fluxo, o <i>burst</i> oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e <i>Staphylococcus aureus</i> e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos, após o tratamento agudo com diazepam (10 mg/kg) e medido 1 hora após a administração do fármaco	72
5.2 Experimento 2 - Avaliar <i>ex vivo</i> e por citometria de fluxo, o <i>burst</i> oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e <i>Staphylococcus aureus</i> e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos, após o tratamento prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg) e medido 1 hora após a última administração do fármaco	84
5.3 Experimento 3 - Avaliar <i>ex vivo</i> e por citometria de fluxo, o <i>burst</i> oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e <i>Staphylococcus aureus</i> e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos, após tratamento agudo com clonazepam (10mg/kg) e medido 1 hora após a administração do fármaco	89
5.4 Experimento 4 - Avaliar <i>ex vivo</i> e por citometria de fluxo, o <i>burst</i> oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e <i>Staphylococcus aureus</i> e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos, após tratamento agudo com clonazepam (1mg/kg) e medido 1 hora após a administração do fármaco	93
5.5 Experimento 5 – Avaliar por citometria de fluxo, o <i>burst</i> oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e <i>Staphylococcus aureus</i> e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos, após o tratamento <i>in vitro</i> com diazepam na concentração de 100nM	97

5.6	Experimento 6 – Avaliar por citometria de fluxo, o <i>burst</i> oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e <i>Staphylococcus aureus</i> e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos, após o tratamento <i>in vitro</i> com RO 5-4864 na concentração de 100nM	101
5.7	Experimento 7 – Avaliar por citometria de fluxo, o <i>burst</i> oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e <i>Staphylococcus aureus</i> e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos, após o tratamento <i>in vitro</i> com clonazepam na concentração de 100nM.....	105
5.8	Experimento 8 – Avaliar por citometria de fluxo, o <i>burst</i> oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e <i>Staphylococcus aureus</i> e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos, após o tratamento <i>in vitro</i> com PK 11195 na concentração de 100nM	109
5.9	Experimento 9 – Avaliar por citometria de fluxo, os efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com diazepam (100nM) sobre o <i>burst</i> oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e <i>Staphylococcus aureus</i> e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos pré tratados com PK 11195, na mesma dose.....	113
5.10	Experimento 10 – Avaliar por citometria de fluxo, os efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com RO 5-4864 (100nM) sobre o <i>burst</i> oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e <i>Staphylococcus aureus</i> e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos pré tratados com PK 11195, na mesma dose.....	117
5.11	Experimento 11 – Avaliar por citometria de fluxo, os efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com clonazepam (100nM) sobre o <i>burst</i> oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e <i>Staphylococcus aureus</i> e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos pré tratados com PK 11195, na mesma dose.....	121
5.12	Experimento 12 – Avaliar por citometria de fluxo, os efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com diazepam (100nM) sobre o <i>burst</i> oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e <i>Staphylococcus aureus</i> e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos pré tratados com L-verapamil, na mesma dose.....	125
5.13	Experimento 13 – Avaliar por citometria de fluxo, os efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com RO 5-4864 (100nM) sobre o <i>burst</i> oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e <i>Staphylococcus aureus</i> e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos pré tratados com L-verapamil, na mesma dose	129
5.14	Experimento 14 - Avaliar os níveis séricos de corticosterona após o tratamento agudo e prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg)	133
5.15	Experimento 15 - Avaliar os níveis séricos de corticosterona após o tratamento agudo com clonazepam nas doses de 10 mg/kg e 1 mg/kg.....	135
5.16	Experimento 16 - Identificar receptores benzodiazepínicos periféricos na membrana de leucócitos circulantes de ratos por meio de imunoistoquímica.....	136
5.17	Comparação dos efeitos de BDZ sobre o <i>burst</i> oxidativo e a fagocitose de neutrófilos após o tratamento agudo <i>ex vivo</i> com diazepam 10 mg e com clonazepam 10 mg e 1 mg	138
5.18	Comparação dos efeitos de BDZ sobre o <i>burst</i> oxidativo e a fagocitose de neutrófilos após o tratamento <i>in vitro</i> com diazepam, RO 5-4684, clonazepam e PK 11195 (todos na concentração de 100 nM)	140

5.19	Comparação dos efeitos do diazepam, do RO 5-4864 e do clonazepam <i>in vitro</i> na concentração de 100 nM sobre <i>burst</i> oxidativo e a fagocitose de neutrófilos após o pré-tratamento com PK 11195	142
5.20	Comparação dos efeitos do diazepam e do RO 5-4864 <i>in vitro</i> na concentração de 100 nM sobre <i>burst</i> oxidativo e a fagocitose de neutrófilos após o pré-tratamento com <i>L</i> -verapamil	145
6	DISCUSSÃO.....	148
7	CONCLUSÕES.....	164
	REFERÊNCIAS.....	166

1 INTRODUÇÃO

Introduzidos na terapêutica no início da década de 60, os benzodiazepínicos (BDZ) representaram um grande avanço no tratamento da ansiedade por apresentarem uma grande eficácia, relativa seletividade de efeitos, baixa toxicidade e menor capacidade de criar dependência. Em decorrência deste fato, estes medicamentos figuram hoje entre as classes de fármacos psicotrópicos mais prescritas e utilizadas pela população em geral, no Brasil e no mundo; seu uso se dá não apenas por seus efeitos ansiolíticos, mas também por seus efeitos anticonvulsivante e relaxante muscular (GRAEF, 1989).

Com o passar do tempo, além do diazepam (Dienpax[®]), outros BDZ foram lançados no mercado; dentre eles merecem destaque por seu uso clínico, o clonazepam (Rivotril[®]), o lorazepam (Lorax[®]), o alprazolam (Frontal[®]) e o bromazepam (Lexotan[®]).

Todos estes fármacos possuem atividades farmacológicas semelhantes por atuarem em sítios receptores de alta afinidade localizados no Sistema Nervoso Central (SNC), conhecidos como receptores centrais para benzodiazepínicos (CBR) e que se encontram acoplados aos receptores GABA_A (BORMANN, 1988a).

Porém, além dos receptores centrais, foram descritos mais recentemente, outros sítios de ligação para os BDZ, localizados em sua maioria fora do SNC, sendo estes chamados de “periféricos” (PBR – peripheral benzodiazepine receptor) (MARANGOS et al., 1982). Estes sítios periféricos de ligação para BDZ já foram

identificados em vários órgãos como rins, fígado e pulmões (SAANO, 1988), em tecidos esteroideogênicos como adrenal e testículos (PAPADOPOULOS, 1993) e, também, em várias células do sistema imune como linfócitos, monócitos, macrófagos e polimorfonucleares (FERRARESE et al., 1990; SCHLUMPF et al., 1990, 1992; ZAVALA et al., 1984).

Levando-se em conta o extenso uso desta classe de medicamentos, a existência dos PBR e sabendo-se que fármacos com ação central podem interferir com parâmetros relacionados à imunidade de animais (LASCHI, 1983; MASSOCO; PALERMO-NETO, 1999), buscou-se, com o presente trabalho avaliar, através da técnica de citometria de fluxo, os possíveis efeitos da administração *ex vivo* e *in vitro* de BDZ sobre a atividade de neutrófilos de ratos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neuroimunomodulação

Neuroimunologia ou Psiconeuroimunologia é o ramo da ciência que busca estudar o relacionamento recíproco entre o Sistema Nervoso e os vários componentes do Sistema Imune. A sabedoria antiga já conhecia a integração corpórea; Aristóteles, já afirmava que a “psique” (alma) e o corpo reagiam complementarmente um com outro. Uma mudança no estado da psique produzia uma mudança na estrutura do corpo, e à inversa, uma mudança na estrutura do corpo produzia uma mudança na estrutura da psique. No entanto, embora muitos acreditassem na existência de comunicações entre o Sistema Nervoso e o Sistema Imune, desconhecia-se qualquer base biológica para essas interações.

Desde 1936, sabe-se que o Sistema Nervoso Central (SNC), pela mediação que exerce sobre as funções neurovegetativas durante o estresse, é capaz de influenciar a resposta do Sistema Imune. De fato, Hans Selye mostrou que o estresse causava alterações no tamanho do timo, do baço e dos linfonodos. Foi, no entanto, no final da década de 1950, que experimentos realizados com animais mostraram de forma mais clara que o estresse é capaz de afetar a imunidade humoral e celular. Nesta época, os pesquisadores constataram que ratos expostos a uma situação de estresse eram mais susceptíveis a infecções (NALIBOFF et al., 1991). Neste sentido, estudos epidemiológicos já haviam demonstrado que crianças submetidas a um estresse nos primeiros anos de vida poderiam ter alterada sua resposta a antígenos, quando avaliada na vida adulta.

Em 1977 publicou-se o primeiro trabalho mostrando, de forma inequívoca, que uma situação de estresse de natureza psicológica produzia alterações da função imune de maneira independente de hormônios (BARTROP et al., 1977). Neste sentido demonstrou-se também, nesta época, a existência de uma correlação antigênica entre timócitos, linfócitos B e vesículas sinápticas do cérebro de ratos (JANKOVIC et al., 1979).

Há uma razão bioquímica lógica para a ocorrência de interações entre os Sistemas Nervoso e Imune. Estes sistemas compartilham de receptores para citocinas, neurotransmissores, hormônios e neuropeptídeos (BLALOCK, 1984). Além disso, produtos originalmente tidos como específicos para cada um deles coexistem em tecidos linfóides, endócrino e nervoso. Assim, por exemplo, há células linfóides produzindo ACTH e TSH (BLALOCK, 1984) e citocinas sendo produzidas no SNC (BESEDOVSKY; DEL REY, 1986). Estas observações reforçaram a noção da existência de comunicações e relacionamento bidirecional entre os sistemas nervoso, endócrino e imune (MADDEN; FELTEN, 1995).

Modelos que envolvem lesões de estruturas específicas do SNC e estudos das relevantes alterações ocasionadas por estas em parâmetros ligados à atividade do sistema imune têm sido, também, utilizados para a pesquisa destas relações. Ratos com lesões no *locus ceruleus* apresentaram uma menor produção de anticorpos contra albumina sérica bovina, uma redução no tamanho do timo e uma redução da população de linfócitos CD4⁺ no sangue periférico (NIKOLIC et al., 1993). Na mesma direção, observou-se que lesões eletrolíticas no hipotálamo e de outras áreas do sistema límbico resultaram em mudanças na arquitetura do tecido

linfóide (ISAKOVIC et al., 1973), diminuição de reações anafiláticas e diminuição das respostas humorais a antígenos protéicos (JANKOVIC; ISACOVIC, 1973).

Por outro lado, o sistema Nervoso pode perceber e responder a sinais emitidos pela atividade do Sistema Imunológico (SI) durante uma resposta a um estímulo imunogênico sugerindo, este fato, ser o SI capaz de agir como um “órgão sensorial” (BESEDOVSKY; SORKIN, 1977). De fato, estes autores mostraram a ocorrência de uma ativação das células do núcleo ventromedial do hipotálamo durante o pico da resposta de produção de anticorpos formados em resposta a uma imunização primária.

Na mesma direção, Besedovsky (1981) observou que o sobrenadante de células imunes ativadas com concavalina A foi capaz de induzir um aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona em ratos, fato explicado por ele como sendo uma decorrência da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Mostrou-se, também, que a ativação máxima do eixo HPA relatada após o tratamento com hemácias de carneiro e com outros antígenos, ocorria 5-8 dias após o tratamento, momento este que coincidia com o pico de produção dos anticorpos.

Neste sentido, a injeção de interleucina-1 (IL-1), substância liberada por macrófagos ativados, também é capaz de ativar o eixo HPA, promovendo um aumento dos níveis plasmáticos de ACTH, e de corticosterona (BESEDOVSKY et al., 1986). De fato, mostrou-se que IL-1 ativa o eixo HPA de várias maneiras: (1) atuando diretamente na liberação do fator liberador de corticotrofina (CRF) pelo hipotálamo, com conseqüente liberação de ACTH pela hipófise anterior (BERKENBOSCH et al., 1987; SAPOLSKY et al., 1987); (2) ativando diretamente a

liberação de ACTH como comprovado em células da hipófise mantidas em cultura (PAWLIKOWSKI, 1994); (3) atuando diretamente na adrenal, e desta forma aumentando a liberação de glicocorticóides (GWOSDOW, 1992).

A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e a conseqüente liberação de ACTH e de glicocorticóides fazem parte das respostas neurovegetativas ligadas às situações de estresse e de ansiedade (GRAEF, 1989). A ativação do HPA pela IL-1, que pode ser produzida durante um processo inflamatório ou infeccioso passa, então, a ser considerada como uma situação capaz de gerar estresse ou ansiedade de forma semelhante àquela desencadeada por estímulos ambientais ou físicos (DUNN, 1995). De fato, a administração intracerebroventricular de IL-1 em camundongos produziu após 20 minutos uma redução da atividade exploratória dos mesmos (SPADARO; DUNN, 1990). Em nossos laboratórios verificou-se que animais deprimidos por estimulação aversiva apresentaram alterações na imunidade (ROBESPIERRE; PALERMO-NETO, 2001). Também foram demonstradas alterações no comportamento e na imunidade em camundongos cujas mães receberam um estresse pré-natal (FONSECA; PALERMO-NETO, 2002).

Existem outros modelos usados para o estudo das influências que o sistema imune exerce sobre o SNC. O condicionamento de eventos relacionados à resposta imune é um deles (ADER; COHEN, 1991). Devido à sua ação imunossupressora, animais “normais” evitam consumir soluções contendo ciclofosfamida bem como soluções doces que tenham sido associadas a essa droga. Entretanto, animais de uma linhagem de camundongos selecionada para manifestar uma doença autoimune, o lupus sistêmico, ingerem, voluntariamente, maiores quantidades de uma solução de leite achocolatado com ciclofosfamida que seus controles

congenitos sadios. Além disso, mostrou-se que esses animais bebem dessa solução a quantidade suficiente para reverter a linfadenopatia que possuem, de forma tal a reduzir o alto título de anticorpos apresentados por eles (ADER, 1990). Além disso, foi observado em animais imunizados com ovalbumina (OVA) o desenvolvimento de aversão a uma dieta contendo antígeno, ou seja, os animais imunizados deixam de beber uma solução adocicada com clara de ovo, passando a preferir água (BASSO et al, 2001).

Neste sentido, outros autores têm mostrado que a re-exposição a um estímulo condicionado, previamente pareado a uma droga imunossupressora, pode prevenir o aparecimento da artrite induzida experimentalmente por adjuvante de Freud, em ratos (KLOSTERHALFEN, 1983). Em ratos OVA-sensibilizados, um estímulo neutro (luz+som) pareado freqüentemente à inoculação do antígeno (OVA) passa a produzir *per se* uma resposta alérgica pulmonar caracterizada pela presença de broncoconstrição e de alterações comportamentais em tudo semelhantes àquelas desencadeadas pelo estímulo condicionado, isto é, pela inoculação de OVA (GUIMARÃES e PALERMO-NETO, 2000).

Estes e outros dados da literatura suportam, a existência de comunicações diretas e bidirecionais entre o SNC e o SI. Estes trabalhos têm contribuindo de forma marcante para o entendimento da regulação/modulação das respostas adaptativas do organismo frente a um estresse ou a uma patologia.

Neste contexto, fármacos com ação no SNC carregam potencial para modificar a imunidade por alterar principalmente, mas não exclusivamente, as atividades do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e/ou do sistema nervoso autônomo simpático

(WEIZMAN et al., 1997). De fato, os glicocorticóides têm efeitos imunomodulatórios como sumariado por Lazzarini e Palermo-Neto (2003) e terminações nervosas simpáticas já foram descritas na intimidade de tecidos linfóides (BASILE; SKOLNICK, 1988) onde exercem relevantes ações. Por outro lado, dadas às similaridades acima descritas, já foram relatadas ações diretas de fármacos em células imunes (RAMSEIER et al., 1993; MASSOCO; PALERMO-NETO, 1999; MARINO et al., 2001). Este é o caso dos BDZ, em especial, do diazepam.

2.2 Receptores benzodiazepínicos periféricos (PBR)

Embora extensamente caracterizados do ponto de vista farmacológico e bioquímico e implicados em vários processos biológicos, a função precisa dos PBR permanece como um enigma. (CASELLAS et al., 2002). Sabe-se que estes receptores estão amplamente distribuídos pelos diferentes tecidos, e até o presente momento não foram bem caracterizados os efeitos biológicos decorrentes de sua ativação. A grande maioria dos estudos realizados têm mostrado a presença de PBR junto à membrana externa das mitocôndrias, sendo denominados muitas vezes de receptores mitocondriais, estando talvez, envolvidos na modulação da respiração celular (ANHOLT, 1985; HIRSCH et al, 1988a; 1988b; CALVO et al., 1983). Entretanto, outros trabalhos têm indicado a presença destes receptores no núcleo, no complexo de Golgi, nos lisossomos, nos peroxissomos (O'BEIRNE et al., 1990) e, até mesmo, na membrana plasmática (OKE et al., 1992).

Os PBR são constituídos por uma proteína de 18 kDA caracterizada por 169 aminoácidos. São altamente hidrofóbicos e ricos em triptofano e têm sido descritos como um complexo multimérico composto por 3 subunidades: uma proteína de 18

kDA, um canal ânion voltagem dependente de 32 kDA (VDAC) e outra proteína carreadora do nucleotídeo adenina (ANC) (McENERY et al., 1992). Além destas, também têm sido relatadas duas proteínas adicionais que se associam aos PBR. A primeira, é uma proteína co-imunoprecipitada com os PBR e que está localizada em frações mitocondriais (BLAHOS et al., 1995), a outra é uma proteína de 240 kDA que foi chamada de proteína-1 associada ao PBR (PRAX -1) (GALIÈGUE et al., 1999). O papel destas duas proteínas ainda não está bem definido, embora, acredite-se que a PRAX-1 esteja envolvida na modulação da função dos PBR (CASELLAS et al., 2002).

Alguns estudos relacionados à esteroidogênese têm mostrado que os PBR modulam a produção de esteróides por facilitar a ligação e a translocação do colesterol de fora para dentro da mitocôndria, onde é transformado em pregnenolona, que é a forma primária da síntese de todos os hormônios esteroidais (PAPADOPOULOS, 1990). Neste sentido, alguns trabalhos demonstraram que a administração de diazepam estimulou a produção de testosterona em homens (ARGUELLES; ROSNER, 1975) e de glicocorticóide em ratos (MARC; MARSELLI, 1969; LAZZARINI; MALUCELLI; PALERMO-NETO, 2001). No SNC, os PBR foram localizados mais especificamente nas células gliais, estando, neste local, envolvidos com a produção de neuroesteróides (PAPADOPOULOS, 1993).

Quando os primeiros estudos envolvendo os PBR começaram a ser realizados acreditava-se que estes receptores seriam um subtipo dos CBR. Devido a isto, vários estudos foram realizados com diferentes tipos de benzodiazepínicos como o diazepam, o flunitrazepam, o clonazepam, entre outros, com o objetivo de se avaliar melhor o funcionamento do receptor periférico. Assim, por meio de estudos

de “*binding*” pôde-se verificar que o diazepam e o midazolam ligam-se com alta afinidade tanto em CBR como em PBR, sendo por isto chamados de agonistas mistos. Já o composto 4’ clordiazepam, também conhecido como RO 5-4864 liga-se com afinidade alta aos PBR, mas com baixa afinidade aos CBR (SYAPIN; SKOLNICK, 1979). Por outro lado, o clonazepam liga-se com alta afinidade aos CBR e com baixa afinidade aos PBR. Além dos BDZ, existem também outras substâncias que apresentam uma afinidade pelos PBR como os derivados da carboxamida isoquinolina. Um destes derivados, o composto PK 11195 (1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolona carboxamida), mesmo que estruturalmente diferente dos BDZ, é considerado o ligante padrão para o estudo dos mesmos por apresentarem uma alta afinidade ($K_D < 20$ nM) por estes receptores (Le FUR et al., 1983).

Além dos ligantes, já descritos acima para os PBR, podemos citar outras substâncias que diferem entre si quanto à afinidade, mas que também atuam nestes receptores. Entre elas estão as porfirinas (VERMA; NYE; SNYDER, 1987), os diuréticos tiazídicos (LUKEMAN; FANESTIL, 1987), alguns inseticidas piretróides (DEVAUD; MURRAY, 1988; RIGHI; PALERMO-NETO, 1999), anticonvulsivantes como a carbamazepina (MARANGOS et al., 1983), anestésicos como a lidocaína (CLARK; POST, 1990) e certos hormônios esteróides (DECKERT; MARANGOS, 1986).

Apesar das mais diversas substâncias apresentarem uma afinidade aos PBR, sem dúvida alguma o PK 11195 e o RO 5-4864 são as drogas mais utilizadas para o estudo destes receptores. Com base em alguns estudos de entalpia e de entropia da interação ligante-receptor, verificou-se que o RO 5-4864 atuava como um agonista

de PBR, enquanto que o PK 11195 foi considerado um antagonista (Le FUR et al., 1983). Contudo, esta classificação ainda é duvidosa, pois sob algumas condições fisiológicas, dependendo da concentração utilizada, do tipo de tecido ou da célula analisada, ambos podem apresentar efeitos similares.

Importante lembrar que além de agonistas e antagonistas, existem também moléculas endógenas que apresentam certa afinidade pelos PBR. Sabe-se, neste sentido, que uma substância, o DBI (*diazepam binding inhibitor*) - descrito originalmente como um ligante endógeno que possui a capacidade de inibir a ligação do diazepam aos CBR - também apresenta afinidade por PBR (GUIDOTTI et al., 1983). Mostrou-se também que outros ligantes endógenos como as porfirinas (protoporfirina IX, mesoporfirina IX, deuteroporfirina IX e heme) apresentam alta afinidade de ligação nestes receptores (VERMA et al., 1987).

Ensaio de *binding* realizados com os PBR mostraram que há uma diversidade quanto à sua localização nos tecidos estudados, bem como no relativo a seus níveis de expressão. Tecidos glandulares como a glândula pineal, adrenais, glândulas salivares e gônadas apresentaram uma maior expressão destes receptores ($B_{\max}$ 8-20 pmol/mg de proteína), enquanto que os rins e o coração apresentaram uma expressão intermediária dos mesmos ($B_{\max}$ 5-8 pmol/mg de proteína) (ANHOLT et al., 1985). Em contraste, o tecido cerebral e o fígado apresentaram uma baixa densidade de PBR.

Um estudo realizado por Guidotti et al. (1988) onde foram utilizados o diazepam, o RO 5-4864, e outros ligantes que apresentam pouca ou nenhuma afinidade pelos sítios centrais, mas uma alta afinidade pelos sítios periféricos,

demonstrou-se ser possível reconhecer uma alta densidade de sítios de ligação para BDZ numa grande quantidade de órgãos periféricos como o rim, fígado, pulmões, músculo estriado esquelético e coração; observou-se, ainda, presença destes sítios nas células endoteliais dos ventrículos, no plexo corioídeo e no nervo olfatório. Estes achados sugeriram uma localização predominantemente extra neuronal para os mesmos (BENAVIDES et al., 1983; BRAESTRUP; SQUIRES, 1977; SAANO, 1988). No rim, os sítios de ligação foram localizados na porção ascendente da alça de Henle e no túbulo contorcido distal, o que sugere a possibilidade de que estes receptores estejam relacionados com a ação da vasopressina na regulação da reabsorção de água e de eletrólitos (DEL ZOMPO et al., 1983; VERMA; SNYDER, 1989). Também foram localizados PBR em linfócitos (ROCCA et al., 1993), monócitos e em macrófagos (SCHLUMPF et al., 1990, 1992; ZAVALA et al., 1984; ZAVALA; LENFANT, 1987), sendo que, o papel destes receptores, juntamente com os receptores centrais, na modulação dos processos imuno-inflamatórios não está totalmente esclarecido até o momento. Neste sentido, é importante dizer também que subunidades de subtipos de PBR já foram descritas (Mc ENERY et al., 1992).

Como já citado anteriormente, sítios de ligação para BDZ têm sido identificados em monócitos (RUFF et al., 1985) e em células polimorfonucleares (CANAT et al., 1992), sendo estas células relatadas como apresentando aproximadamente 900.000 sítios/célula, como revelado por meio de uma análise de “Scatchard” (K_D de 52 nM para o ligante RO 5-4864). Com relação à densidade dos PBR presentes em células do sistema imune, foi relatado que monócitos e neutrófilos apresentam uma densidade semelhante entre si, porém esta densidade é maior quando comparada com aquela de linfócitos B, células NK e linfócitos T (CD4 e CD8) (ZAVALA, 1997). Esta densa distribuição dos PBR em células do sistema

imune sugere uma possível função imunoregulatória para os mesmos. Neste sentido, sabe-se que o RO 5-4864, aumentou a atividade quimiotática de monócitos e este efeito foi revertido pelo PK 11195 (RUFF et al., 1985).

A ativação dos PBR, por outro lado, modifica a expressão e a liberação de várias citocinas, como TNF- α , IL-1, IL-2 e IL-6 (SCHLUMPF et al., 1994) e de produtos celulares (TORRES et al., 2000) cujos efeitos influenciam fortemente a resposta imune/inflamatória. Em nossos laboratórios, têm sido demonstrado um efeito antiinflamatório para o diazepam no modelo de edema de pata induzido pela carragenina em ratos (LAZZARINI; MALUCELLI; PALERMO-NETO, 1996, 2001; 2003). Por outro lado, já existem trabalhos na literatura que descrevem efeitos para os ligantes de PBR na resposta imunológica. Schlumpf et al. (1989) observaram que baixas doses de diazepam aplicadas em ratas prenhes inibiam, em suas proles, manifestações imunológicas dependentes de células T. Outros trabalhos semelhantes têm indicado que os BDZ administrados de forma aguda, diminuem a proliferação de linfócitos T e B tanto “*in vivo*” como “*in vitro*” (DESCOTES et al., 1982; BALLANTYNE; HALPER, 1975; LASCHI et al., 1983; AURORA et al., 1987; RAMSEIER et al., 1993). É importante ressaltar que esses trabalhos não foram capazes de mostrar ações tóxicas diretas destes BDZ sobre os linfócitos já maduros.

Com relação a estes fatos, observou-se que um tratamento agudo ou pré-natal com diazepam não alterou a porcentagem de macrófagos, de células T CD4⁺ ou CD8⁺ e de linfócitos B (SCHREIBER et al., 1993). Torna-se assim possível sugerir que o tratamento com BDZ modifique a liberação de citocinas pelos linfócitos T como consequência de distúrbios na função dos macrófagos, das células B e/ou, ainda, de alterações na própria célula T. Neste contexto, é possível que a redução

de IL-2 afete a expressão de diversos receptores, e também de outras interleucinas. Com isso, é possível sugerir que toda a cascata das citocinas seja afetada pelo tratamento com diazepam, não sendo fácil localizar-se o ponto primário desta ação. Também foi sugerido um envolvimento da prostaglandina E_2 com os efeitos dos BDZ (SCHLUMPF et al., 1994). Vale lembrar que a produção de PGE_2 - um produto do metabolismo do ácido araquidônico em macrófagos - pode ser induzida por uma variedade de estímulos incluindo-se, entre eles, lipopolissacarídeos bacterianos e as próprias IL-1 e $TNF-\alpha$, o que indica que aspectos inflamatórios, além de imunológicos podem também ser modificados por BDZ.

Em nossos laboratórios Massoco e Palermo-Neto (1999) mostraram que a administração de diazepam diminuiu a atividade de macrófagos de camundongos, demonstrada através da medida do espraimento, da fagocitose e produção de H_2O_2 . Este fato também foi observado em proles de ratos tratados perinatalmente com diazepam e avaliados quando na idade adulta (SILVA; PALERMO-NETO, 1999). Verificou-se, também, que o tratamento com midazolam diminuiu a produção de $TNF-\alpha$ liberado por macrófagos peritoneais de eqüinos e que ainda este tratamento alterou a capacidade de fagocitose destas células e também de neutrófilos sangüíneos (MASSOCO; PALERMO-NETO, 2003).

Por outro lado, mostrou-se que a exposição perinatal ao diazepam reduziu a resistência de ratos à uma infestação experimental por *Trichinella spiralis*, fato associado pelos autores a uma deficiência na biologia dos macrófagos e/ou dos linfócitos T e B (SCHLUMPF et al., 1994). Em nossos laboratórios observou-se, que a administração pré-natal de diazepam (1,5 mg/kg) aumentou a sensibilidade da prole a uma infecção pelo *Mycobacterium bovis*. Especificamente, observou-se na

prole proveniente de mães tratadas: um aumento da mortalidade; um maior número a áreas de granulomas observados no fígado, no baço e nos pulmões, e um aumento do número de bacilos recuperados dos tecidos dos animais inoculados com BCG (UGAZ et al., 1998). Righi et al. (1999) também observaram este fato em hamsters adultos tratados com diazepam.

Outros trabalhos mostraram que filhotes de ratas tratadas com BDZs durante um certo período de sua gestação exibiam uma marcada redução de $\text{TNF-}\alpha$ (KELLOGG et al., 1983; SCHLUMPF et al., 1989, 1990). Observou-se, também, que essas alterações eram acompanhadas tanto por reduções do número de PBR em macrófagos esplênicos, como por alterações na afinidade de linfócitos esplênicos a ligantes BDZ periféricos (SCHLUMPF et al., 1989, 1990). Nesse sentido, é importante ressaltar que agonistas de PBR também interferem com a fagocitose destas células (COVELLI et al., 1989; KRUMHOLZ et al., 1989).

Desta forma, embora não seja possível precisar o significado funcional desses achados, parece factível sugerir que exista uma ligação entre PBR, o "*binding*" desses receptores pelo diazepam e a imunidade. Reforça esta premissa a observação de que o tratamento pré-natal com Ro 5-4864 também causou depressão pós-natal da resposta imune (SCHLUMPF et al., 1990). No entanto, outros fatores como a atividade de linfócitos T e B, de macrófagos, bem como a secreção de glicocorticóides e a síntese de prostaglandinas foram, e podem estar também, envolvidos com estes efeitos (SCHLUMPF et al., 1989; SCHLUMPF, et al., 1990; KRUEGER e PAPADOPOULOS 1990; KOZIKOWSKI et al., 1997).

No entanto, os dados existentes até hoje sobre BDZ e PBR são muito discordantes e a maioria deles refere-se a roedores e humanos. Enquanto alguns verificaram uma imunoestimulação após a administração de BDZ (FRIDE et al., 1990; MARINO et al., 2001), outros se depararam com um efeito imunossupressor para os mesmos (RAMSEIER; LICHTENSTEIGER; SCHLUMPF, 1993; RIGHI; PALERMO-NETO, 1999). Muito provavelmente, estas divergências são decorrência das variáveis existentes nos diferentes modelos experimentais empregados como, por exemplo, nas doses, nas espécies animais, nos períodos de tratamento, nas vias de administração e, até mesmo, nas células e/ou tecidos analisados. De fato, um dos primeiros trabalhos a mostrar os efeitos dos BDZ sobre a função imune foi relacionado a um experimento, de análise toxicológica, no qual repetidas administrações de altas doses de diazepam provocaram uma diminuição na resposta imune humoral e celular de camundongos (DESCOTES et al., 1982). Já, em um outro trabalho, onde se administrou diazepam, o RO 5-4864 ou o PK 11195 na dose de 1 mg/kg verificou-se um aumento significativo na resposta imune humoral (LENFANT et al., 1986).

Outro mecanismo de ação mediado pelos PBR, sugerido por Bissierbe et al. (1986), está ligado aos canais de cálcio voltagem-dependente. Assim, estudos realizados *in vitro*, atribuíram ao RO 5-4864 um efeito antiproliferativo em cultura celular devido a uma inibição do influxo de cálcio para dentro das células alterando, este fato, a conformação do citoesqueleto, necessária para o espreadamento e para a fagocitose. Neste sentido, foi demonstrado por Marino et al. (2001) um aumento da migração e da atividade fagocítica de neutrófilos após a administração de diazepam; este efeito foi atribuído a alterações no influxo de cálcio mediado pelos PBR. Alguns investigadores chegaram a sugerir que os PBR poderiam regular a permeabilidade

iônica das membranas, fato que ocorre durante o metabolismo da mitocôndria e de outras organelas, favorecendo assim, o funcionamento celular adequado (CASELLAS et al., 2002).

Foi demonstrado também que a administração aguda de alguns BDZ e do PK11195 foi capaz de inibir o metabolismo oxidativo gerado pela fagocitose realizada por macrófagos murinos (ZAVALA et al., 1990). Uma possível explicação para esta diminuição de metabolismo produzido por ligantes de PBR seria uma interferência destes com as trocas de ADP citoplasmático com o ATP mitocondrial, sugerindo este fato, a existência de um elo de ligação entre os PBR e os canais de ânion voltagem-dependentes presentes nas membranas mitocondriais (HIRSCH et al., 1988a).

Com base no que foi exposto, é possível perceber que o grande número de estudos já realizados sobre os PBR sugerem uma grande relevância destes receptores com várias e importantes funções fisiológicas do organismo, como, por exemplo, a esteroidogênese (PAPADOPOULOS et al., 1990), o crescimento e a diferenciação celular (WANG et al., 1984), a quimiotaxia (RUFF et al., 1985), o controle respiratório mitocondrial (HIRSCH et al., 1989) e a atividade fagocítica (MARINO et al., 2001). Após uma análise conjunta dos dados de literatura, no entanto, têm-se a sensação de que ainda há muito que se buscar para o completo entendimento das complexas ações dos BDZ sobre os PBR, em especial, sobre a imunidade. Além disso, o extenso uso clínico dos BDZ também não pode ser esquecido o que demanda pela busca de mais conhecimentos.

2.3 Os Neutrófilos

Os neutrófilos correspondem a aproximadamente metade dos leucócitos circulantes em muitas espécies animais; são diferenciados de outros polimorfonucleares por apresentarem núcleos multilobulados e grânulos citoplasmáticos distintos. Estes incluem grânulos primários ou azurófilos, secundários ou específicos e grânulos terciários, os quais contêm enzimas, proteínas e glicosaminoglicanas que se acredita participem de muitas funções do neutrófilo (HELLEWELL; WILLIAMS, 1994). Em esfregaços de sangue, os grânulos dos neutrófilos não se apresentam nem azuis, como os dos basófilos, nem vermelho-alaranjados, como os dos eosinófilos, daí o nome que receberam: neutrófilos (BAINTON, 1988).

De uma maneira geral os neutrófilos, juntamente com os macrófagos, exercem um papel importante na defesa orgânica contra microorganismos, sendo a migração desta célula dentro dos tecidos considerada como crucial e de grande importância para a sobrevivência dos mesmos (LEHRER et al., 1988). Crianças com anormalidades na migração de neutrófilos apresentaram infecções repetitivas (BEATTY et al., 1984) e animais “depletados” experimentalmente de neutrófilos circulantes mostraram-se incapazes de combater bactérias gram-negativas presentes em seus pulmões (REHM et al., 1980).

Os neutrófilos podem ser atraídos quimiotaticamente por bactérias e por corpos estranhos presentes nas áreas de inflamação, além de mastócitos e basófilos. Em seguida, ocorre a fagocitose e em consequência desta, os microorganismos fagocitados são mortos por proteínas citotóxicas derivadas de

grânulos citoplasmáticos e/ou por produção local de espécies reativas de oxigênio (STITES; TERR, 1991). Sabe-se que estas células também estão envolvidas na síntese e liberação de citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α) e que modulam os efeitos de linfócitos T e B (LLOYD; OPPENHEIN, 1992). Portanto, é possível concluir que os neutrófilos tenham 2 funções relacionadas à resposta imune-inflamatória. Uma função ligada à fagocitose e a desgranulação e a outra relacionada com a liberação de citocinas imunomodulatórias.

É de amplo conhecimento que os neutrófilos produzem espécies reativas do oxigênio (ERO) como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil, ânion superóxido e o oxigênio *singlet* (WEISS et al., 1981; BADWEY; KARNOVSKY, 1983; PICK; MIZEL 1981); estas são produzidas *in vivo* durante o metabolismo de células aeróbicas ou são produto de secreção de fagócitos ativados (BADWEY et al., 1983; ROOT; METCALF, 1975). Em ambos os casos, resultam de uma seqüência de reações bioquímicas de alto consumo de oxigênio conhecidas como *burst* oxidativo.

As espécies reativas do oxigênio geradas pelos neutrófilos desempenham um papel importante como oxidantes microbicidas, ou como mediadores da inflamação e da lesão tecidual. Uma vez estimulados, a maior parte do oxigênio consumido por neutrófilos é convertida em ânion superóxido pela enzima NADPH oxidase. A produção das espécies reativas do oxigênio inicia-se com a redução do oxigênio a superóxido, com a NADPH atuando como doador de elétrons. Desta maneira, a produção de NADPH constitui etapa limitante do processo de produção de espécies reativas do oxigênio pelos neutrófilos (PARK; BABIOR, 1997; PARK et al., 1997; SMITH et al., 1996; BABIOR, 1995; DUSI et al., 1995).

O ânion superóxido produzido sob estímulo de neutrófilos é rapidamente convertido em H_2O_2 e radical hidroxil (ALLEN, 1982), que contribuem para a atividade microbicida dentro do fagolisossomo e no meio extracelular. A quantidade de H_2O_2 produzida no fagolisossomo de neutrófilos não é suficiente para eliminar totalmente as bactérias e outros microorganismos. Contudo, a enzima mieloperoxidase (MPO) produzida nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos quando combinada com a H_2O_2 gera hipoclorito que apresenta uma atividade antimicrobiana mais eficaz. Assim, uma das técnicas mais utilizadas para análise da atividade neutrofílica é a mensuração da atividade da MPO, pois vários trabalhos já demonstraram que o sistema dependente dessa enzima é mais eficaz contra bactérias, fungos e parasitas do que a ação dos radicais de oxigênio sozinhos (ODA et al., 1995).

A mensuração dos níveis de liberação de peróxido de hidrogênio é considerada como um parâmetro de avaliação da ativação de fagócitos (NATHAN, 1977; ROOT, 1975). Esta mensuração pode ser realizada através da oxidação do “*phenol red*” dependente de peroxidase (*Horseradish peroxidase*-HRPO), sendo este método utilizado, por exemplo, para análise da ativação de células da cavidade peritoneal (PICK; MIZEL, 1981; ROBINSON; BADWEY, 1994).

Diferentes trabalhos indicam que estas espécies reativas derivadas do oxigênio têm participação nos processos de inflamação, morte celular e tecidual, transformação neoplásica, aterosclerose e envelhecimento (HAMMOND et al., 1985).

Através da produção de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase-dismutase, os neutrófilos protegem-se dos efeitos nocivos das espécies reativas do oxigênio. Além disso, também produzem compostos antioxidantes como as vitaminas E e C (PEREIRA et al., 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989; CHESON et al., 1976).

Com relação ao papel imunorregulatório dos neutrófilos, é possível relacionar esta atividade com a produção de IL-1 por estas células (TIKU et al., 1986; GOH et al., 1989; DINARELLO, 1991; LORD et al., 1991). A IL-1, que possui inúmeras atividades biológicas, também é produzida por polimorfonucleares (PMN) em duas formas, a IL-1 α e a IL-1 β . Estas proteínas podem ser transcritas em PMN dentro de 2 a 6 horas após a estimulação com LPS, IL-1 α ou GM-CSF (Fator estimulador de colônia granulócito macrófago) (LORD et al., 1991).

Durante o processo inflamatório, a IL-1 produzida por neutrófilos pode servir para inúmeras funções incluindo-se entre elas a estimulação da síntese e liberação de proteínas de fase aguda, o aumento da ativação de células T e B e a indução de outras citocinas regulatórias com IL-6, IL-8 e GM-CSF (DINARELLO, 1991).

Os neutrófilos circulantes também sintetizam e liberam outras citocinas imunoregulatórias tais como TNF- α (DUBRAVEC et al., 1990) e GM-CSF (LINDEMANN et al., 1989) em resposta à estimulação com LPS. A produção pelos neutrófilos de TNF- α e de IL-1 pode ter funções regulatórias, principalmente na formação do edema inflamatório, devido ao aumento da permeabilidade vascular induzido por estas citocinas (ABE et al., 1990).

Neste sentido, é possível inferir que os neutrófilos e outros PMN tenham como principais funções fagocitar e destruir restos celulares, liberar mediadores inflamatórios e secretar citocinas, atuando direta e significativamente sobre a direção e a evolução de resposta imune, tornando-se, portanto, em elementos ativos na resposta imune/inflamatória (CASSATELLA, 1995).

Uma vez que os neutrófilos contém PBR (FINNERTY et al., 1991), e que suas atividades são moduladas por estes receptores, defende-se a relevância de estudos que buscam identificar não apenas a presença dos PBR em neutrófilos, mas também alguns dos efeitos de BDZ sobre estas células.

2.4 Princípios básicos em citometria de fluxo

Citometria de fluxo é uma técnica que simultaneamente mensura e analisa as múltiplas características físicas de partículas simples, geralmente de células, suspensas em um sistema de fluxo, desenvolvido de forma tal a permitir que estas células passem por um ponto de luz, ou seja, consiste em um fluxo contínuo de células suspensas em uma solução isotônica que passam por um foco de luz (laser). Quando as células passam por este ponto de luz, sua imagem (sombra) e sua fluorescência são registradas por um leitor óptico; estas são posteriormente enviadas para um sistema eletrônico que converterá o sinal óptico recebido em outro, eletrônico possibilitando assim a leitura dos dados por um computador. Outra importante característica da citometria de fluxo é que as análises das células que estão presentes na suspensão são feitas separadamente, célula por célula, isto é, não é feita simplesmente uma análise da média de valores obtidos para toda

população. Todas as células são analisadas individualmente porque passam, uma a uma, pelo foco de luz.

Dentre os parâmetros possíveis de serem medidos por citometria de fluxo, citam-se o tamanho, a granulosidade, a complexidade interna e a fluorescência relativa da célula. Esta capacidade de medir múltiplos parâmetros celulares pela incidência de luz e, também, por fluorescência torna possível separar fisicamente subpopulações celulares. Devido a isto, o uso da citometria de fluxo como um instrumento de diagnósticos tem aumentado muito nos últimos anos, quer em biologia, quer em medicina.

As aplicações da citometria de fluxo são numerosas e permitem a realização de pesquisas verticalizadas em diversos parâmetros celulares como: quantidade de ácidos nucléicos, atividade enzimática, fluxo de cálcio, potencial de membrana e pH. Além disso, também é possível o uso de fluorocromos ligados a anticorpos mono e policlonais para estudar a densidade, a função e a distribuição de células e de receptores.

O citômetro de fluxo consiste basicamente em uma fonte de luz, um sistema de lentes para focalizar a luz no fluxo de células, um fluxo de células, componentes ópticos que focalizam luzes com diferentes cores nos detectores e eletrodos para amplificar e processar o sinal e um computador. Estes componentes estão representados na Figura 1.

Figura 1 – Representação dos componentes e do funcionamento do citômetro de fluxo. Os detectores (FMT) captam a luz do laser, e a lançam sobre os detectores posicionados horizontalmente (FSC) e perpendicularmente (SSC) em relação ao laser, podendo medir ainda mais 3 canais de fluorescência nas diferentes cores: verde, amarelo e vermelho

Este aparelho além de analisar diferentes parâmetros celulares, também possibilita separar células de acordo com as diferenças físicas existentes entre elas.

Este processo que consiste em identificar células que estão passando pelo fluxo do aparelho e separá-las individualmente é chamado de "sorting", que pode ser de 2 tipos: eletromagnético ou mecânico.

Após a separação das células em populações distintas, torna-se possível analisá-las do ponto de vista microscópico, bioquímico e/ou funcional.

O FACSCalibur utilizado neste trabalho possui o sistema de sorting mecânico. Vale lembrar que nem todos os citômetros são equipados com o sistema de sorting, entretanto esta função pode ser facilmente acoplada a eles.

Basicamente, o citômetro de fluxo como se vê na figura 1 é composto por 3 sistemas principais, que são: um sistema fluídico, um sistema óptico e um sistema eletrônico.

- O sistema fluídico consiste de um fluxo de única direção que pode ser chamado de fluído de bainha e que controla a direção e regula o fluxo e a velocidade das células através do foco de luz.
- O sistema óptico é composto por um laser que pode ter diferentes comprimentos de onda, sendo o mais comum, aquele que usa o comprimento de onda de 480 nm. Além disso, há também um conjunto de filtros ópticos para focalizar e direcionar a luz.

Dentro do sistema óptico existem 2 parâmetros de análise das células que são de extrema importância, e que são chamados de canais ópticos.

Os canais ópticos são o “Forward Scatter” (FSC), que indica o tamanho da célula e ocorre quando o feixe de luz, que passa pela célula, é detectado por um sensor posicionado horizontalmente ao feixe. O outro canal é o “Side Scatter” (SSC), que indica a granulosidade da célula e ocorre quando o feixe de luz, após incidir sobre a célula, é lançado, ou projetado sobre sensores posicionados perpendicularmente ao laser.

Estes 2 canais não dependem de fluorescência; no entanto, também existem canais de fluorescência. O aparelho utilizado neste trabalho possui 3 canais de fluorescência; portanto, é possível analisar com ele até 5 parâmetros para cada evento, ou seja, FSC, SSC e mais 3 canais de fluorescência. Para verificar-se a fluorescência é necessário a utilização de fluorocromos. Dentre os mais comuns, podemos citar o isotiocianato fluorescente (FITC), que emite uma fluorescência verde e a phicoeritrina (PE), que emite uma fluorescência vermelha.

Com relação ao sistema óptico do aparelho, também é importante saber sobre a existência de um sistema de refrigeração do laser, e que este sistema pode ser à água ou a ar.

- O sistema eletrônico é responsável por converter o sinal óptico em um sinal eletrônico que será analisado por um computador.

Infelizmente, o citômetro de fluxo não é um aparelho simples; como todo aparelho sofisticado é muito importante que se tenha um conhecimento básico dos seus princípios de funcionamento para que seja possível não apenas operar o aparelho corretamente, mas também e principalmente entender com precisão o significado dos resultados obtidos.

No entanto, satisfeitos estes quesitos, pode-se usar do aparelho para análises muito interessantes, como por exemplo, para análise de fagócitos.

2.5 Avaliação de fagócitos por citometria de fluxo.

A fagocitose e o *burst* oxidativo dos neutrófilos e macrófagos representa, como já comentado, uma seqüência de eventos essenciais para a morte intracelular de bactérias. Assim, a porcentagem de células que realizam fagocitose, além da quantidade de bactérias internalizadas e os derivados ativos do oxigênio (superóxido, peróxido de hidrogênio, radical de hidroxila, oxigênio singlet) gerados durante as reações acima são de grande interesse no estudo da atividade microbica e do metabolismo oxidativo dos leucócitos.

As técnicas mais freqüentemente utilizadas para avaliar a capacidade fagocítica dos leucócitos são aquelas que utilizam como critério o número de células que realizam fagocitose e o número de partículas fagocitadas por células, sendo estas determinadas microscopicamente (VERHOEF; WALDVOGEL, 1985). Contudo, este procedimento pode gerar falhas por ser tedioso e consumir muito tempo. Assim, técnicas que avaliam a fagocitose por citometria de fluxo trouxeram muitas vantagens; nestas, é possível discriminar as populações celulares com maior velocidade aliando-se este fato a uma necessidade menor de células para os estudos.

Métodos de citometria de fluxo têm sido amplamente utilizados para estudar as atividades fagocíticas de macrófagos e de neutrófilos em humanos (BASOE et al., 1983a,b; ROTHE; VALET, 1990) e em animais (SAAD; HAGELTORN, 1985; JOHANNISSON et al., 1995; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2003) utilizando-se de esferas de látex fluorescentes ou bactérias marcadas com FITC ou PI, fluorocromos que emitem respectivamente uma fluorescência verde ou uma vermelha. Além disto,

a citometria de fluxo também permite a verificação da diferenciação e da proporção de células que fagocitaram, por exemplo, bactérias ou leveduras fluorescentes (JOHANNINSSON et al., 1995).

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

Por outro lado, e muito importante, por meio de citometria de fluxo, o *burst* oxidativo pode ser medido concomitantemente à fagocitose, como é o caso da análise do *burst* oxidativo gerado por estímulos solúveis, por bactérias ou por fungos.

Neste sentido, o *burst* oxidativo expresso na geração de peróxido de hidrogênio por macrófagos e por neutrófilos estimulados pode ser monitorado quantitativamente por citometria de fluxo usando-se como reagente o 2'7' diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), o *Staphylococcus aureus* marcado com iodeto de propídeo (PI), o miristato-acetato de forbol (PMA) e o lipopolissacarídeo (LPS) (HASUI; HIRABAYASHI; KOBAYASHI, 1989; RAIDAL; BAILEY; LOVE, 1998). Keton e Brandt (1965) descreveram originalmente um método fluorométrico para a mensuração do peróxido de hidrogênio em solução aquosa. Este método era baseado na oxidação do DCFH-DA não fluorescente, pelo peróxido de hidrogênio e

pela peroxidase, que o transforma em um composto fluorescente o 2'7' diclorofluorisceína. Sendo polar o composto fluorescente não pode se difundir para fora da célula. Por esta razão, é possível detectar a oxidação do DCFH-DA nos neutrófilos e macrófagos usando-se análises unicelulares pela citometria de fluxo.

Foi demonstrado que a oxidação do DCFH-DA é quantitativamente proporcional à concentração de peróxido de hidrogênio gerado (HIRABAYASHI; TANIUCHI; KOBAYASHI, 1985). Observou-se a formação e a liberação do peróxido de hidrogênio por leucócitos polimorfonucleares estimulados por *S. aureus* e PMA, em taxas estreitamente correlacionadas àquelas associadas com a fagocitose (ROOT et al., 1975; HASUI; HIRABAYASHI; KOBAYASHI, 1989).

A vantagem de utilizar o DCFH que emite uma fluorescência verde quando combinado com o peróxido de hidrogênio é que a capacidade de fagocitose realizada por macrófagos e neutrófilos pode ser avaliada conjuntamente, pois a bactéria é marcada com iodeto de propídeo que emite uma fluorescência vermelha.

Esta metodologia, ainda, permite a discriminação entre eventos oxidativos intra e extracelulares, sendo que os dados obtidos independem do número absoluto de células o que não é possível de se fazer utilizando-se a técnica de quimiluminescência (ROTHER; VALET, 1990), técnica esta muito utilizada para quantificar radicais de oxigênio produzidos por leucócitos.

A citometria de fluxo tem sido utilizada para a análise de expressão de antígenos de superfície de leucócitos circulantes, bem como, para linfócitos do lavado bronco-alveolar de eqüinos (McGORUM; DIXON; HALLIWELL, 1993). Mais

recentemente empregou-se a análise do *burst* oxidativo dos leucócitos de eqüinos por citometria de fluxo para verificar os efeitos do exercício físico em neutrófilos circulantes e em macrófagos alveolares desta espécie animal (ADAMSON; SLOCOMBE, 1995). Em nossos laboratórios, a técnica de citometria de fluxo foi utilizada para avaliar o *burst* oxidativo de macrófagos *peritoneais* e neutrófilos circulantes de eqüinos tratados *in vivo* com midazolam (MASSOCO; PALERMONETO, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar, por meio de citometria de fluxo, os efeitos de benzodiazepínicos sobre a atividade de neutrófilos de ratos.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar *ex vivo* e por citometria de fluxo, o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* de neutrófilos, após o tratamento agudo com diazepam (10mg/kg) e medido 1 hora após a administração do fármaco.

Avaliar *ex vivo* e por citometria de fluxo, a fagocitose de *Staphylococcus aureus* realizada por neutrófilos, após o tratamento agudo com diazepam (10mg/kg) e medido 1 hora após a administração do fármaco.

Avaliar *ex vivo* e por citometria de fluxo, o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* de neutrófilos, após o tratamento prolongado (21 dias) com diazepam (10mg/kg) e medido 1 hora após a última administração do fármaco.

Avaliar *ex vivo* e por citometria de fluxo, a fagocitose de *Staphylococcus aureus* realizada por neutrófilos, após o tratamento prolongado (21 dias) com diazepam (10mg/kg) e medido 1 hora após a última administração do fármaco.

Avaliar *ex vivo* e por citometria de fluxo, o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* de neutrófilos, após tratamento agudo com clonazepam (10 e 1 mg/kg) 1 hora após a administração do fármaco.

Avaliar *ex vivo* e por citometria de fluxo, a fagocitose de *Staphylococcus aureus* realizada por neutrófilos, após o tratamento agudo com clonazepam (10 e 1 mg/kg) e medido 1 hora após a administração do fármaco.

Avaliar *in vitro* e por citometria de fluxo, os efeitos do diazepam, do RO 5-4864, do clonazepam e do PK 11195 sobre o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* realizado por neutrófilos.

Avaliar *in vitro* e por citometria de fluxo, os efeitos do diazepam, do RO 5-4864, do clonazepam e do PK 11195 sobre a fagocitose de *Staphylococcus aureus* realizada por neutrófilos.

Avaliar *in vitro* e por citometria de fluxo, os efeitos do diazepam, do RO 5-4864 e do clonazepam sobre o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* realizado por neutrófilos pré-incubados com PK 11195.

Avaliar *in vitro* e por citometria de fluxo, os efeitos do diazepam, do RO 5-4864 e do clonazepam sobre a fagocitose de *Staphylococcus aureus* realizada por neutrófilos pré-incubados com PK 11195.

Avaliar *in vitro* e por citometria de fluxo, os efeitos do diazepam e do RO 5-4864 sobre o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *S. aureus* de neutrófilos pré-incubados com *L*-verapamil.

Avaliar *in vitro* e por citometria de fluxo, os efeitos do diazepam e do RO 5-4864 sobre a fagocitose de *Staphylococcus aureus* realizada por neutrófilos pré-incubados com L-verapamil.

Avaliar os níveis séricos de corticosterona de ratos 1 hora após o tratamento agudo com diazepam (10 mg/kg) e 1 hora após a última administração do tratamento prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg).

Avaliar os níveis séricos de corticosterona de ratos 1 hora após o tratamento agudo com clonazepam (10 e 1 mg/kg).

Identificar receptores benzodiazepínicos periféricos na membrana de leucócitos circulantes de ratos por meio de imunistoquímica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos adultos, da linhagem Wistar, pesando entre 200 e 300g, provenientes de proles obtidas no Biotério do Departamento de Patologia (Disciplina de Farmacologia Aplicada e Toxicologia) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Estes animais foram utilizados seguindo as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, as quais estão de acordo com as normas do Comitê de Ética da FMVZ-USP.

Antes do início dos experimentos, os animais foram alojados, por um período de 5 dias, em caixas de polipropileno (medindo 41 x 34 x 16 cm) em grupos de 4 para adaptação às condições do biotério experimental. Estas caixas foram devidamente acondicionadas em salas cuja temperatura ambiente e umidade (24 a 26°C e 65 a 70%, respectivamente) eram controladas por meio de aparelhos de ar condicionado, ventilação e sistema de exaustão; a iluminação fornecida era artificial, obedecendo a um ciclo de claro-escuro de 12 horas, com início da fase clara às 7:00 horas. Após o período de adaptação, foram realizados os tratamentos dos animais e, posteriormente, procedeu-se a realização dos experimentos. Água e comida foram fornecidas “*ad libitum*” aos animais durante todo o procedimento experimental.

4.2 Drogas e reagentes

4.2.1 Drogas

- *Clonazepam (Rhenochen[®])* - Agonista de receptores benzodiazepínicos centrais;
- *Diazepam (Cristália do Brasil[®])* - Agonista de receptores benzodiazepínicos centrais e periféricos;
- *PK 11195 (Sigma[®])* - Antagonista de receptores benzodiazepínicos periféricos;
- *RO 5-4864 (Sigma[®])* - Agonista de receptores benzodiazepínicos periféricos;
- *L-verapamil (Royton[®])* - Bloqueador de canais de cálcio;

4.2.2 Reagentes

- *Anticorpo primário Anti-PBR¹* - Anticorpo primário utilizado na técnica de imunoistoquímica para marcação de PBR na membrana de neutrófilos;
- *Cepa de Staphylococcus aureus ATCC 25923 (DIFCO[®])* - Bactéria marcada com Iodeto de Propídeo utilizada para avaliar a atividade fagocítica realizada por neutrófilos;
- *Diacetato 2',7' Diclorofluorisceína - (DCFH –DA) (Molecular Probes[®])* - Reagente utilizado na técnica de citometria de fluxo, responsável pela emissão de fluorescência verde das amostras, captada pelo citômetro;
- *Diaminobenzidina (DAB) (SIGMA[®])* - Reagente utilizado para a revelação da marcação positiva ou negativa na técnica de imunoistoquímica;

¹ Anticorpo doado pelo Prof. Dr. Vassilios Papadopoulos; Department of Cell Biology. Georgetown University Medical Center. 3970 Reservoir Road, NW, Washington, D.C. 20007.

- *EDTA (Sigma®)* - Reagente utilizado na técnica de fagocitose, na concentração de 3mM, com o objetivo de interromper a reação após o período de incubação das amostras;
- *Heparina (Liquemine® - Roche)* - Medicamento utilizado para evitar a coagulação das amostras de sangue após a coleta;
- *Iodeto de Propídeo (PI) (Sigma®)* - Reagente utilizado na técnica de citometria de fluxo, responsável pela emissão de fluorescência vermelha das amostras captadas pelo citômetro;
- *Kit de corticosterona Coat-a-Count (DPC®)*: Kit específico para dosagens de corticosterona de ratos por meio de radioimunoensaio;
- *Kit Duet (DAKO®)* - Kit contendo o anticorpo secundário anti-coelho e anti-camundongo e também o complexo streptoavidina/biotina utilizado na revelação da técnica de imunoistoquímica;
- *LPS - cepa 055:B5 (Sigma®)* – Reagente utilizado também com a finalidade de ativar o *burst* oxidativo das células;
- *Miristato-acetato de forbol - (PMA) (Calbiochem®)* - Reagente utilizado como estímulo para desencadear o *burst* oxidativo das células;
- *NaCl 0,2%, e 1,6%* - Soluções utilizadas com o objetivo de romper as hemácias presentes nas amostras;
- *NaCl 0,85%* - Solução utilizada na técnica de conjugação do *Staphylococcus aureus*;
- *NaCl 0,9% c/ Tween 5%* - Solução utilizada para diluir o clonazepam.
- *PBS (Phosphate-buffered saline, pH = 7,2 - 7,4)* - Solução utilizada nas técnicas de *burst* oxidativo e fagocitose;

- *PBS glicosado* - Solução utilizada na técnica de conjugação do *Staphylococcus aureus*;
- *Propilenoglicol (Nuclear®)* - Solvente utilizado para a diluição do diazepam;
- *Solução de Ringer (Aster®)* - Solução utilizada para a diluição do propilenoglicol;

4.3 Procedimentos experimentais

4.3.1 Administração do Diazepam

O diazepam foi administrado aos animais de forma aguda e prolongada (21 dias), na dose de 10mg/kg. Escolheu-se a dose de 10mg de diazepam, por ser ela capaz de produzir alterações nas respostas imune/inflamatória de ratos (LAZZARINI; MALUCELLI; PALERMO-NETO, 2001; 2003). Optou-se por tratar os animais por 21 dias para verificar um possível desenvolvimento de tolerância aos efeitos do diazepam em neutrófilos, por ter sido este fato relatado em nossos laboratórios após este esquema de tratamento para o modelo do edema de pata induzido pela carragenina em ratos (LAZZARINI; MALUCELLI; PALERMO-NETO, 2001; 2003).

Com o objetivo de reduzir possíveis alterações decorrentes de variações biológicas ritmicas nos parâmetros fisiológicos dos animais, os tratamentos com diazepam foram realizados sempre no período da manhã, entre 08:00 e 9:00 horas.

4.3.2 Reagentes e Estímulos para a verificação do Burst Oxidativo

4.3.2.1 Preparo das Soluções:

- **PBS** - (Phosphate-buffered saline, pH= 7,2-7,4) - Solução estoque 10x concentrada:

- Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O (Merck [®])	42,96g
- NaH ₂ PO ₄ . 1 H ₂ O (Nuclear [®])	3,6g
- NaCl (Labsynth [®])	82,0g
- H ₂ O destilada qsp	1000 ml

- **PBS 1x:**

No momento do uso, diluiu-se 100ml da solução estoque 10x concentrada e completou-se com H₂O destilada para um volume de 1000 ml.

- **PBS glicosado:**

- PBS 10x	100ml;
- glicose	0,9g
- gelatina	1g
- H ₂ O destilada qsp	1000 ml

- **Solução Salina 0,2%, 0,85%, 0,9% e 1,6%:**

Pesou-se 2g, 8,5g, 9g e 16g respectivamente de NaCl e completou-se cada solução com 1000 ml de H₂O destilada.

4.3.2.2 Preparo dos Reagentes:

• DCFH-DA 25mM – Solução Estoque

Diluiu-se 28,35mg de DCFH-DA em 2 ml de etanol. Esta solução foi acondicionada em frasco âmbar para protegê-la da luz, sendo mantida em freezer a -20°C .

• Solução de DCFH –DA

No momento do uso, diluiu-se a solução estoque em PBS 1x de modo que o volume final desta solução estivesse de acordo com o número de animais, isto é, que fosse suficiente para contemplar todas as amostras do experimento.

Apenas para ilustrar e facilitar a compreensão podemos citar alguns exemplos desta diluição:

- 100 μl DCFH-DA (solução estoque) + 8,2ml de PBS - para 13 animais;
- 50 μl DCFH-DA (solução estoque) + 4,1ml de PBS - para 6 animais;

E assim por diante...

• Solução de EDTA 3mM

Para o preparo desta solução, 3ml da solução estoque de EDTA (1mol/l) foram diluídos em 997 ml de PBS. Esta solução foi mantida em geladeira.

4.3.2.3 Preparo dos Estímulos:

- **Solução de PMA**

A solução de PMA foi preparada utilizando-se de 1 µl da solução estoque de PMA (100 ng/100 µl) e completando-se o volume com 999 µl de PBS. Este volume, ou seja, 1ml, é suficiente para a realização da técnica de *burst* apenas para um total de 10 animais.

- **Solução de LPS**

O preparo da solução de LPS foi realizado exatamente da mesma forma que a solução de PMA. Importante informar que a solução estoque de LPS também continha a mesma concentração da solução estoque de PMA, isto é, 100ng/100 µl.

- **Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 – SAPI**

Antes de esta bactéria ser utilizada para a realização da técnica do *Burst* e da Fagocitose, foi necessário conjugá-la com o iodeto de propídio (PI), de forma tal a permitir que a bactéria emitisse uma fluorescência vermelha possibilitando, assim, sua leitura no citômetro.

O protocolo de conjugação da bactéria foi aquele proposto por HASUI (1989), que consiste do seguinte procedimento:

- Cultivar bactérias viáveis em ágar sangue por 48 horas;
- Colocar as colônias de bactérias em tubos de ensaio estéreis, em um fluxo laminar próprio para bactérias;

- Ressuspendê-las em NaCl 0,85% e centrifugá-las por 10 minutos a 2500 rpm;
- “Matar” as bactérias a 60°C por 30 minutos;
- Lavar 3x com NaCl 0,85% e após cada lavada, centrifugar por 10 minutos a 2500 rpm;
- Ajustar a concentração das bactérias de modo que sua leitura no espectrofotômetro (Uv/Visível) a uma absorbância de 620 nm tenha um valor entre 2.4 a 2.7. Estes valores, nesta absorbância, são aqueles em que as bactérias, em suspensão, apresentam uma turbidez que corresponde ao n° 8 da escala de Mc. Farland. Para a leitura no citômetro é necessário que as bactérias estejam nestas concentrações.
- Preparar uma solução de iodeto de propídio a 5%;
- Centrifugar nas mesmas condições, desprezar o sobrenadante e adicionar 25 µl da solução iodeto de propídio a 5%;
- Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos, no escuro;
- Lavar a bactéria marcada mais 3x com NaCl 0,85% e centrifugar novamente (3x) por 10 minutos a 2500 rpm;
- Ressuspender a bactéria em 5 ml de PBS glicosado (livre de Ca^{++} e Mg^{++});
- “Aliquotar” em eppendorfs de 2ml, proteger da luz e congelar à -80°C;
- Descongelar imediatamente antes do uso.

Importante informar que para evitar contaminações, após as bactérias serem mortas, todo o procedimento acima citado, foi realizado em um fluxo laminar e todas as soluções utilizadas estavam estéreis.

4.3.3 Avaliação do Burst Oxidativo e da Fagocitose de Neutrófilos por Cítometria de Fluxo:

Neste trabalho, o preparo das amostras, foi realizado de acordo com HASUI et al. (1989), da seguinte maneira:

Após o sacrifício dos animais, o sangue foi coletado; uma bateria de 6 tubos foi então montada e numerada de “A” até “F” por animal (Ex: para 8 animais, foram necessários 48 tubos) , sendo que cada tubo, de acordo com a sua letra, recebeu uma substância diferente, obedecendo-se sempre a uma mesma ordem como mostra a Figura 2a.

Figura 2a – Representação esquemática da sequência de reagentes utilizados na técnica de *burst* e fagocitose onde: Tubo A = PBS; Tubo B = DCFH; Tubo C = SAPI; Tubo D = DCFH+SAPI; Tubo E = DCFH+PMA; Tubo F = DCFH+LPS.

Desta forma, todos os tubos de “A” a “F” receberam alíquotas, que correspondem a 2×10^5 cel. /100_µl de sangue.

Os tubos com as letras “B”, “D”, “E” e “F” receberam 200 µl da solução de DCFH-DA 3mM cada.

Todos os tubos de letra “C” e “D” receberam 100 µl da solução de SAPI (100ng).

Os tubos de letra “E” e “F” receberam 100 µl de PMA (100ng) e 100 µl de LPS (100ng), respectivamente.

Como as amostras deveriam ter um volume final de 1100 µl, todos os tubos foram completados com PBS 1x. Sendo assim, todos os tubos “A” receberam 1000 µl de PBS, os tubos “B” 800 µl, os “C”, 900 µl e finalmente os tubos “D”, “E” e “F” receberam 700 µl.

Todas as soluções, reagentes e estímulos acima citados foram preparados conforme descrito no item 4.3.2.

Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria sob agitação a 37°C por 30 minutos.

Depois da incubação, foram adicionados 2ml de EDTA 3mM para interromper a reação sendo os tubos centrifugados posteriormente a 1200 rpm por 10 minutos.

Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante; as células foram ressuspensas por agitação manual, realizando-se a seguir a lise hipotônica das amostras com soluções de NaCl a 0,2% e 1,6%. Primeiramente, foi colocado em cada tubo 2ml de NaCl 0,2% durante 20 segundos. Imediatamente após este

período, colocou-se mais 2ml de NaCl 1,6% para tornar a solução isotônica novamente.

Em seguida, os tubos foram centrifugados novamente, sendo desprezados os sobrenadantes obtidos. Foi, então, realizada uma nova lise hipotônica (pela segunda vez), seguindo-se todo o procedimento citado acima. Após a segunda lise, os tubos foram centrifugados pela última vez, sendo os sobrenadantes desprezados; as células resultantes foram ressuspensas em 1ml de EDTA gelado.

Após todo este procedimento, procedeu-se à leitura das amostras no citômetro de fluxo sendo que os tubos “A”, “C” e “D” foram utilizados para a avaliação da Fagocitose, enquanto que os tubos “B”, “E” e “F” foram utilizados na avaliação do *Burst* Oxidativo.

Cada amostra passou pelo citômetro apenas 1 vez, e de cada uma, foram adquiridos 10.000 eventos (células). Os valores referentes ao *Burst* oxidativo das amostras foram avaliados por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pela população de neutrófilos. Este valor, ou seja, a média geométrica (geo mean) é dada pelo aparelho e foi esta unidade utilizada para se avaliar a intensidade de fluorescência das células.

Com relação à atividade fagocítica, verificou-se a porcentagem de fagocitose, ou seja, o número de neutrófilos que fagocitaram o *S. aureus* marcado com PI e, conseqüentemente, fluorescentes, dividido pelo número total destas células multiplicadas por 100.

Foi avaliada, também, a intensidade de fagocitose (quantidade de bactérias fagocitadas). Os valores da intensidade de fagocitose também foram registrados por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pelos neutrófilos.

4.3.4 O Citômetro de Fluxo

Foi utilizado um citômetro de fluxo (FACScalibur Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA, USA) acoplado a um computador Macintosh (G4) da Apple. De cada amostra foram adquiridos 10.000 eventos e os dados coletados foram analisados pelo software Cell Quest Pró (Becton Dickinson Immunocytometry Systems).

Em linhas gerais, populações celulares conduzidas através de um sistema fluídico contínuo, foram interceptadas por uma fonte luminosa a laser, gerada pela excitação de um laser de argônio (488 nm de excitação). A transmissão ou a refração da luz pelas células, foram captadas por meio de quatro detectores: Forward Scatter (FSC) que é sensível à dispersão frontal da luz; Side Scatter (SSC) que é sensível à dispersão lateral da luz, bem como dois detectores fluorescentes (FL1 e FL2). Os detectores (FSC e SSC) foram ajustados para acomodar populações heterogêneas de células presentes nas amostras. Para a avaliação celular, foi empregada uma tensão de 100-200 V para o FSC, com o objetivo de remover pequenas partículas incluindo-se aqui, bactérias livres e restos celulares. Populações celulares discretas foram reconhecidas com base nos parâmetros FSC/SSC e registradas eletronicamente (FACScan, Becton Dickinson Immunocytometry Systems) permitindo, assim, a análise das células ao Microscópio Óptico de Luz.

Dados de fluorescência foram colhidos em escala logarítmica. A fluorescência do DCFH foi medida em 530 ± 30 nm (detector FL1); e a fluorescência do *S. aureus* marcado com o Iodeto de Propídio, foi medida em 585 ± 42 nm (detector FL2).

Figura 2b – Citômetro de fluxo modelo FACScalibur da Becton Dickinson acoplado a um computador Macintosh (G4) da Apple utilizado neste trabalho

4.3.5 Dosagem dos níveis séricos de Corticosterona

- *Coleta de sangue para obtenção do soro*

Após a coleta, o sangue dos animais dos grupos experimentais e controles foi centrifugado sob refrigeração (2.000 rpm/30 minutos em temperatura ambiente) para obtenção do soro. Este, foi armazenado em eppendorfs de polietileno em freezer a -80°C até o momento da realização das dosagens hormonais. Os animais dos grupos experimentais e controles foram sacrificados de forma intercalada entre 9:00 e 11:00

horas da manhã de forma tal a evitar influências de variações circadianas nos níveis séricos de corticosterona.

- *Dosagem da corticosterona*

As amostras de soro dos animais foram retiradas do freezer e mantidas à temperatura ambiente ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) para o descongelamento. As dosagens para quantificação de corticosterona foram realizadas por radioimunoensaio em fase sólida utilizando-se o kit comercial Coat-a-Count (DPC[®]) específico para corticosterona de ratos.

Nesta técnica de radioimunoensaio, há competição da corticosterona do rato marcada com [I^{125}] (iodo radioativo) e do hormônio contido na amostra (soro) pelos sítios de anticorpos fixados à parede do tubo de ensaio (“fase sólida”). Foi pipetado dentro de cada tubo de ensaio um volume de 50 μl de cada amostra de soro dos animais dos grupos controles e experimentais. Após a adição de 1ml da corticosterona marcada com [I^{125}], estes tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 2 horas para atingirem um equilíbrio. A seguir, o conteúdo dos tubos foi desprezado para a leitura da radioatividade remanescente desta reação, a qual foi feita no Contador Automático de Radiação Gama (Packard[®]). Os resultados finais das contagens por minuto (cpm) foram expressos em ng/ml.

- *Curva padrão*

Para a obtenção de uma curva padrão, foram utilizados calibradores-padrões (50 μl) com concentrações previamente conhecidas de corticosterona, quais sejam: 0 - 20 - 50 - 100 - 200 - 500 - 1.000 - 2.000 ng/ml, no ensaio realizado.

- *Soro controle*

Foi utilizado um soro controle (50 µl) com concentração de 200 ng/ml de corticosterona no início, no meio e no final do ensaio.

Como já dito, os animais foram manuseados a cada 2 dias, a fim de facilitar o manejo e evitar ao máximo, a ocorrência de possíveis situações estressantes durante a fase experimental.

Todos os ensaios para dosagem de corticosterona foram realizados no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal (VRA), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - FMVZ/USP.

4.3.6 Imunoistoquímica

Foi realizada a técnica de imunoistoquímica a fim de verificar a expressão de PBR nas membranas de leucócitos circulantes de ratos.

Uma amostra de sangue dos animais (aproximadamente 500µl) foi ressuspensa em 1ml de PBS e centrifugada a 1200rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, as células foram ressuspensas por agitação manual, e a seguir, realizou-se a lise hipotônica das amostras com soluções de NaCl a 0,2% e 1,6% como já descrito no item 4.3.4.

Em seguida, foram feitos esfregaços em lâminas com os leucócitos da amostra e estas células foram fixadas em acetona (p. a.) gelada por 30 minutos.

Após a fixação, procedeu-se a inibição da peroxidase endógena através da incubação das lâminas em solução de metanol e água destilada (1:2) com peróxido de hidrogênio a 1%, durante 45 minutos em ambiente protegido da luz.

O próximo passo foi realizar 3 lavagens com PBS contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA). Depois foi feito o bloqueio dos sítios inespecíficos com soro de cabra diluído 1:100 durante 20 minutos. Os excessos de soro de cabra foram removidos com PBS.

Em seguida, foi feita a incubação das lâminas com o anticorpo primário anti-PBR na diluição 1:500. A incubação foi realizada em câmara úmida por 12 horas (*“overnight”*), a uma temperatura de 4°C. Após a incubação as lâminas foram novamente lavadas com PBS e, em seguida, foi feita a incubação com o anticorpo secundário (Kit Duet[®]) por 30 minutos em temperatura ambiente. Após este período, as lâminas foram lavadas com PBS mais uma vez e sendo, em seguida, incubadas com uma solução de estreptoavidina/biotina por mais 30 minutos em temperatura ambiente. Após, lavou-se novamente as lâminas com PBS por mais 2 vezes.

A etapa final desta técnica consistiu na revelação das lâminas o que foi feita com uma solução de diaminobenzidina com peróxido de hidrogênio, ambos na concentração de 0,03%. Durante a revelação, cujo tempo variou de 3 a 5 minutos, as lâminas foram acondicionadas em um ambiente com pouca luminosidade. Para interromper a reação, as lâminas foram lavadas com água destilada.

Por fim, realizou-se a contra-coloração das lâminas. Esta contra-coloração foi realizada pingando-se 3 gotas de hematoxilina de Harris sobre as lâminas por um

período de 30 segundos. Após este tempo, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas com solução crescente de álcool e xilol sendo as lamínulas coladas com bálsamo do Canadá.

4.3.7 Documentação fotográfica

As lâminas obtidas através da imunoistoquímica foram observadas utilizando-se um microscópio óptico Olympus BX 50 equipado com uma microcâmera que captava as imagens e as enviava para um computador. Em seguida, as imagens foram analisadas pelo software de análise de imagens Image Pró Plus.

4.4 Análise Estatística

Os dados experimentais obtidos neste trabalho foram transformados em porcentagem, em relação àqueles dos respectivos grupos controle (cujas médias aritméticas foram consideradas iguais a 100%).

Em todas as análises realizadas, procedeu-se inicialmente ao teste de Bartlett (JOHNSON; LEONE, 1974), para verificação da existência ou não de homocedasticidade entre as variâncias.

Como os dados eram todos paramétricos foi utilizado, em seqüência, o teste “t” de Student, para comparação entre dados de dois grupos, (*software Graphpad INSTAT*, versão 2.01; 1990-1993) para verificação de possíveis diferenças entre eles.

Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas para verificação de possíveis diferenças existentes entre os diferentes tratamentos com BDZ quando comparados entre si.

O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, a probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada como capaz de revelar a existência de diferenças estatisticamente significantes entre os dados dos diferentes grupos.

Os resultados foram expressos nas figuras como % das médias $\pm$ desvios padrões. As tabelas mostram os valores obtidos expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

5.1 Experimento 1 - Avaliar ex vivo e por citometria de fluxo, o burst oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos, após o tratamento agudo com diazepam (10 mg/kg) e medido 1 hora após a administração do fármaco

Foram utilizados 16 animais divididos ao acaso em 2 grupos (controle e experimental) de 8 animais cada. Os animais do grupo experimental receberam por via i.p. uma única dose de diazepam (10 mg/kg), enquanto que os animais do grupo controle receberam, da mesma forma, 1ml/kg de uma solução de propilenoglicol à 40% (PPG 40%) correspondente ao veículo do diazepam.

As amostras de sangue foram coletadas 1 hora após a administração do diazepam e/ou veículo e procedeu-se à determinação do *burst* oxidativo e da fagocitose, ambos realizados por neutrófilos e avaliados por citometria de fluxo conforme a técnica descrita no item 4.3.3.

Resultados

Estão representados nas próximas figuras citogramas ilustrativos dos dados referentes a SSC e FSC de leucócitos de sangue de ratos e histogramas que ilustram a fluorescência destas células frente aos diferentes estímulos utilizados. Citogramas e histogramas como estes foram utilizados para análise individual das populações celulares. Estas populações celulares foram previamente separadas pelo método de *sorting* mecânico, realizado pelo FACSCALIBUR, coradas pelo

método de Giemsa e identificação ao microscópio óptico. Foi observada uma pureza de no mínimo 98% em cada população celular. Todo o procedimento de separação por *sorting* e a identificação das diferentes populações celulares foi realizado e padronizado em nossos laboratórios por Massoco e Palermo-Neto (2003). Desta forma, os citogramas observados nas figuras 3a à 7a correspondem ao *burst* oxidativo e à fagocitose das populações celulares frente aos diferentes estímulos utilizados, ou seja, DCFH, PMA, LPS e *S.aureus*, respectivamente. As figuras 3b à 7b correspondem apenas aos histogramas de fluorescência das populações de neutrófilos utilizadas neste trabalho obtidas também frente aos diferentes estímulos utilizados, ou seja, DCFH, PMA, LPS e *S.aureus* respectivamente. A figura 7b especificamente ilustra os histogramas relacionados à análise da fagocitose (% e intensidade). Desta forma, a figura 7b-1 representa o histograma do controle negativo que são apenas os neutrófilos em PBS e como pode ser verificado na abscissa não existem células emitindo fluorescência acima de 10^1 que é o limite empregado pela técnica de citometria de fluxo (M1). Já na figura 7b-2 pode se observar, empregando-se o mesmo limite (M1), que a porcentagem de neutrófilos que realizaram fagocitose foi calculada a partir de 10^1 , ou seja toda a fluorescência observada acima de 10^1 corresponde aos neutrófilos que realizaram fagocitose. Na figura 7b-3 está representada a intensidade de fluorescência emitida pelos neutrófilos que fagocitaram a *S. aureus*.

As populações de leucócitos sanguíneos observados no citômetro foram padronizadas da seguinte maneira: região R1= linfócitos; região R2= monócitos; região R3 = neutrófilos.

Figura 3a – Citograma de leucócitos circulantes de ratos incubados com o DCFH

R1=linfócitos; R2=monócitos; R3=neutrófilos

Figura 3b – Histograma de neutrófilos incubados com o DCFH

Na figura 4a pode-se verificar que apenas após a estimulação com PMA ocorre o aparecimento de duas populações de neutrófilos, uma menos e outra mais responsiva, representadas pelas regiões R3 e R4, respectivamente. A região mais responsiva ao PMA, ou seja, a região R4, caracteriza-se por células que apresentam uma capacidade muito maior de realizar o *burst* oxidativo, em relação àquelas da região R3; devido a este fato, estas células foram chamadas de neutrófilos ativados.

Figura 4a – Citograma de leucócitos circulantes de ratos incubados com o PMA

R1=linfócitos; R2=monócitos; R3=neutrófilos;
R4=neutrófilos ativados

Figura 4b – Histograma de neutrófilos incubados com o PMA

- (1) Neutrófilos
- (2) Neutrófilos ativados

Figura 5a – Citograma de leucócitos circulantes de ratos incubados com o LPS

R1=linfócitos; R2=monócitos; R3=neutrófilos;

Figura 5b – Histograma de neutrófilos incubados com o LPS

Figura 6a – Citograma de leucócitos circulantes de ratos incubados com o *S. aureus*

R1=linfócitos; R2=monócitos; R3=neutrófilos;

Figura 6b – Histograma de neutrófilos incubados com o *S. aureus*

Figura 7a – Citograma de neutrófilos circulantes de ratos incubados com o *S. aureus* realizando fagocitose

R3=neutrófilos

Figura 7b – Histograma de neutrófilos incubados com *S. aureus* realizando fagocitose
 (1) Histograma de células controle incubadas apenas com PBS.
 (2) Histograma da % de neutrófilos incubados com *S. aureus* realizando fagocitose em relação as células controle.

Figura 7b – (3) Histograma da intensidade de fagocitose de *S. aureus* pelos neutrófilos

Importante informar que estes citogramas e histogramas têm por objetivo apenas ilustrar o que foi visto por meio do citômetro durante as análises, ou seja, as

populações celulares distintas, suas diferentes respostas e consequentemente suas diferentes intensidades de fluorescência frente aos diferentes estímulos. Estas figuras, como têm caráter apenas ilustrativo, estarão representadas apenas neste primeiro experimento, mas é importante que se saiba que todos os dados colhidos foram obtidos a partir de análises feitas desta forma pelo citômetro de fluxo.

A figura 8 ilustra a % da intensidade de fluorescência decorrente do *burst* oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e *S.aureus* 1 hora após a administração de diazepam e/ou veículo avaliados por citometria de fluxo.

Verificou-se que o tratamento agudo com diazepam (10 mg/kg) foi capaz de aumentar ($p<0,05$) o *burst* oxidativo dos neutrófilos e dos neutrófilos ativados induzido pelo PMA em relação aos animais do grupo controle. O *burst* oxidativo dos neutrófilos também aumentou significativamente quando induzido pelo LPS ($p<0,05$) e pela *S.aureus* ($p<0,01$). Com relação ao *burst* oxidativo espontâneo, não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos.

Figura 8 – Efeitos do tratamento agudo com diazepam (10 mg/kg) sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e *S. aureus*

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em relação aos animais do grupo controle.

A % de fagocitose e a % de intensidade de fagocitose da *S. aureus* estão ilustradas na figura 9.

Observou-se que o tratamento agudo com diazepam (10 mg/kg) produziu um aumento significativo ($p < 0,01$) na % de fagocitose da *S. aureus* conjugada com PI

em relação aos animais do grupo controle, ou seja, o tratamento com diazepam citado acima, produziu um aumento na % de neutrófilos que estão fazendo fagocitose, em relação ao número total de neutrófilos do *gate*. Observou-se também um aumento significativo ($p<0,01$) na % da intensidade de fagocitose em relação aos animais do grupo controle, isto é, quanto maior a quantidade de bactérias conjugadas com PI que o neutrófilo fagocitar, maior foi a sua fluorescência, pois a mesma está sendo emitida pela bactéria que foi fagocitada.

Figura 9 – Efeitos do tratamento agudo com diazepam (10 mg/kg) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos
 ** $p<0,01$ em relação aos animais do grupo controle.

Uma vez que as figuras ilustram os valores percentuais de variação de média em relação aos grupos controle, optou-se por mostrar os dados que as originaram na forma de tabelas, desta forma a tabela 1 mostra os resultados do presente experimento referentes aos efeitos do tratamento agudo com diazepam (10 mg/kg) sobre o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos.

Tabela 1 – Efeitos do tratamento agudo com diazepam (10 mg/kg) sobre o *burst* oxidativo e a fagocitose de neutrófilos – São Paulo - 2003

Condição	Controle ⁽¹⁾	Diazepam (10 mg/kg)
DCFH	21,71 $\pm$ 8,97	22,62 $\pm$ 6,71
PMA	144,21 $\pm$ 25,88	180,47 $\pm$ 40,51 *
PMA (neutrófilos ativados)	210,59 $\pm$ 50,72	280,55 $\pm$ 65,65 *
LPS	18,60 $\pm$ 5,18	27,12 $\pm$ 6,12 *
<i>Burst</i> induzido pela <i>S. aureus</i>	61,52 $\pm$ 18,47	191,56 $\pm$ 55,88 **
% de fagocitose	80,52 $\pm$ 3,99	93,31 $\pm$ 3,81 **
Intensidade de fagocitose	19,09 $\pm$ 6,12	48,90 $\pm$ 11,29 **

(1) animais tratados com o veículo do diazepam (solução de PPG 40%).

Os valores representam a intensidade média de fluorescência (média $\pm$ desvio padrão) correspondente ao *gate* da população de neutrófilos circulantes.

*p<0,05 e **p<0,01 em relação as células do grupo controle.

5.2 Experimento 2 - Avaliar ex vivo e por citometria de fluxo, o burst oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos, após o tratamento prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg) e medido 1 hora após a última administração do fármaco

Foram utilizados 16 animais divididos ao acaso em 2 grupos (controle e experimental) de 8 animais cada. Os animais do grupo experimental foram tratados com diazepam (10 mg/kg) via i.p. por 21 dias, enquanto que os animais do grupo controle receberam, da mesma forma, 1ml/kg de uma solução de propilenoglicol à 40% (PPG 40%) correspondente ao veículo do diazepam.

Foi avaliado o peso corporal dos animais dos grupos controle e experimental, com o objetivo de se verificar se o tratamento prolongado com diazepam (10 mg/kg) produziria alguma alteração significativa neste parâmetro.

Uma hora após a última administração do diazepam e/ou veículo, as amostras de sangue foram coletadas e procedeu-se à determinação do *burst* oxidativo e da fagocitose, ambos realizados por neutrófilos e avaliados por citometria de fluxo conforme a técnica descrita no item 4.3.3.

Resultados

A figura 10 ilustra o peso corporal dos animais após o tratamento prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg) e/ou veículo. Pode se verificar que, não ocorreram diferenças significantes deste parâmetro entre os animais dos dois grupos, após o tratamento prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg) e/ou veículo.

Figura 10 – Peso corporal de ratos após o tratamento prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg)

A figura 11 ilustra a % da intensidade de fluorescência decorrente do *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *S.aureus* de neutrófilos após o

tratamento prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg) e medido 1 hora após a última administração do fármaco e/ou veículo avaliados por citometria de fluxo.

Verificou-se que o tratamento prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg) foi capaz de aumentar o *burst* oxidativo de neutrófilos e de neutrófilos ativados ($p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente) induzido pelo PMA em relação aos animais do grupo controle. O *burst* oxidativo dos neutrófilos também aumentou significativamente quando induzido pelo LPS e pela *S.aureus* ($p < 0,05$). Com relação ao *burst* oxidativo espontâneo, não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos.

Figura 11 – Efeitos do tratamento prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg) sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e *S. aureus*
 * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em relação aos animais do grupo controle.

A figura 12 ilustra a % de fagocitose e a % de intensidade de fagocitose da *S. aureus* após o tratamento prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg).

Observou-se que o tratamento prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg) produziu uma redução ($p<0,01$) na % de fagocitose e na % de intensidade de fagocitose da *S. aureus* em relação aos animais do grupo controle.

Figura 12 – Efeitos do tratamento prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos
 ** $p<0,01$ em relação aos animais do grupo controle.

A tabela 2 mostra os resultados relativos aos efeitos do tratamento prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg) sobre o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos.

Tabela 2 – Efeitos do tratamento prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg) sobre o *burst* oxidativo e a fagocitose de neutrófilos – São Paulo - 2003

Condição	Controle ⁽¹⁾	Diazepam (10 mg/kg)
DCFH	31,11 $\pm$ 12,51	34,44 $\pm$ 9,31
PMA	197,14 $\pm$ 46,37	229,58 $\pm$ 37,45 *
PMA (neutrófilos ativados)	321,93 $\pm$ 120,95	511,54 $\pm$ 64,34 **
LPS	30,81 $\pm$ 15,46	49,97 $\pm$ 17,27 *
<i>Burst</i> induzido pela <i>S. aureus</i>	52,99 $\pm$ 22,71	86,70 $\pm$ 27,41 *
% de fagocitose	52,96 $\pm$ 8,42	29,02 $\pm$ 9,99 **
Intensidade de fagocitose	28,57 $\pm$ 3,60	21,71 $\pm$ 2,21 **

(1) animais tratados com o veículo do diazepam (solução de PPG 40%).

Os valores representam a intensidade média de fluorescência (média $\pm$ desvio padrão) correspondente ao *gate* da população de neutrófilos circulantes.

*p<0,05 e **p<0,01 em relação as células do grupo controle.

5.3 Experimento 3 - Avaliar ex vivo e por citometria de fluxo, o burst oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos, após tratamento agudo com clonazepam (10mg/kg) e medido 1 hora após a administração do fármaco

Foram utilizados 16 animais divididos ao acaso em 2 grupos (controle e experimental) de 8 animais cada. Os animais do grupo experimental foram tratados com uma única dose de clonazepam (10 mg/kg) via i.p., enquanto que os animais do grupo controle receberam, da mesma forma, 1ml/kg de uma solução salina com tween à 5% correspondente ao veículo do clonazepam.

As amostras de sangue foram coletadas 1 hora após a administração do clonazepam e/ou do veículo e procedeu-se à determinação do *burst* oxidativo e da

fagocitose, ambos realizados por neutrófilos e avaliados por citometria de fluxo conforme a técnica descrita no item 4.3.3.

Resultados

A figura 13 ilustra a % da intensidade de fluorescência decorrente do *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *S. aureus* 1 hora após a administração do clonazepam (10 mg/kg) e/ou do veículo e avaliados por citometria de fluxo.

Verificou-se que o tratamento agudo com clonazepam (10 mg/kg) foi capaz de diminuir ($p<0,01$) o *burst* oxidativo dos neutrófilos e dos neutrófilos ativados induzido pelo PMA em relação aos animais do grupo controle. O *burst* oxidativo dos neutrófilos também diminuiu significativamente ($p<0,01$) quando induzido pela *S. aureus* em relação aos animais do grupo controle. Não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos com relação ao *burst* oxidativo espontâneo e induzido pelo LPS.

Figura 13 – Efeitos do tratamento agudo com clonazepam (10 mg/kg) sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e *S. aureus*
 ** $p < 0,01$ em relação aos animais do grupo controle.

A figura 14 ilustra a % de fagocitose e a % de intensidade de fagocitose da *S. aureus* após o tratamento agudo com clonazepam (10mg/kg).

Neste experimento, não se observou a ocorrência de diferenças significantes entre os grupos, tanto com relação à % de fagocitose, quanto à % da intensidade de fagocitose, realizada pelos neutrófilos.

Figura 14 – Efeitos do tratamento agudo com clonazepam (10 mg/kg) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos

Os resultados referentes aos efeitos do tratamento agudo com clonazepam (10mg/Kg) sobre o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos estão expressos na tabela 3.

Tabela 3 – Efeitos do tratamento agudo com clonazepam (10 mg/kg) sobre o *burst* oxidativo e a fagocitose de neutrófilos – São Paulo – 2003

Condição	Controle ⁽¹⁾	Clonazepam (10 mg/kg)
DCFH	16,75 $\pm$ 6,08	12,58 $\pm$ 4,98
PMA	154,70 $\pm$ 23,76	78,94 $\pm$ 13,89 **
PMA (neutrófilos ativados)	299,44 $\pm$ 61,14	196,55 $\pm$ 25,37 **
LPS	18,11 $\pm$ 5,83	17,56 $\pm$ 4,80
<i>Burst</i> induzido pela <i>S. aureus</i>	86,65 $\pm$ 21,28	57,63 $\pm$ 10,72 **
% de fagocitose	72,69 $\pm$ 7,82	70,17 $\pm$ 5,39
Intensidade de fagocitose	39,66 $\pm$ 3,56	38,81 $\pm$ 5,40

(1) animais tratados com o veículo do clonazepam (solução de NaCl 0,9% com tween a 5%)
Os valores representam a intensidade média de fluorescência (média $\pm$ desvio padrão) correspondente ao *gate* da população de neutrófilos circulantes.

**p<0,01 em relação as células do grupo controle.

5.4 Experimento 4 - Avaliar ex vivo e por citometria de fluxo, o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos, após tratamento agudo com clonazepam (1mg/kg) e medido 1 hora após a administração do fármaco

Foram utilizados 16 animais divididos ao acaso em 2 grupos (controle e experimental) de 8 animais cada. Os animais do grupo experimental foram tratados com uma única dose de clonazepam (1 mg/kg) via i.p., enquanto que os animais do grupo controle receberam, da mesma forma, 1ml/kg de uma solução salina com tween à 5% correspondente ao veículo do clonazepam.

As amostras de sangue foram coletadas 1 hora após a administração do clonazepam e/ou veículo e procedeu-se à determinação do *burst* oxidativo e da

fagocitose, ambos realizados por neutrófilos e avaliados por citometria de fluxo conforme a técnica descrita no item 4.3.4.

Resultados

A figura 15 ilustra a % da intensidade de fluorescência decorrente do *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *S.aureus* 1 hora após a administração do clonazepam (1 mg/kg) e/ou veículo avaliados por citometria de fluxo.

Verificou-se que o tratamento agudo com clonazepam (1 mg/kg) aumentou tanto o *burst* oxidativo dos neutrófilos e dos neutrófilos ativados induzido pelo PMA quanto o *burst* oxidativo induzido pelo LPS e pela *S. aureus* ($p<0,01$) em relação aos animais do grupo controle. Com relação ao *burst* oxidativo espontâneo, não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos.

Figura 15 – Efeitos do tratamento agudo com clonazepam (1 mg/kg) sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e *S. aureus*
 **p<0,01 em relação aos animais do grupo controle.

A figura 16 ilustra a % de fagocitose e a % de intensidade de fagocitose da *S.aureus* após o tratamento agudo com clonazepam (1mg/kg).

Não foram verificadas, neste experimento, diferenças significantes entre os grupos, tanto com relação à % de fagocitose, quanto com relação à % da intensidade de fagocitose, realizada pelos neutrófilos.

Figura 16 – Efeitos do tratamento agudo com clonazepam (10 mg/kg) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos

Os resultados referentes aos efeitos do tratamento agudo com clonazepam (1mg/Kg) sobre o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos estão expressos na tabela 4.

Tabela 4 – Efeitos do tratamento agudo com clonazepam (1 mg/kg) sobre o *burst* oxidativo e a fagocitose de neutrófilos – São Paulo – 2003

Condição	Controle ⁽¹⁾	Clonazepam (1 mg/kg)
DCFH	19,44 $\pm$ 3,36	22,55 $\pm$ 9,66
PMA	44,03 $\pm$ 9,73	140,30 $\pm$ 42,93 **
PMA (neutrófilos ativados)	91,00 $\pm$ 17,30	176,43 $\pm$ 55,71 **
LPS	17,72 $\pm$ 6,20	36,73 $\pm$ 8,01 **
<i>Burst</i> induzido pela <i>S. aureus</i>	38,05 $\pm$ 5,29	98,13 $\pm$ 29,10 **
% de fagocitose	93,12 $\pm$ 2,20	90,01 $\pm$ 5,11
Intensidade de fagocitose	53,74 $\pm$ 3,99	55,56 $\pm$ 12,55

(1) animais tratados com o veículo do clonazepam (solução de NaCl 0,9% com tween a 5%)
Os valores representam a intensidade média de fluorêscencia (média $\pm$ desvio padrão) correspondente ao *gate* da população de neutrófilos circulantes.

**p<0,01 em relação as células do grupo controle.

5.5 Experimento 5 – Avaliar por citometria de fluxo, o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos, após o tratamento in vitro com diazepam na concentração de 100nM

Foram utilizados 12 animais escolhidos ao acaso e sem nenhum tipo de tratamento sendo, de cada um, coletados aproximadamente 1,5 ml de sangue. Todas as amostras de sangue foram acondicionadas em um mesmo tubo onde foi feito, conseqüentemente, um “pool” de células.

Alíquotas de 100 μ l deste “pool” celular foram acondicionadas nos tubos do citômetro. Em seguida foi realizada, em sextuplicata, a incubação do diazepam na concentração de 100nM por um período de 10 minutos. Alíquotas de células que corresponderam ao grupo controle foram incubadas, também em sextuplicata e pelo

mesmo período, com 100nM de uma solução de PPG 40% correspondente ao veículo do diazepam.

Após a incubação do diazepam e do veículo, procedeu-se a determinação do *burst* oxidativo e da fagocitose, realizados por neutrófilos e avaliados por citometria de fluxo conforme a técnica descrita no item 4.3.3.

Resultados

A figura 17 ilustra a % da intensidade de fluorescência decorrente do *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *S.aureus* de neutrófilos, após o tratamento *in vitro* com diazepam e/ou do veículo (100nM), avaliados por citometria de fluxo.

Verificou-se que o diazepam (100 nM) *in vitro* aumentou ($p<0,01$) o *burst* oxidativo dos neutrófilos e dos neutrófilos ativados induzido pelo PMA em relação às células do grupo controle. Com relação ao *burst* oxidativo induzido pelo LPS e pela *S. aureus*, também foi observado um aumento significativo ($p<0,05$) em relação às células do grupo controle. O *burst* oxidativo espontâneo não apresentou diferenças significantes entre os grupos.

Figura 17 – Efeitos do tratamento *in vitro* com diazepam (100 nM) sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e *S. aureus*

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ em relação aos animais do grupo controle.

A figura 18 ilustra a % de fagocitose e a % da intensidade de fagocitose da *S. aureus* após o tratamento *in vitro* com diazepam (100 nM).

Diferenças entre os grupos foram verificadas apenas na % da intensidade de fagocitose, onde o diazepam (100 nM) *in vitro* produziu um aumento significativo ($p < 0,01$). Com relação à % de fagocitose, não ocorreram diferenças significantes entre os grupos.

Figura 18 – Efeitos do tratamento *in vitro* com diazepam (100 nM) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos

Os resultados referentes aos efeitos do tratamento *in vitro* com diazepam (100 nM) sobre o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos estão expressos na tabela 5.

Tabela 5 – Efeitos do tratamento *in vitro* com diazepam na concentração de 100 nM sobre o *burst* oxidativo e a fagocitose de neutrófilos – São Paulo – 2003

Condição	Controle ⁽¹⁾	Diazepam (100 nM)
DCFH	9,79 $\pm$ 2,87	9,88 $\pm$ 2,60
PMA	36,61 $\pm$ 2,05	46,71 $\pm$ 5,05 **
PMA (neutrófilos ativados)	78,92 $\pm$ 13,09	118,95 $\pm$ 15,58 **
LPS	9,72 $\pm$ 2,19	12,85 $\pm$ 1,34 *
<i>Burst</i> induzido pela <i>S. aureus</i>	22,27 $\pm$ 1,83	26,44 $\pm$ 3,65 *
% de fagocitose	87,37 $\pm$ 1,12	86,71 $\pm$ 4,26
Intensidade de fagocitose	46,18 $\pm$ 4,66	53,20 $\pm$ 2,70 **

(1) células do grupo controle receberam solução de PPG 40% na concentração de 100 nM. Os valores representam a intensidade média de fluorescência (média $\pm$ desvio padrão) correspondente ao *gate* da população de neutrófilos circulantes.

*p<0,05 e **p<0,01 em relação as células do grupo controle.

5.6 Experimento 6 – Avaliar por citometria de fluxo, o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos, após o tratamento *in vitro* com RO 5-4864 na concentração de 100nM

Foram utilizados 12 animais escolhidos ao acaso e sem nenhum tipo tratamento sendo, de cada um, coletados aproximadamente 1,5 ml de sangue. Todas as amostras de sangue foram acondicionadas em um mesmo tubo onde foi feito, conseqüentemente, um “pool” de células.

Alíquotas de 100 μ l deste “pool” celular foram acondicionadas nos tubos do citômetro. Em seguida foi realizada, em sextuplicata, a incubação do RO 5-4864 na concentração de 100nM por um período de 10 minutos. Alíquotas de células que corresponderam ao grupo controle foram incubadas, também em sextuplicata e pelo

mesmo período, com 100nM de uma solução de etanol correspondente ao veículo do RO 5-4864.

Após a incubação do RO 5-4864 e do veículo, procedeu-se a determinação do *burst* oxidativo e da fagocitose, realizados por neutrófilos e avaliados por citometria de fluxo conforme a técnica descrita no item 4.3.3.

Resultados

A figura 19 ilustra a % da intensidade de fluorescência decorrente do *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *S.aureus* de neutrófilos, após o tratamento *in vitro* com RO 5-4864 e/ou veículo (100nM), avaliados por citometria de fluxo.

Verificou-se que o RO 5-4864 (100 nM) *in vitro* aumentou ($p<0,05$) o *burst* oxidativo dos neutrófilos e dos neutrófilos ativados induzido pelo PMA em relação às células do grupo controle. Com relação ao *burst* oxidativo induzido pelo LPS e pela *S. aureus*, também foi observado um aumento significativo ($p<0,05$) em relação às células do grupo controle. O *burst* oxidativo espontâneo não apresentou diferenças significantes entre os grupos.

Figura 19 – Efeitos do tratamento *in vitro* com RO 5-4864 (100 nM) sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e *S. aureus*
 * $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle.

A figura 20 ilustra a % de fagocitose e a % da intensidade de fagocitose da *S. aureus* após o tratamento *in vitro* com RO 5-4864 (100 nM).

Diferenças entre os grupos foram verificadas apenas na % da intensidade de fagocitose, onde o RO 5-4864 (100 nM) *in vitro* produziu um aumento significativo ($p < 0,05$). Com relação à % de fagocitose, não ocorreram diferenças significantes entre os grupos.

Figura 20 – Efeitos do tratamento *in vitro* com RO 5-4864 (100 nM) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos

Os resultados referentes aos efeitos do tratamento *in vitro* com RO 5-4864 (100 nM) sobre o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos estão expressos na tabela 6.

Tabela 6 – Efeitos do tratamento *in vitro* com RO 5-4864 na concentração de 100 nM sobre o *burst* oxidativo e a fagocitose de neutrófilos – São Paulo – 2003

Condição	Controle ⁽¹⁾	RO 5-4864 (100 nM)
DCFH	23,13 $\pm$ 5,70	23,75 $\pm$ 3,01
PMA	59,98 $\pm$ 4,58	73,45 $\pm$ 10,91 *
PMA (neutrófilos ativados)	110,76 $\pm$ 21,68	152,51 $\pm$ 24,53 *
LPS	20,94 $\pm$ 3,79	26,36 $\pm$ 2,71 *
<i>Burst</i> induzido pela <i>S. aureus</i>	66,64 $\pm$ 13,61	87,43 $\pm$ 11,90 *
% de fagocitose	88,20 $\pm$ 2,74	89,44 $\pm$ 2,20
Intensidade de fagocitose	39,65 $\pm$ 3,44	46,65 $\pm$ 4,05 *

(1) células do grupo controle receberam solução de etanol na concentração de 100 nM. Os valores representam a intensidade média de fluorescência (média $\pm$ desvio padrão) correspondente ao *gate* da população de neutrófilos circulantes.
*p<0,05 em relação as células do grupo controle.

5.7 Experimento 7 – Avaliar por citometria de fluxo, o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos, após o tratamento *in vitro* com clonazepam na concentração de 100nM

Foram utilizados 12 animais escolhidos ao acaso e sem nenhum tipo tratamento sendo, de cada um, coletados aproximadamente 1,5 ml de sangue. Todas as amostras de sangue foram acondicionadas em um mesmo tubo onde foi feito, conseqüentemente, um “pool” de células.

Alíquotas de 100 μ l deste “pool” celular foram acondicionadas nos tubos do citômetro. Em seguida foi realizada, em sextuplicata, a incubação do clonazepam na concentração de 100nM por um período de 10 minutos. Alíquotas de células que corresponderam ao grupo controle foram incubadas, também em sextuplicata e pelo

mesmo período, com 100nM de uma solução de NaCl 0,9% com tween à 5% correspondente ao veículo do clonazepam.

Após a incubação do clonazepam e do veículo, procedeu-se a determinação do *burst* oxidativo e da fagocitose, realizados por neutrófilos e avaliados por citometria de fluxo conforme a técnica descrita no item 4.3.3.

Resultados

A figura 21 ilustra a % da intensidade de fluorescência decorrente do *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *S.aureus* de neutrófilos, após o tratamento *in vitro* com clonazepam e/ou veículo (100nM), avaliados por citometria de fluxo.

Verificou-se que o clonazepam (100 nM) *in vitro* aumentou ($p<0,05$) o *burst* oxidativo dos neutrófilos e dos neutrófilos ativados induzido pelo PMA em relação às células do grupo controle. Com relação ao *burst* oxidativo induzido pelo LPS e pela *S. aureus*, também foi observado um aumento significativo ($p<0,05$) em relação às células do grupo controle. O *burst* oxidativo espontâneo não apresentou diferenças significantes entre os grupos.

Figura 21 – Efeitos do tratamento *in vitro* com clonazepam (100 nM) sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e *S. aureus*
 * $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle.

A figura 22 ilustra a % de fagocitose e a % da intensidade de fagocitose da *S. aureus* após o tratamento *in vitro* com clonazepam (100 nM).

Diferenças significantes entre os grupos não foram encontradas na % de fagocitose e na % de intensidade de fagocitose após o tratamento *in vitro* com clonazepam (100 nM).

Figura 22 – Efeitos do tratamento *in vitro* com clonazepam (100 nM) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos

Os resultados referentes aos efeitos do tratamento *in vitro* com clonazepam (100 nM) sobre o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos estão expressos na tabela 7.

Tabela 7 – Efeitos do tratamento *in vitro* com clonazepam na concentração de 100 nM sobre o *burst* oxidativo e a fagocitose de neutrófilos – São Paulo – 2003

Condição	Controle ⁽¹⁾	Clonazepam (100 nM)
DCFH	16,44 $\pm$ 2,30	18,33 $\pm$ 1,55
PMA	70,36 $\pm$ 21,25	125,12 $\pm$ 40,31 *
PMA (neutrófilos ativados)	163,07 $\pm$ 39,11	271,02 $\pm$ 77,84 *
LPS	31,18 $\pm$ 11,23	46,38 $\pm$ 8,35 *
<i>Burst</i> induzido pela <i>S. aureus</i>	45,47 $\pm$ 10,69	73,65 $\pm$ 24,65 *
% de fagocitose	91,33 $\pm$ 1,24	91,06 $\pm$ 4,72
Intensidade de fagocitose	37,75 $\pm$ 1,14	38,39 $\pm$ 2,16

(1) células do grupo controle receberam solução de NaCl 0,9 % com tween à 5% na concentração de 100 nM.

Os valores representam a intensidade média de fluorêscencia (média $\pm$ desvio padrão) correspondente ao *gate* da população de neutrófilos circulantes.

*p<0,05 em relação as células do grupo controle.

5.8 Experimento 8 – Avaliar por citometria de fluxo, o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos, após o tratamento *in vitro* com PK 11195 na concentração de 100nM

Foram utilizados 12 animais escolhidos ao acaso e sem nenhum tipo tratamento sendo, de cada um, coletados aproximadamente 1,5 ml de sangue. Todas as amostras de sangue foram acondicionadas em um mesmo tubo onde foi feito, conseqüentemente, um “pool” de células.

Alíquotas de 100 μ l deste “pool” celular foram acondicionadas nos tubos do citômetro. Em seguida foi realizada, em sextuplicata, a incubação do PK 11195 na concentração de 100nM por um período de 10 minutos. Alíquotas de células que

corresponderam ao grupo controle foram incubadas, também em sextuplicata e pelo mesmo período, com 100nM de uma solução de etanol correspondente ao veículo do PK 11195.

Após a incubação do PK 11195 e do veículo, procedeu-se a determinação do *burst* oxidativo e da fagocitose, realizados por neutrófilos e avaliados por citometria de fluxo conforme a técnica descrita no item 4.3.3.

Resultados

A figura 23 ilustra a % da intensidade de fluorescência decorrente do *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *S.aureus* de neutrófilos, após o tratamento *in vitro* com PK 11195 e/ou veículo (100nM), avaliados por citometria de fluxo.

Verificou-se que o PK 11195 (100 nM) *in vitro* aumentou tanto o *burst* oxidativo dos neutrófilos e dos neutrófilos ativados induzido pelo PMA quanto o *burst* oxidativo induzido pelo LPS e pela *S. aureus* ($p<0,01$) em relação às células do grupo controle. O *burst* oxidativo espontâneo não apresentou diferenças significantes entre os grupos.

Figura 23 – Efeitos do tratamento *in vitro* com PK 11195 (100 nM) sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e *S. aureus*
 * $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle.

A figura 24 ilustra a % de fagocitose e a % de intensidade de fagocitose da *S. aureus* após o tratamento *in vitro* com PK 11195 (100 nM).

Observou-se que o PK 11195 (100 nM) *in vitro* produziu uma redução ($p < 0,05$) na % de fagocitose e na % de intensidade de fagocitose em relação as células do grupo controle.

Figura 24 – Efeitos do tratamento *in vitro* com PK 11195 (100 nM) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos

Os resultados referentes ao tratamento *in vitro* com PK 11195 (100 nM) sobre o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos estão expressos na tabela 8.

Tabela 8 – Efeitos do tratamento *in vitro* com PK 11195 na concentração de 100 nM sobre o *burst* oxidativo e a fagocitose de neutrófilos – São Paulo – 2003

Condição	Controle ⁽¹⁾	PK 11195 (100 nM)
DCFH	23,13 $\pm$ 5,70	21,57 $\pm$ 4,44
PMA	20,11 $\pm$ 1,96	104,84 $\pm$ 15,17 **
PMA (neutrófilos ativados)	63,70 $\pm$ 11,85	124,62 $\pm$ 16,77 **
LPS	5,99 $\pm$ 0,82	21,5 $\pm$ 7,04 **
<i>Burst</i> induzido pela <i>S. aureus</i>	21,63 $\pm$ 2,77	105,97 $\pm$ 44,68 **
% de fagocitose	84,95 $\pm$ 2,02	61,33 $\pm$ 21,29 *
Intensidade de fagocitose	41,34 $\pm$ 2,44	26,50 $\pm$ 14,25 *

(1) células do grupo controle receberam solução de NaCl 0,9 % com tween à 5% na concentração de 100 nM.

Os valores representam a intensidade média de fluorêscencia (média $\pm$ desvio padrão) correspondente ao *gate* da população de neutrófilos circulantes.

*p<0,05 em relação as células do grupo controle.

5.9 Experimento 9 – Avaliar por citometria de fluxo, os efeitos do tratamento *in vitro* com diazepam (100nM) sobre o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos pré tratados com PK 11195, na mesma dose

Foram utilizados 12 animais escolhidos ao acaso e sem nenhum tipo tratamento sendo, de cada um, coletados aproximadamente 1,5 ml de sangue. Todas as amostras de sangue foram acondicionadas em um mesmo tubo onde foi feito, conseqüentemente, um “pool” de células.

Alíquotas de 100 μ l deste “pool” celular foram acondicionadas nos tubos do citômetro. Inicialmente foi feita a pré-incubação do PK 11195 (100 nM) em todas as alíquotas de sangue (controle e experimental) por um período de 10 minutos. Em

seguida foi realizada, em sextuplicata, a incubação do diazepam (100 nM) também por 10 minutos. Alíquotas de células que corresponderam ao grupo controle foram aquelas que receberam, também em sextuplicata e pelo mesmo período, 100nM de uma solução de PPG 40% correspondente ao veículo do diazepam.

Após a incubação do diazepam+PK 11195, procedeu-se a determinação do *burst* oxidativo e da fagocitose, realizados por neutrófilos e avaliados por citometria de fluxo conforme a técnica descrita no item 4.3.3.

Resultados

A figura 25 ilustra os efeitos do tratamento *in vitro* com o diazepam (100nM), sobre a % da intensidade de fluorescência decorrente do *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *S.aureus* de neutrófilos, pré tratados com PK 11195, na mesma dose, e avaliados por citometria de fluxo.

Verificou-se que o tratamento *in vitro* com diazepam+PK 11195 (100 nM cada) aumentou ($p<0,01$) o *burst* oxidativo dos neutrófilos e dos neutrófilos ativados induzido pelo PMA em relação às células do grupo controle. Com relação ao *burst* oxidativo induzido pelo LPS, e pela *S. aureus*, também foi observado um aumento significativo ($p<0,01$ e $p<0,05$ respectivamente) em relação às células do grupo controle. O *burst* oxidativo espontâneo não apresentou diferenças significantes entre os grupos.

Figura 25 – Efeitos do tratamento *in vitro* com diazepam+PK 11195(100 nM) sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e *S. aureus*

**p<0,01 e *p<0,05 em relação aos animais do grupo controle.

A figura 26 ilustra a % de fagocitose e a % de intensidade de fagocitose da *S.aureus* após o tratamento *in vitro* com diazepam+PK 11195 (100 nM).

Verificou-se que este tratamento produziu uma redução significativa na % de fagocitose e também na % de intensidade de fagocitose ($p < 0,01$) em relação às células do grupo controle.

Figura 26 – Efeitos do tratamento *in vitro* com diazepam+PK 11195 (100 nM) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos
 ** $p < 0,01$ em relação aos animais do grupo controle.

Os resultados referentes aos efeitos do tratamento *in vitro* com diazepam+PK 11195 (100 nM) sobre o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos estão expressos na tabela 9.

Tabela 9 – Efeitos do tratamento *in vitro* com diazepam na concentração de 100 nM sobre o *burst* oxidativo e a fagocitose de neutrófilos pré-tratados com PK 11195 na mesma dose – São Paulo – 2003

Condição	Controle ⁽¹⁾	Diazepam + PK (100 nM) (100 nM)
DCFH	22,00 $\pm$ 1,86	22,12 $\pm$ 1,71
PMA	37,09 $\pm$ 2,03	42,93 $\pm$ 3,51 **
PMA (neutrófilos ativados)	85,02 $\pm$ 11,71	115,38 $\pm$ 6,81 **
LPS	10,54 $\pm$ 2,81	25,44 $\pm$ 4,35 **
<i>Burst</i> induzido pela <i>S. aureus</i>	36,20 $\pm$ 4,01	42,97 $\pm$ 6,24 *
% de fagocitose	84,15 $\pm$ 2,19	80,78 $\pm$ 0,71 **
Intensidade de fagocitose	32,83 $\pm$ 4,03	24,52 $\pm$ 0,90 **

(1) células do grupo controle receberam solução de PPG 40% na concentração de 100 nM. Os valores representam a intensidade média de fluorescência (média $\pm$ desvio padrão) correspondente ao *gate* da população de neutrófilos circulantes.

*p<0,05 e **p<0,01 em relação as células do grupo controle.

5.10 Experimento 10 – Avaliar por citometria de fluxo, os efeitos do tratamento *in vitro* com RO 5-4864 (100nM) sobre o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos pré tratados com PK 11195, na mesma dose

Foram utilizados 12 animais escolhidos ao acaso e sem nenhum tipo tratamento sendo, de cada um, coletados aproximadamente 1,5 ml de sangue. Todas as amostras de sangue foram acondicionadas em um mesmo tubo onde foi feito, conseqüentemente, um “pool” de células.

Alíquotas de 100 μ l deste “pool” celular foram acondicionadas nos tubos do citômetro. Inicialmente foi feita a pré-incubação do PK 11195 (100 nM) em todas as alíquotas de sangue (controle e experimental) por um período de 10 minutos. Em

seguida foi realizada, em sextuplicata, a incubação do RO 5-4864 (100 nM) também por 10 minutos. Alíquotas de células que corresponderam ao grupo controle foram aquelas que receberam, também em sextuplicata e pelo mesmo período, 100nM de uma solução de etanol correspondente ao veículo do RO 5-4864.

Após a incubação do RO 5-4864+PK 11195, procedeu-se a determinação do *burst* oxidativo e da fagocitose, realizados por neutrófilos e avaliados por citometria de fluxo conforme a técnica descrita no item 4.3.3.

Resultados

A figura 27 ilustra os efeitos do tratamento *in vitro* com o RO 5-4864 (100nM), sobre a % da intensidade de fluorescência decorrente do *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *S.aureus* de neutrófilos, pré tratados com PK 11195, na mesma dose, e avaliados por citometria de fluxo.

Verificou-se que o tratamento *in vitro* com RO 5-4864+PK 11195 (100 nM cada) aumentou ($p<0,05$) o *burst* oxidativo dos neutrófilos e dos neutrófilos ativados induzido pelo PMA em relação às células do grupo controle. Foi observado também um aumento significativo ($p<0,05$) do *burst* oxidativo induzido pelo LPS. Com relação ao *burst* oxidativo espontâneo e também o *burst* induzido pela *S. aureus*, não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos.

Figura 27 – Efeitos do tratamento *in vitro* com RO 5-4864+PK 11195 (100 nM) sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e *S.aureus*
 * $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle.

A figura 28 ilustra a % de fagocitose e a intensidade de fagocitose da *S.aureus* após o tratamento *in vitro* com RO 5-4864+PK 11195 (100 nM).

Verificou-se que este tratamento produziu uma redução significativa na % de fagocitose e também na % de intensidade de fagocitose ($p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente) em relação às células do grupo controle.

Figura 28 – Efeitos do tratamento *in vitro* com RO 5-4864+PK 11195 (100 nM) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos

** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle.

Os resultados referentes aos efeitos do tratamento *in vitro* com RO 5-4864+PK 11195 (100 nM) sobre o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos estão expressos na tabela 10.

Tabela 10 – Efeitos do tratamento *in vitro* com RO 5-4864 na concentração de 100 nM sobre o *burst* oxidativo e a fagocitose de neutrófilos pré-tratados com PK 11195 na mesma dose – São Paulo – 2003

Condição	Controle ⁽¹⁾	RO+PK (100 nM)
DCFH	21,71 $\pm$ 4,44	19,16 $\pm$ 2,25
PMA	44,86 $\pm$ 6,94	52,98 $\pm$ 3,89 *
PMA (neutrófilos ativados)	112,82 $\pm$ 16,36	138,17 $\pm$ 20,83 *
LPS	21,47 $\pm$ 2,39	30,09 $\pm$ 7,72 *
<i>Burst</i> induzido pela <i>S. aureus</i>	46,11 $\pm$ 6,54	50,40 $\pm$ 10,48
% de fagocitose	86,95 $\pm$ 3,36	81,43 $\pm$ 3,53 *
Intensidade de fagocitose	37,31 $\pm$ 3,21	25,85 $\pm$ 0,76 **

(1) células do grupo controle receberam solução de etanol na concentração de 100 nM. Os valores representam a intensidade média de fluorescência (média $\pm$ desvio padrão) correspondente ao *gate* da população de neutrófilos circulantes.
* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação as células do grupo controle.

5.11 Experimento 11 – Avaliar por citometria de fluxo, os efeitos do tratamento *in vitro* com clonazepam (100nM) sobre o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos pré tratados com PK 11195, na mesma dose

Foram utilizados 12 animais escolhidos ao acaso e sem nenhum tipo tratamento sendo, de cada um, coletados aproximadamente 1,5 ml de sangue. Todas as amostras de sangue foram acondicionadas em um mesmo tubo onde foi feito, conseqüentemente, um “pool” de células.

Alíquotas de 100 μ l deste “pool” celular foram acondicionadas nos tubos do citômetro. Inicialmente foi feita a pré-incubação do PK 11195 (100 nM) em todas as alíquotas de sangue (controle e experimental) por um período de 10 minutos. Em

seguida foi realizada, em sextuplicata, a incubação do clonazepam (100 nM) também por 10 minutos. Alíquotas de células que corresponderam ao grupo controle foram aquelas que receberam, também em sextuplicata e pelo mesmo período, 100nM de uma solução de NaCl 0,9% com tween à 5% correspondente ao veículo do clonazepam.

Após a incubação do clonazepam+PK 11195, procedeu-se a determinação do *burst* oxidativo e da fagocitose, realizados por neutrófilos e avaliados por citometria de fluxo conforme a técnica descrita no item 4.3.3.

Resultados

A figura 29 ilustra os efeitos do tratamento *in vitro* com o clonazepam (100nM), sobre a % da intensidade de fluorescência decorrente do *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *S.aureus* de neutrófilos, pré tratados com PK 11195, na mesma dose, e avaliados por citometria de fluxo.

Verificou-se que o tratamento *in vitro* com clonazepam+PK 11195 (100 nM cada) aumentou o *burst* oxidativo dos neutrófilos ($p<0,05$) e dos neutrófilos ativados ($p<0,01$) induzido pelo PMA em relação às células do grupo controle. Com relação ao *burst* oxidativo espontâneo e também o *burst* oxidativo induzido pelo LPS e pela *S. aureus*, não foram verificadas diferenças significantes entre os grupos.

Figura 29 – Efeitos do tratamento *in vitro* com clonazepam+PK 11195 (100 nM) sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos induzido pelo PMA, LPS e *S.aureus*
 ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle.

A figura 30 ilustra a % de fagocitose e a intensidade de fagocitose da *S.aureus* após o tratamento *in vitro* com clonazepam+PK 11195 (100 nM).

Verificou-se que este tratamento produziu uma redução significativa na % de fagocitose e também na % de intensidade de fagocitose ($p < 0,01$) em relação às células do grupo controle.

Figura 30 – Efeitos do tratamento *in vitro* com clonazepam+PK 11195 (100 nM) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos
 ** $p < 0,01$ em relação aos animais do grupo controle.

Os resultados referentes aos efeitos do tratamento *in vitro* com clonazepam+PK 11195 (100 nM) sobre o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos estão expressos na tabela 11.

Tabela 11 – Efeitos do tratamento *in vitro* com clonazepam na concentração de 100 nM sobre o *burst* oxidativo e a fagocitose de neutrófilos pré-tratados com PK 11195 na mesma dose – São Paulo – 2003

Condição	Controle ⁽¹⁾	Clonazepam + PK (100 nM) (100 nM)
DCFH	23,95 $\pm$ 4,33	24,61 $\pm$ 5,10
PMA	63,52 $\pm$ 14,38	42,97 $\pm$ 6,40 *
PMA (neutrófilos ativados)	117,02 $\pm$ 11,20	77,50 $\pm$ 21,40 **
LPS	36,54 $\pm$ 8,79	38,39 $\pm$ 13,63
<i>Burst</i> induzido pela <i>S. aureus</i>	51,50 $\pm$ 5,51	48,99 $\pm$ 4,78
% de fagocitose	91,83 $\pm$ 1,51	88,49 $\pm$ 1,71 **
Intensidade de fagocitose	36,78 $\pm$ 1,86	27,41 $\pm$ 1,45 **

(1) células do grupo controle receberam solução de NaCl 0,9% com tween à 5% na concentração de 100 nM.

Os valores representam a intensidade média de fluorescência (média $\pm$ desvio padrão) correspondente ao *gate* da população de neutrófilos circulantes.

* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação as células do grupo controle.

5.12 Experimento 12 – Avaliar por citometria de fluxo, os efeitos do tratamento *in vitro* com diazepam (100nM) sobre o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos pré tratados com *L-verapamil*, na mesma dose

Foram utilizados 12 animais escolhidos ao acaso e sem nenhum tipo tratamento sendo, de cada um, coletados aproximadamente 1,5 ml de sangue. Todas as amostras de sangue foram acondicionadas em um mesmo tubo onde foi feito, conseqüentemente, um “pool” de células.

Alíquotas de 100 μ l deste “pool” celular foram acondicionadas nos tubos do citômetro. Inicialmente foi feita a pré-incubação do *L-verapamil* (100 nM) em todas as alíquotas de sangue (controle e experimental) por um período de 2 minutos. Em

seguida foi realizada, em sextuplicata, a incubação do diazepam (100 nM) por um período de 10 minutos. Alíquotas de células que corresponderam ao grupo controle foram aquelas que receberam, também em sextuplicata e por 10 minutos, 100nM de uma solução de PPG 40% correspondente ao veículo do diazepam.

Após a incubação do diazepam+*L*-verapamil, procedeu-se a determinação do *burst* oxidativo e da fagocitose, realizados por neutrófilos e avaliados por citometria de fluxo conforme a técnica descrita no item 4.3.3.

Resultados

A figura 31 ilustra os efeitos do tratamento *in vitro* com o diazepam (100nM), sobre a % da intensidade de fluorescência decorrente do *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *S.aureus* de neutrófilos, pré tratados com *L*-verapamil, na mesma dose, e avaliados por citometria de fluxo.

Não foram verificadas entre os grupos, alterações significantes sobre o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *S.aureus* após o tratamento *in vitro* com diazepam+*L*-verapamil (100 nM cada).

Figura 31 – Efeitos do tratamento *in vitro* com diazepam+L-verapamil (100 nM) sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e *S.aureus*

A figura 32 ilustra a % de fagocitose e a intensidade de fagocitose da *S.aureus* após o tratamento *in vitro* com diazepam+L-verapamil (100 nM).

Verificou-se que este tratamento também não produziu alterações significantes na % de fagocitose e na % de intensidade de fagocitose em relação às células do grupo controle.

Figura 32 – Efeitos do tratamento *in vitro* com diazepam+L-verapamil (100 nM) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos

Os resultados referentes aos efeitos do tratamento *in vitro* com diazepam+L-verapamil (100 nM) sobre o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos estão expressos na tabela 12.

Tabela 12 – Efeitos do tratamento *in vitro* com diazepam na concentração de 100 nM sobre o *burst* oxidativo e a fagocitose de neutrófilos pré-tratados com *L*-verapamil na mesma dose – São Paulo – 2003

Condição	Controle ⁽¹⁾	Diazepam+ <i>L</i> -verapamil (100 nM) (100 nM)
DCFH	15,16 $\pm$ 2,53	12,95 $\pm$ 3,73
PMA	57,08 $\pm$ 6,05	54,70 $\pm$ 13,20
PMA (neutrófilos ativados)	111,65 $\pm$ 24,57	109,86 $\pm$ 24,99
LPS	18,67 $\pm$ 4,81	18,05 $\pm$ 3,86
<i>Burst</i> induzido pela <i>S. aureus</i>	37,65 $\pm$ 5,98	32,86 $\pm$ 7,77
% de fagocitose	83,54 $\pm$ 2,93	81,52 $\pm$ 7,46
Intensidade de fagocitose	28,53 $\pm$ 2,16	28,71 $\pm$ 1,74

(1) células do grupo controle receberam solução de PPG 40% na concentração de 100 nM. Os valores representam a intensidade média de fluorescência (média $\pm$ desvio padrão) correspondente ao *gate* da população de neutrófilos circulantes.

5.13 Experimento 13 – Avaliar por citometria de fluxo, os efeitos do tratamento *in vitro* com RO 5-4864 (100nM) sobre o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos pré tratados com *L*-verapamil, na mesma dose

Foram utilizados 12 animais escolhidos ao acaso e sem nenhum tipo tratamento sendo, de cada um, coletados aproximadamente 1,5 ml de sangue. Todas as amostras de sangue foram acondicionadas em um mesmo tubo onde foi feito, conseqüentemente, um “pool” de células.

Alíquotas de 100 μ l deste “pool” celular foram acondicionadas nos tubos do citômetro. Inicialmente foi feita a pré-incubação do *L*-verapamil (100 nM) em todas as alíquotas de sangue (controle e experimental) por um período de 2 minutos. Em seguida foi realizada, em sextuplicata, a incubação do RO 5-4864 (100 nM) por um

período de 10 minutos. Alíquotas de células que corresponderam ao grupo controle foram aquelas que receberam, também em sextuplicata e por 10 minutos, 100nM de uma solução de etanol correspondente ao veículo do RO 5-4864.

Após a incubação do RO 5-4864+L-verapamil, procedeu-se a determinação do *burst* oxidativo e da fagocitose, realizados por neutrófilos e avaliados por citometria de fluxo conforme a técnica descrita no item 4.3.3.

Resultados

A figura 33 ilustra os efeitos do tratamento *in vitro* com o RO 5-4864 (100nM), sobre a % da intensidade de fluorescência decorrente do *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *S.aureus* de neutrófilos, pré tratados com L-verapamil, na mesma dose, e avaliados por citometria de fluxo.

Verificou-se que o tratamento *in vitro* com RO 5-4864+L-verapamil (100 nM cada) diminuiu ($p<0,01$) o *burst* oxidativo dos neutrófilos e dos neutrófilos ativados induzido pelo PMA em relação às células do grupo controle. Com relação ao *burst* oxidativo espontâneo e também o *burst* oxidativo induzido pelo LPS e pela *S. aureus*, não foram verificadas diferenças significantes entre os grupos.

Figura 33 – Efeitos do tratamento *in vitro* com RO 5-4864+L-verapamil (100 nM) sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos induzido por PMA, LPS e *S.aureus*
 ** $p < 0,01$ em relação aos animais do grupo de controle.

A figura 34 ilustra a % de fagocitose e a intensidade de fagocitose da *S.aureus* após o tratamento *in vitro* com RO 5-4864+L-verapamil (100 nM).

Verificou-se que este tratamento não produziu alterações significantes na % de fagocitose e na % de intensidade de fagocitose em relação às células do grupo controle.

Figura 34 – Efeitos do tratamento *in vitro* com RO 5-4864+L-verapamil (100 nM) sobre a fagocitose (% e intensidade) de neutrófilos

Os resultados referentes aos efeitos do tratamento *in vitro* com RO 5-4864+L-verapamil (100 nM) sobre o *burst* oxidativo espontâneo e induzido por PMA, LPS e *Staphylococcus aureus* e a fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos estão expressos na tabela 13.

Tabela 13 – Efeitos do tratamento *in vitro* com RO 5-4864 na concentração de 100 nM sobre o *burst* oxidativo e a fagocitose de neutrófilos pré-tratados com *L*-verapamil na mesma dose – São Paulo – 2003

Condição	Controle ⁽¹⁾	RO + <i>L</i> -verapamil	
		(100 nM)	(100 nM)
DCFH	14,04 $\pm$ 2,91	14,06 $\pm$ 4,29	
PMA	47,91 $\pm$ 4,84	35,38 $\pm$ 4,11	**
PMA (neutrófilos ativados)	86,77 $\pm$ 16,38	61,34 $\pm$ 10,14	**
LPS	20,63 $\pm$ 7,93	17,41 $\pm$ 6,01	
<i>Burst</i> induzido pela <i>S. aureus</i>	16,45 $\pm$ 2,88	17,53 $\pm$ 3,97	
% de fagocitose	82,68 $\pm$ 5,04	86,30 $\pm$ 1,89	
Intensidade de fagocitose	29,81 $\pm$ 2,57	30,35 $\pm$ 1,03	

(1) células do grupo controle receberam solução de etanol na concentração de 100 nM. Os valores representam a intensidade média de fluorescência (média $\pm$ desvio padrão) correspondente ao *gate* da população de neutrófilos circulantes.
 **p<0,01 em relação as células do grupo controle.

5.14 Experimento 14 - Avaliar os níveis séricos de corticosterona após o tratamento agudo e prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg)

Uma hora após o término dos tratamentos agudo e/ou prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg), as amostras de sangue dos animais dos grupos controle e experimental, dos respectivos tratamentos, foram coletadas e procedeu-se a dosagem dos níveis séricos de corticosterona, conforme o procedimento descrito no item 4.3.6.

Resultados

A figura 35 ilustra e a tabela 14 mostra os níveis séricos de corticosterona após o tratamento agudo e prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg) em ratos.

O tratamento agudo com diazepam produziu um aumento significativo ($p < 0,01$) nos níveis séricos de corticosterona em ratos. Com relação ao tratamento prolongado, verificou-se que o mesmo, não alterou significativamente os níveis séricos deste hormônio.

Figura 35 – Níveis séricos de corticosterona após o tratamento agudo e prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg) em ratos

** $p < 0,01$ em relação aos animais do grupo controle.

Tabela 14 – Níveis séricos de corticosterona após o tratamento agudo e prolongado (21 dias) de diazepam (10 mg/kg) em ratos – São Paulo – 2003

Tratamento	Controle ⁽¹⁾	Diazepam (10 mg/kg)
Agudo	250,12 ±111,32	603,57 ±150,96 **
Prolongado	209,72 ±124,56	287,64 ±68,60

(1) animais tratados com o veículo do diazepam (solução de PPG 40%).

Os valores representam a média ± desvio padrão.

**p<0,01 em relação aos animais do grupo controle.

5.15 Experimento 15 - Avaliar os níveis séricos de corticosterona após o tratamento agudo com clonazepam nas doses de 10 mg/kg e 1 mg/kg

Uma hora após a administração do clonazepam nas doses de 10 mg/kg e/ou 1 mg/kg, as amostras de sangue dos animais dos grupos controle e experimental, dos respectivos tratamentos, foram coletadas e procedeu-se a dosagem dos níveis séricos de corticosterona, conforme o procedimento descrito no item 4.3.6.

Resultados

A figura 36 ilustra e a tabela 15 mostra os níveis séricos de corticosterona após o tratamento agudo com clonazepam nas doses de 10 mg/kg e 1 mg/kg em ratos.

Verificou-se que tratamento agudo com clonazepam, em ambas as doses, produziram um aumento significativo (p<0,01) dos níveis séricos de corticosterona em ratos.

Figura 36 – Níveis séricos de corticosterona após o tratamento agudo com clonazepam nas doses de 10 mg/kg e 1 mg/kg em ratos

Tabela 15 – Níveis séricos de corticosterona após o tratamento agudo com clonazepam nas doses de 10 mg/kg e 1 mg/kg em ratos – São Paulo – 2003

Tratamento	Controle ⁽¹⁾	Experimental
Clonazepam 10 mg/kg	259,32 $\pm$ 124,66	444,54 $\pm$ 123,27 **
Clonazepam 1 mg/kg	224,55 $\pm$ 102,93	403,56 $\pm$ 118,85 **

(1) animais tratados com o veículo do clonazepam (solução de NaCl 0,9% com Tween à 5%).

Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão.

**p<0,01 em relação aos animais do grupo controle.

5.16 Experimento 16 - Identificar receptores benzodiazepínicos periféricos na membrana de leucócitos circulantes de ratos por meio de imunoistoquímica

Para a identificação dos PBR uma amostra de sangue de animais que não foram tratados foi preparada conforme procedimento descrito no item 4.3.7. A técnica de imunoistoquímica foi realizada a partir da incubação com o anticorpo primário anti-PBR e as imagens foram captadas pelo analisador de imagens Image Pro Plus® conforme descrito no item 4.3.8.

Resultados

A figura 37 ilustra a marcação positiva para PBR em leucócitos circulantes de ratos.

Figura 37 – Leucócitos circulantes de ratos incubados com anticorpo anti-PBR.

A, B e C = neutrófilos.

D1 = neutrófilo, D2 = linfócito.

As setas indicam marcação positiva para PBR (objetiva de 100x-imersão).

5.17 Comparação dos efeitos de BDZ sobre o burst oxidativo e a fagocitose de neutrófilos após o tratamento agudo ex vivo com diazepam 10 mg e com clonazepam 10 mg e 1 mg

Com o objetivo de se verificar possíveis diferenças entre os tratamentos *ex vivo* com benzodiazepínicos sobre o *burst* oxidativo e a fagocitose de neutrófilos foi realizada uma análise de variância (ANOVA) das % de médias dos seguintes tratamentos *ex vivo*: diazepam 10 mg agudo e clonazepam 10 e 1 mg agudo.

Resultados

A figura 38 ilustra o *burst* oxidativo referente às % das médias dos diferentes tratamentos *ex vivo* com benzodiazepínicos.

Após a realização da ANOVA verificou-se as seguintes significâncias ($p < 0,05$):

- Um aumento do *burst* oxidativo induzido pelo LPS e *S. aureus* do grupo diazepam 10 mg em relação ao grupo controle;
- Uma redução do *burst* oxidativo induzido por PMA, LPS e *S. aureus* do grupo clonazepam 10 mg em relação ao grupo controle e diazepam 10 mg;
- Um aumento do *burst* oxidativo induzido por PMA, LPS e *S. aureus* do grupo clonazepam 1 mg em relação aos grupos controle, diazepam 10 mg e clonazepam 10 mg.

Comparação dos efeitos de BDZ sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos após os tratamentos agudos *ex vivo* com diazepam 10 mg e clonazepam 10 mg e 1 mg

Figura 38 – Comparação das % de médias dos tratamentos agudos *ex vivo* com benzodiazepínicos sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos

* $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle.

$p < 0,05$ em relação aos animais do grupo diazepam 10 mg.

♦ $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo clonazepam 10 mg.

A figura 39 ilustra a fagocitose referente às % das médias dos diferentes tratamentos *ex vivo* com benzodiazepínicos.

Após a realização da ANOVA verificou-se as seguintes significâncias ($p < 0,05$):

- Um aumento da fagocitose (% e intensidade) do grupo diazepam 10 mg em relação ao grupo controle;
- Uma redução da fagocitose dos grupos clonazepam 10 e 1 mg em relação ao grupo diazepam 10 mg.

Comparação dos efeitos de BDZ sobre a fagocitose de neutrófilos após os tratamentos agudos *ex vivo* com diazepam 10 mg e clonazepam 10 mg e 1 mg

Figura 39 – Comparação das % de médias dos tratamentos agudos *ex vivo* com benzodiazepínicos sobre a fagocitose de neutrófilos

* $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle.

$p < 0,05$ em relação aos animais do grupo diazepam 10 mg.

5.18 Comparação dos efeitos de BDZ sobre o burst oxidativo e a fagocitose de neutrófilos após o tratamento *in vitro* com diazepam, RO 5-4684, clonazepam e PK 11195 (todos na concentração de 100 nM)

Com o objetivo de se verificar possíveis diferenças entre os tratamentos *in vitro* com diazepam, RO 5-4864, clonazepam e PK 11195 na concentração de 100 nM sobre o *burst* oxidativo e a fagocitose de neutrófilos foi realizada uma análise de variância (ANOVA) das % de médias dos tratamentos acima citados.

Resultados

A figura 40 ilustra o *burst* oxidativo referente às % das médias dos tratamentos *in vitro* com diazepam, RO 5-4864, clonazepam e PK 11195 na concentração de 100 nM.

Após a realização da ANOVA verificou-se as seguintes significâncias ($p < 0,05$):

- Um aumento do *burst* oxidativo induzido pelo PMA do grupo clonazepam em relação ao grupo controle;
- Um aumento do *burst* oxidativo induzido pelo PMA dos neutrófilos ativados de todos os grupos em relação ao grupo controle;
- Um aumento do *burst* oxidativo induzido por PMA, LPS e *S. aureus* do grupo PK 11195 em relação aos demais grupos

Comparação dos efeitos do diazepam, do RO 5-4864, do clonazepam e do PK 11195 *in vitro* na conc. de 100 nM sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos.

Figura 40 – Comparação das % de médias do diazepam, do RO 5-4864, do clonazepam e do PK 11195 *in vitro* na concentração de 100 nM sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

$p < 0,05$ em relação ao grupo diazepam.

♦ $p < 0,05$ em relação ao grupo RO 5-4864.

✱ $p < 0,05$ em relação ao grupo clonazepam.

A figura 41 ilustra a fagocitose referente às % das médias dos tratamentos *in vitro* com diazepam, RO 5-4864, clonazepam e PK 11195 na concentração de 100 nM.

Após a realização da ANOVA verificou-se as seguintes significâncias ($p < 0,05$):

- Uma redução da fagocitose (% e intensidade) do grupo PK 11195 em relação a todos os demais grupos.

Comparação dos efeitos do diazepam, do RO 5-4864, do clonazepam e do PK 11195 *in vitro* na conc. de 100 nM sobre a fagocitose neutrófilos.

Figura 41 – Comparação das % de médias do diazepam, do RO 5-4864, do clonazepam e do PK 11195 *in vitro* na concentração de 100 nM sobre a fagocitose de neutrófilos

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

$p < 0,05$ em relação ao grupo diazepam.

♦ $p < 0,05$ em relação ao grupo RO 5-4864.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo clonazepam.

5.19 Comparação dos efeitos do diazepam, do RO 5-4864 e do clonazepam *in vitro* na concentração de 100 nM sobre burst oxidativo e a fagocitose de neutrófilos após o pré-tratamento com PK 11195

Com o objetivo de se verificar possíveis diferenças entre os tratamentos *in vitro* com benzodiazepínicos sobre o *burst* oxidativo e a fagocitose de neutrófilos pré-tratados com PK 11195 foi realizada uma análise de variância (ANOVA) das % de médias dos tratamentos acima citados.

Resultados

A figura 42 ilustra o *burst* oxidativo referente às % das médias dos diferentes tratamentos *in vitro* com benzodiazepínicos após o pré-tratamento com PK 11195.

Após a realização da ANOVA verificou-se as seguintes significâncias ($p < 0,05$):

- Um aumento do *burst* oxidativo induzido pelo PMA (neutrófilos ativados), LPS e *S. aureus* do grupo diazepam+PK 11195 em relação ao grupo controle;
- Um aumento do *burst* oxidativo induzido pelo PMA do grupo RO 5-4864+PK 11195 em relação ao grupo controle;
- Uma redução do *burst* oxidativo induzido pelo LPS do grupo RO 5-4864+PK 11195 em relação ao grupo diazepam+PK 11195;
- Uma redução do *burst* oxidativo induzido pelo PMA do grupo clonazepam+PK 11195 em relação aos demais grupos;
- Uma redução do *burst* oxidativo induzido pelo LPS e *S. aureus* do grupo clonazepam+PK 11195 em relação ao grupo diazepam+PK 11195.

Comparação dos efeitos do diaz., do RO 5-4864 e do clonaz. *in vitro* na conc. de 100 nM sobre o burst oxidativo de neutrófilos pré incubados com PK 11195

Figura 42 – Comparação das % de médias do diazepam, do RO 5-4864 e do clonazepam *in vitro* na concentração de 100 nM sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos pré-incubados com PK 11195

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

$p < 0,05$ em relação ao grupo diazepam+PK.

♦ $p < 0,05$ em relação ao grupo RO+PK.

A figura 43 ilustra a fagocitose referente às % das médias dos diferentes tratamentos *in vitro* com benzodiazepínicos após o pré-tratamento com PK 11195.

Após a realização da ANOVA verificou-se as seguintes significâncias ($p < 0,05$):

- Um redução da fagocitose (% e intensidade) de todos os grupos (diaz.+PK, RO+PK, clonaz.+PK) em relação ao grupo controle.

Comparação dos efeitos do diaz., do RO 5-4864 e do clonaz. *in vitro* na conc. de 100 nM sobre a fagocitose de neutrófilos pré incubados com PK 11195

Figura 43 – Comparação das % de médias do diazepam, do RO 5-4864 e do clonazepam *in vitro* na concentração de 100 nM sobre a fagocitose de neutrófilos pré-tratados com PK 11195
* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.20 Comparação dos efeitos do diazepam e do RO 5-4864 *in vitro* na concentração de 100 nM sobre burst oxidativo e a fagocitose de neutrófilos após o pré-tratamento com L-verapamil

Com o objetivo de se verificar possíveis diferenças entre os tratamentos *in vitro* com o diazepam e o RO 5-4864 sobre o *burst* oxidativo e a fagocitose de neutrófilos pré-tratados com L-verapamil foi realizada uma análise de variância (ANOVA) das % de médias dos tratamentos acima citados.

Resultados

A figura 44 ilustra o *burst* oxidativo referente às % das médias dos tratamentos *in vitro* com diazepam e RO 5-4864 após o pré-tratamento com L-verapamil.

Após a realização da ANOVA verificou-se as seguintes significâncias ($p < 0,05$):

- Uma redução do *burst* oxidativo induzido pelo PMA, do grupo RO+L-verapamil em relação aos grupos controle e diazepam+L-verapamil.

Comparação dos efeitos do diazepam e do RO 5-4864 *in vitro* na conc. de 100 nM sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos pré incubados com Verapamil

Figura 44 – Comparação das % de médias do diazepam e do RO 5-4864 *in vitro* na concentração de 100 nM sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos pré-tratados com L-verapamil

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

$p < 0,05$ em relação ao grupo diazepam+L-verapamil.

A figura 45 ilustra a fagocitose referente às % das médias dos diferentes tratamentos *in vitro* com diazepam e RO 5-4864 após o pré-tratamento com L-verapamil.

Após a realização da ANOVA não foram verificadas diferenças significantes entre os grupos.

Comparação dos efeitos do diazepam e do RO 5-4864 *in vitro* na conc. de 100 nM sobre a fagocitose de neutrófilos pré incubados com Verapamil

Figura 45 – Comparação das % de médias do diazepam e do RO 5-4864 *in vitro* na concentração de 100 nM sobre a fagocitose de neutrófilos pré-tratados com L-verapamil

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostraram que o diazepam administrado agudamente na dose de 10 mg/kg interferiu com a atividade de neutrófilos circulantes de ratos. Mais especificamente observou-se que o diazepam aumentou o *burst* oxidativo e a fagocitose destas células após a administração *ex vivo* e *in vitro*. Por outro lado, o uso prolongado (21 dias) de idêntica dose de diazepam produziu um aumento do *burst* oxidativo de neutrófilos, porém diminuiu quer a porcentagem, quer a intensidade de fagocitose destas células. Observou-se, também, que a administração aguda mas não a prolongada de diazepam aumentou os níveis séricos de corticosterona dos ratos. Estes resultados sugerem um envolvimento direto e/ou indireto dos PBR com a modulação da resposta gerada pelos neutrófilos circulantes dos animais.

Recentes estudos têm mostrado que os BDZ podem exercer efeitos estimulatórios na função de monócitos e neutrófilos de humanos (MARINO et al., 2001; RUFF et al., 1985; SACERDOTE et al., 1999) e em neutrófilos circulantes e macrófagos peritoneais de equinos (MASSOCO; PALERMO-NETO, 2003). No entanto, também foi descrito que o diazepam exerce efeitos inibitórios em neutrófilos humanos (GOLDFARB et al., 1984; LAGHI-PASINI, 1987; FINNERTY et al., 1991) e em macrófagos murinos (MASSOCO et al., 1999; SILVA et al., 1999; RIGHI et al., 1999).

Os resultados obtidos no presente experimento e relativos aos efeitos agudos do diazepam sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos concordam com aqueles que

relataram efeitos estimulatórios para os BDZ sobre a função de células imunes. Em especial, concordam com os dados obtidos por Zavala (1987) que, utilizando diferentes tipos de BDZ em macrófagos murinos observou a ocorrência de um aumento do *burst* oxidativo destas células, quando ativadas com o peptídeo quimiotático o N-formilmetionilleucilfenilalanina, o f-Met-Leu-Phe (fMLP). Concordam também e são reforçados por outros trabalhos que apontam efeitos estimulatórios para os BDZ, na quimiotaxia de monócitos humanos (RUFF et al., 1985) e para o midazolam, um fármaco com ação em receptores BDZ centrais e periféricos, no *burst* oxidativo de neutrófilos circulantes e de macrófagos peritoneais de equinos (MASSOCO et al., 2003).

A principal função dos neutrófilos é fagocitar e destruir bactérias invasoras. Esta destruição bacteriana depende largamente da ativação do *burst* oxidativo caracterizada pela geração de ânions superóxido e de espécies reativas do oxigênio (ERO). A administração aguda *ex vivo* de diazepam aumentou o *burst* oxidativo de neutrófilos induzido pelo PMA, LPS e *S. aureus*. A existência de PBR quer na adrenal, quer na membrana de neutrófilos (FINNERTY et al., 1991; WEIZMAN et al., 1997) sugere assim, como apontado acima, que os efeitos do diazepam sejam decorrência de uma ação nestes receptores.

De fato, a estimulação de PBR presentes em células das glândulas adrenais foi relacionada à produção de glicocorticóides endógenos (PAPADOPOULOS, 1993). Mostrou-se, neste sentido, que a estimulação destes receptores presentes na membrana de mitocôndrias de células de tecidos esteroideogênicos, entre eles, os da adrenal aumenta a produção de esteróides por facilitar a translocação do colesterol de fora para dentro da mitocôndria, onde é transformado em pregnenolona e,

posteriormente, em corticosterona (CAVALLARO et al., 1992). Uma vez que a administração aguda de diazepam (10 mg/kg) aumentou os níveis séricos de corticosterona e, conhecendo-se o papel dos glicocorticóides na modulação da atividade de células envolvidas com a resposta imune inflamatória (WEBSTER et al., 1988), pode-se sugerir o envolvimento deste hormônio com os presentes achados experimentais relacionados ao *burst* oxidativo de neutrófilos após o uso do BDZ. Esta hipótese, contudo, parece-nos improvável. De fato, o uso *in vitro* do diazepam produziu idênticos resultados e, nesta condição, não há qualquer possibilidade do envolvimento da corticosterona com o processo. Por outro lado, concordando com Lazzarini et al. (2003) o uso prolongado de diazepam (21 dias) levou ao desenvolvimento de uma tolerância para os efeitos dos BDZ sobre a produção de corticosterona. De fato, os níveis de corticosterona dos animais tratados prolongadamente (21 dias) com diazepam (10 mg/kg) não diferiu daqueles medidos nos animais do grupo controle. Nestas condições, observou-se em nosso experimento, a manutenção dos efeitos do diazepam sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos e uma redução da fagocitose realizada por estas células. A participação direta dos PBR nesta resposta desponta, assim, como sendo a mais provável explicação para os dados agora obtidos.

Os achados de imunoistoquímica deste trabalho mostraram a presença de PBR na membrana de neutrófilos circulantes de ratos. Concordam, pois, com os de outros autores que já haviam mostrado a existência de sítios ligantes de BDZ em células mononucleares e polimorfonucleares humanas (FERRARESE et al., 1990; ZAVALA et al., 1984) e equinas (MASSOCO et al., 2003). Uma ação direta do diazepam nestes receptores poderia, então, ser possível; uma ação como esta justificaria, os presentes achados experimentais. Esta hipótese encontra apoio e

coincide com aquela sugerida por Zavala (1987) quando da análise dos efeitos de ligantes de PBR sobre o *burst* oxidativo de macrófagos murinos e, também, com aquela proposta por Massoco et al. (2003) quando da avaliação dos efeitos do midazolam sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos circulantes e de macrófagos peritoneais de equinos.

De fato, os resultados obtidos após a administração *in vitro* do RO 5-4864, um agonista de PBR, reforçam esta premissa ao indicar efeitos deste ligante sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos; estes efeitos ocorreram na mesma direção daqueles obtidos após o uso do diazepam. Curiosamente, no entanto, não se observou no presente trabalho ser o PK 11195 capaz de antagonizar os efeitos *in vitro* relatados para o diazepam e para o RO 5-4864. Este achado, causa surpresa uma vez que têm sido frequentemente encontrado na literatura relatos de antagonismo pelo PK 11195 de efeitos de BDZ sobre a atividade de células imunes (FINNERTY et al., 1991; Le FUR et al., 1983). Diferenças metodológicas poderiam justificar a presente discrepância de resultados. Destas duas parecem-nos relevantes: 1 – o tempo decorrido entre a adição do PK e aquele do diazepam e do RO 5-4864; 2 – a concentração do PK 11195 utilizada no presente experimento (100 nM). A primeira hipótese parece-nos improvável. De fato, a afinidade do PK 11195 pelos PBR têm sido descrita como sendo maior do aquela do RO 5-4864 que, por sua vez, é maior do que a do diazepam (BENAVIDES et al., 1983; LENFANT et al., 1985). Haveria, portanto, tempo suficiente para a ligação do PK 11195 aos PBR antes da adição do diazepam e do RO 5-4864. Este fato justifica inclusive a maior magnitude dos efeitos do PK 11195 no *burst* oxidativo em relação aos outros ligantes de PBR. Reforça a segunda hipótese, a observação de que a classificação de ligantes de PBR em agonistas e antagonistas depende da concentração em que estes são usados e,

dentro de algumas condições fisiológicas, também do tipo de tecido ou célula analisada (RAMSEIER et al., 1993; ZAVALA et al., 1987). Neste sentido, vale ressaltar que o PK 11195 de *per se* modificou a atividade dos neutrófilos, o que sugere que na concentração usada e/ou nas células estudadas ele tenha atuado como um agonista e não como um antagonista. Esta sugestão parece viável visto que os efeitos constatados sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos após o uso do PK 11195 foram na mesma direção e, conforme já comentado, maiores que os do diazepam e do RO 5-4864. Finalmente, esta segunda hipótese encontra apoio nos achados de Ramseier et al. (1993) que relataram um efeito agonista para o PK 11195 na atividade de linfócitos murinos analisados *in vitro*.

Têm sido largamente estudados os sinais que desencadeiam o *burst* oxidativo em neutrófilos (HU et al., 1999; THELEN et al., 1993). Sabe-se, assim, que este *burst* oxidativo pode ser iniciado quer pela ligação de agonistas como o fMLP, a anafilatoxina C5a, o fator ativador de plaquetas (PAF) e o leucotrieno B4 (LTB4) aos receptores existentes na membrana celular, quer pela ativação da PKC pelo PMA.

Um aumento do *burst* oxidativo com consequente produção de ERO é uma das características de neutrófilos ativados (YAMAMOTO et al., 2002). Já se relatou um envolvimento dos PBR com o *burst* oxidativo de células imunes humanas (ZAVALA, 1997). Sabe-se ser a produção de ERO dependente da ativação do complexo multimolecular NADPH-oxidase. Neste sentido, já se relatou a existência de um elo de ligação funcional entre os PBR e a ativação da NADPH-oxidase, fato constatado através de experimentos nos quais observou-se ser um anticorpo monoclonal anti-PBR capaz de produzir uma estimulação concentração-dependente tanto do *burst* oxidativo como da resposta de neutrófilos humanos ao fator

quimiotático fMLP (ZAVALA, 1991). Portanto, é possível que o diazepam e os ligantes de PBR (RO 5-4864 e PK 11195), por atuarem nestes receptores presentes na membrana dos neutrófilos, possam ter modificado no presente experimento os mecanismos relacionados ao *burst* oxidativo. De fato, já se mostrou que o diazepam ligando-se aos PBR ativa a fosfolipase-C (PLC) produzindo fosfatidil inositol-3 (IP-3) e diacil glicerol (DAG), que por sua vez, estimulam a fosfoquinase-C (PKC). Esta enzima promove a fosforilação de proteínas específicas denominadas "PHagocyte OXidases" (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, p22^{phox} e gp91^{phox}) que, ao seu turno, estimulam a NADPH-oxidase que transforma O₂ em O₂⁻ produzindo ERO, como H₂O₂ e OH⁻ (BABIOR, 1999).

Por outro lado, a administração aguda do diazepam aumentou a porcentagem e a intensidade de fagocitose de neutrófilos circulantes de ratos. Observamos, também, que a adição de diazepam e de RO 5-4864 na concentração de 100nM, mas não a de PK 11195 (na mesma concentração) produziram um aumento na intensidade de fagocitose das células. Estes dados concordam com aqueles relatados por Marino et al., (2001) para o diazepam em neutrófilos humanos. No entanto, discordam de outros que mostraram uma inibição ou prejuízo da fagocitose após o uso do diazepam (GALDIERO et al., 1995; MASSOCO; PALERMO-NETO, 1999). Mais uma vez, as explicações para estas discrepâncias residem, muito provavelmente, em diferenças de metodologia. De fato, Marino et al. (2001) sugeriram que os efeitos do diazepam sobre a atividade fagocítica de neutrófilos humanos dependeria do tipo de microorganismo a ser fagocitado. Massoco (2003) em sua tese de doutorado sugeriu que os efeitos do midazolam sobre a fagocitose realizada por macrófagos dependeria da ocorrência de opsonização das partículas (zymozam ou *S. aureus*) a serem fagocitadas, isto é, do tipo de receptores (manose,

complemento ou Fc) de membrana aos quais se ligam a estas partículas. Trabalho de Finnerty et al., (1991), neste sentido, já havia sugerido que os efeitos do diazepam sobre a atividade quimiotática de neutrófilos dependiam do estímulo apresentado.

Outra hipótese explicativa para a presente discrepância de resultados estaria relacionada ao tempo de administração do BDZ. De fato, quando usado prolongadamente – 21 dias no presente experimento e 15 dias no experimento de Galdiero et al., (1995) – o diazepam produziu uma diminuição da fagocitose. Juntos, nossos resultados e os de literatura sugerem que a ativação dos PBR desempenham um papel complexo da modulação neutrofílica. De acordo com Marino et al., (2001) uma estimulação primária dos PBR pelo diazepam resultaria em ativação da fagocitose que, entretanto, interferiria com a resposta a um estímulo subsequente.

Esta hipótese é interessante e parece justificar os presentes achados experimentais decorrentes das associações de PK 11195 e diazepam e PK 11195 e RO 5-4864 sobre a fagocitose dos neutrófilos. De fato, o uso do diazepam e do RO 5-4864 isoladamente aumentou a intensidade de fagocitose e não interferiu com a porcentagem de fagocitose; o uso destes ligantes posteriormente ao PK 11195 produziu redução de ambas variáveis. No entanto, vale ressaltar: 1 – o PK 11195 de *per se* além de aumentar o *burst* oxidativo, também produziu diminuição dos índices de fagocitose; 2 – a incubação prévia com PK 11195 não alterou os efeitos do diazepam e do RO 5-4864 sobre o *burst* oxidativo dos neutrófilos. Por outro lado, o uso prolongado do diazepam no presente trabalho não alterou a direção dos

resultados relacionados ao *burst* como o fez para a fagocitose (porcentagem e intensidade).

Os dados disponíveis no presente trabalho não permitem explicações para estas diferenças que só podem ser hipotetizadas. A este respeito, parece interessante lembrar que já foram descritos diferentes subtipos de PBR em linfócitos humanos (BERKOVICH et al., 1993) e em membranas mitocondriais de células imunes (Mc ENERY et al., 1992). O trabalho de Berkovich et al., (1993) mostrou claramente um perfil diferente de afinidade de ligantes endógenos para os PBR. Tomando-se como base localizações diferenciais de subtipos de PBR, um na membrana plasmática e outro na mitocôndria, também já se sugeriu que estes receptores possam desencadear diferentes respostas subcelulares ligadas à ativação de segundos mensageiros intracelulares distintos (BISSERBE et al., 1986; SCHLUMPF et al., 1994; ZAVALA et al., 1990). Assim, não se pode excluir que uma provável existência de subtipos de PBR possa ter contribuído para os efeitos diferenciais agora relatados para a atividade de neutrófilos após o uso do diazepam *ex vivo* (agudo e prolongado) e *in vitro* bem como, também, para os outros ligantes de PBR. Esta hipótese será retomada adiante.

Como discutido acima, dois tipo de segundos mensageiros são gerados quando da ocorrência do *burst* oxidativo de neutrófilos: o IP-3 e o DAG. Mostrou-se que o IP-3 induz a liberação de cálcio (Ca^{2+}) à partir de estoques intracelulares, levando este fato, a um aumento transiente da concentração intracelular de Ca^{2+} livre (PITTET et al., 1992). O DAG, por sua vez, permanece associado à membrana e participa da ativação da PKC (PARAGO; NISHIZUKA, 1990). Esta segunda via resulta em uma ativação da NADPH-oxidase localizada na superfície interna da

membrana plasmática do neutrófilo, não produzindo, ou estando diretamente relacionada à ocorrência de alterações nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} livre (HU et al., 1999).

Neste contexto, duas conclusões primárias têm resultado de experimentos que analisaram o papel do Ca^{2+} intracelular no desenvolvimento do *burst* oxidativo de neutrófilos: 1 – não se detectou o *burst* oxidativo quando os níveis intracelulares de Ca^{2+} livre foram depletados pelo tratamento com quelantes (DEWALD et al., 1988); 2 – observou-se que um incremento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} livre aumenta a magnitude do *burst* oxidativo (KESSELS et al., 1991). Entretanto, o papel do Ca^{2+} no *burst* oxidativo induzido pelo PMA têm sido pouco investigado. Este fato, talvez, tenha levado ao conceito não totalmente correto de que o *burst* oxidativo induzido pelo PMA seja independente do Ca^{2+} (DEWALD et al., 1988). De fato, como o Ca^{2+} intracelular promove o deslocamento da PKC do citoplasma para a membrana plasmática atuando ainda como um co-fator para a ativação da PKC (NISHIZUKA, 1986) é de se esperar que este íon tenha alguns efeitos sobre o *burst* oxidativo induzido pelo PMA. Esta expectativa foi descrita primeiramente por Wimann et al. (1987) e mais recentemente por HU et al. 1999. Estes autores sugeriram e mostraram, efetivamente, que a movimentação da PKC do citosol para a membrana induzida pelo aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , facilitou e tornou mais rápida sua ativação subsequente pelo DAG.

Sabe-se que os PBR modulam a atividade de canais de Ca^{2+} (RAMPE; TRIGGLE, 1986). Sabe-se, também, que os BDZ afetam a função de neutrófilos dependentes de Ca^{2+} , em especial, o *burst* oxidativo e a fagocitose (LAGHI-PASINI, 1987; FINNERTY et al., 1991). Parece, pois, razoável sugerir que as alterações na

atividade de neutrófilos decorrentes do tratamento agudo e prolongado com diazepam possam envolver e depender de mudanças nas concentrações de Ca^{2+} intracelular. De fato, a ativação dos PBR por BDZ administrados agudamente e adicionados *in vitro* aumentou a permeabilidade da membrana plasmática muito provavelmente devido à abertura dos canais de Ca^{2+} com subsequente entrada deste íon do meio extracelular para o meio intracelular facilitando os mecanismos ligados ao *burst* oxidativo e à fagocitose. O uso do *L*-verapamil, um bloqueador de canais de Ca^{2+} - que não possui nenhuma afinidade aos PBR (SAANO et al., 1989) - poderia, pois, trazer subsídios adicionais para a compreensão dos achados do presente experimento após o uso do BDZ.

Nossos resultados mostraram que a incubação prévia de neutrófilos com 100 nM de *L*-verapamil bloqueou todos os efeitos induzidos pelo diazepam. Este mesmo tratamento bloqueou os efeitos do RO 5-4864 sobre a fagocitose e sobre o *burst* oxidativo induzido pelo LPS e pelo *S. aureus*, e modificou, diminuindo, aquele desencadeado pelo PMA. Neste sentido, Marino et al. (2001) sugeriu que o aumento das concentrações intracelulares do diazepam ocorre lentamente e de forma sustentada, enquanto que aquele induzido pelo RO 5-4864 é rápido e transitório. Este fato poderia estar relacionado às diferenças encontradas neste trabalho para o *burst* oxidativo induzido pelo PMA após o uso do diazepam e do RO 5-4864.

Em conjunto, os presentes dados permitem sugerir que as alterações nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} induzidas pela ativação dos PBR sejam consequência de um aumento da permeabilidade da membrana dos neutrófilos produzida pela abertura de canais de Ca^{2+} sensíveis ao *L*-verapamil, com subsequente entrada do Ca^{2+} extracelular. Neste sentido, o uso prolongado do

diazepam pode ter resultado numa alteração deste mecanismo, por induzir modificações na estrutura e/ou no número de PBR presentes na membrana dos neutrófilos.

Sabe-se, neste contexto, que o desenvolvimento de tolerância funcional e de dependência dependem de modificações na atividade do sistema afetado pelo fármaco. Especificamente, mostrou-se que o uso prolongado de um fármaco, ao modificar uma função por longo tempo, leva à adaptações funcionais no sistema afetado, visando a manutenção da homeostasia (MANDELL, 1975; SHARPLESS, 1975; PALERMO-NETO, 1986). Estas adaptações podem resultar de alterações na sensibilidade ou estrutura dos receptores ao fármaco, de modificações do número de receptores e/ou de mudanças à nível de segundos mensageiros intracelulares (PALMER; SCOTT; 1974; PALERMO-NETO, 1986).

Como já comentado, a administração prolongada do diazepam levou ao desenvolvimento de tolerância (TAUPIN et al., 1991; RAMSEIER et al., 1993; ZANOTTI, 1999). De acordo com Garrat et al. (1988) o grau de tolerância desenvolvida aos PBR depende da afinidade do ligante administrado. Segundo este autor este fato é decorrência ou de uma interação irregular dos BDZ com seus receptores ou, alternativamente, da existência de subtipos de receptores. Neste contexto, é possível sugerir que os PBR ligados ao *burst* oxidativo e à fagocitose de neutrófilos sejam diferentes, conforme já sugerido anteriormente nesta discussão. Especificamente, alterações nos PBR ligados à fagocitose, resultariam em um menor aporte de Ca^{2+} extracelular após o uso prolongado do diazepam, fato que diminuiria a fagocitose pelo *S. aureus*. Este fato não ocorreria para os PBR ligados ao *burst* oxidativo.

É relevante comentar, neste momento, que os efeitos acima descritos para a fagocitose após o uso prolongado do diazepam, bem como aqueles já relatados para os níveis séricos de corticosterona, não estão ligados a uma maior metabolização e/ou excreção do fármaco, isto é, devem-se ao desenvolvimento de uma tolerância funcional não repousando em uma explanação farmacocinética. De fato, Lazzarini et al. (2003), mediram os níveis plasmáticos do diazepam uma hora após a única ou à última administração do tratamento prolongado, tendo verificado a inexistência de diferenças estatísticas entre os valores encontrados (Diazepam agudo= $94,9 \pm 4,63$; Diazepam prolongado= $67,0 \pm 21,0$). Desta forma, fica difícil justificar a ocorrência de uma diminuição da fagocitose de neutrófilos pela redução dos níveis plasmáticos de diazepam. Mais que isto, ocorresse esta redução era de se esperar o aparecimento de uma redução da intensidade e/ou da porcentagem de fagocitose após o uso do diazepam e não a reversão de seus efeitos. A este respeito, já se mostrou diminuição do número de receptores BDZ no córtex de camundongos após um tratamento prolongado com diazepam (ZANOTTI et al., 1999). Mostrou-se, também, que um tratamento prolongado com clonazepam aumentou a densidade de PBR na adrenal (WEIZMAN et al., 1997) e, também, que o tratamento por 21 dias com diazepam (5 mg/kg) e RO 5-4864 foi capaz de aumentar o $B_{\max}$ para PBR na adrenal, rins, útero e ovário (WEIZMAN et al., 1997).

Na tentativa de melhor caracterizar o envolvimento dos PBR com os efeitos do diazepam, replicaram-se os experimentos *ex vivo* e *in vitro* relativos ao estudo da atividade de neutrófilos após a administração ou adição do clonazepam. Têm sido frequentemente relatado que o clonazepam possui pequena afinidade por PBR, atuando preferencialmente a nível dos receptores BDZ centrais, isto é, naqueles

acoplados aos receptores GABA-a ionóforos de Cl^- (LENFANT et al., 1985; SYAPIN; SKOLNICK, 1979; BESSLER et al., 1997). Surpreendentemente observamos, no presente trabalho, que o clonazepam produziu efeitos de grande magnitude no *burst* oxidativo de neutrófilos, mas não na fagocitose destas células. Uma vez que o íon Ca^{2+} foi relacionado às ações dos ligantes de PBR, analisados acima, parece-nos relevante abordá-lo também após o uso do clonazepam.

Das duas doses de clonazepam utilizadas (10 e 1 mg/kg) a dose menor aumentou significativamente o *burst* oxidativo induzido por PMA, LPS e *S. aureus* em neutrófilos circulantes de ratos. A dose maior produziu efeitos na direção oposta, porém apenas após o uso do PMA.

Ressalte-se em um primeiro momento que o fato de ter o clonazepam menor afinidade que o diazepam e o RO 5-4864 por PBR (LENFANT, 1985) não exclui, de forma alguma, uma ação deste BDZ nestes receptores (PBR). Ora, uma ação em PBR poderia justificar um aumento do influxo de Ca^{2+} e, conseqüentemente, o aumento do *burst* oxidativo como discutido acima para os outros ligantes de PBR, em especial o diazepam. Neste caso, a hipótese seria válida apenas para a menor dose do clonazepam. Mais que isto, ao constatar que esta menor dose de clonazepam interferiu com o *burst* oxidativo mas não com a fagocitose dos neutrófilos, seria possível, inferir que este fármaco estaria atuando apenas naquele subtipo de PBR, já relatado acima como estando ligado ao *burst* oxidativo dos neutrófilos. Neste caso, haveríamos de concluir que a efetividade do clonazepam em produzir esta ação foi maior que a do próprio diazepam e do RO 5-4864, dois ligantes reconhecidamente descritos como tendo afinidade maior pelo PBR que o clonazepam. Esta conclusão intrigante e inesperada e a constatação, agora obtida,

de que os efeitos *in vitro* do PMA e do clonazepam foram modificados pelo PK 11195, merecem estudos subsequentes, visto que, os presentes achados experimentais não permitem maiores inferências. Reforça esta necessidade de estudos adicionais, a constatação obtida neste trabalho de que o clonazepam nas duas doses empregadas *ex vivo* aumentou os níveis séricos de corticosterona, um efeito também tido como decorrente da ativação dos PBR das mitocôndrias das glândulas adrenais (PAPADOPOULOS, 1993). Efeito este, não ligado aos presentes resultados relativos à atividade de neutrófilos, não era também esperado de um ligante tido como tendo baixa afinidade por PBR. Neste sentido, já foi mostrado que o clonazepam usado prolongadamente produz um aumento no “binding” de PBR presentes na adrenal (WEIZMAN et al., 1997).

Como entender, então, as ações do clonazepam após a administração da maior dose? Alguns trabalhos (SHARIKABAD et al., 2001; COX; MATLIB, 1993; MATLIB et al., 1985) têm mostrado que o clonazepam é capaz de inibir a troca de Sódio/Cálcio ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) em mitocôndrias isoladas do coração de ratos. A inibição desta bomba mitocondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ poderia resultar em alterações na concentração de Ca^{2+} livre no interior da mitocôndria e/ou do citosol. Neste sentido, Sharikabad et al. (2001) mostraram que o clonazepam - por inibir seletivamente a troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial - reduz em 70% a acumulação de Ca^{2+} aumentando, ao mesmo tempo, em 90% aquela do íon Mg^{2+} . Estas alterações iônicas poderiam, assim e de alguma forma, resultar em prejuízo no *burst* oxidativo de neutrófilos após a ativação pelo PMA. Uma vez que o PMA ativa a PKC e que a movimentação desta enzima para a membrana depende dos níveis intracelulares de Ca^{2+} (WIMANN et al., 1987; HU et al., 1999), e sabendo-se que o Ca^{2+} é um co-fator para a ativação da PKC (NISHIZUKA, 1987) e, ainda, lembrando que a presença da PKC na membrana é

relevante para a ativação da NADPH-oxidase após PMA, torna-se atrativa a especulação de que os efeitos da dose maior de clonazepam decorram de modificações neste processo. Neste caso, haveríamos de supor que o clonazepam tenha atuado através de dois mecanismos diferentes: a dose menor ativando principalmente o subtipo de PBR e a dose maior bloqueando mais efetivamente a troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Esta sugestão deve, no entanto, ser encarada com muita cautela visto que, mostrou-se ser o clonazepam capaz de diminuir a atividade do sistema nervoso autônomo simpático (HARVEY et al., 1985) e também que a simpatectomia química com 6-hidroxidopamina (6-OHDA) é capaz de elevar a densidade dos PBR no hipotálamo (BASILE; SKOLNICK, 1988). Juntos estes fatos mostram que a modulação da atividade do sistema nervoso autônomo simpático pelo clonazepam foi de regular a densidade de PBR em tecidos. Alterações em PBR poderiam, então, contribuir também para os resultados agora obtidos após o uso do clonazepam *ex vivo*.

Em seu conjunto, os resultados obtidos no presente trabalho mostram, de forma inequívoca, que os BDZ interferem com a atividade de neutrófilos (*burst* oxidativo e fagocitose); este fato se deve muito provavelmente por modificações nos níveis de Ca^{2+} intracelulares, via ativação de PBR seguida por um aumento da permeabilidade da membrana ao Ca^{2+} , decorrente da abertura de canais de Ca^{2+} sensíveis ao *L*-verapamil.

Uma vez que os BDZ são largamente utilizados na terapêutica, o presente trabalho recomenda cautela quanto ao uso desta classe de medicamentos ao apontar possíveis efeitos colaterais para os mesmos na esfera imunológica. Neste caso, o cuidado quanto ao uso desta medicação deveria ser maior em pacientes

imunodeprimidos. De fato, o uso prolongado do diazepam produziu uma redução da capacidade fagocítica de neutrófilos circulantes de ratos avaliados por citometria de fluxo. Finalmente o presente trabalho reforça a relevância que vem sendo dada nos últimos anos à área de pesquisa em neuroimunomodulação.

7 CONCLUSÕES

- O tratamento agudo *ex vivo* com diazepam na dose de 10 mg/kg aumentou a atividade (*burst* oxidativo e a fagocitose) de neutrófilos circulantes de ratos.
- O tratamento prolongado (21 dias) *ex vivo* com diazepam aumentou o *burst* oxidativo e reduziu a fagocitose realizada por neutrófilos.
- O tratamento agudo *ex vivo* com clonazepam na dose de 10 mg/kg produziu uma redução do *burst* oxidativo enquanto que o mesmo tratamento na dose de 1 mg/kg produziu um aumento desta função em neutrófilos. Ambas as doses não produziram efeitos sobre a fagocitose.
- A adição *in vitro*, de diazepam, RO 5-4864, clonazepam e PK 11195, na concentração de 100 nM, produziu um aumento no *burst* oxidativo de neutrófilos. Com relação à fagocitose, o diazepam (100 nM) e o RO 5-4864 (100 nM) produziram, também, um aumento na intensidade de fagocitose, enquanto que o clonazepam (100 nM) não produziu efeito algum sobre este parâmetro. Por outro lado, o PK 11195 (100 nM) de *per se* produziu uma diminuição da fagocitose realizada pelos neutrófilos.
- A adição *in vitro*, de diazepam e de RO 5-4864 na concentração de 100 nM em neutrófilos pré incubados com o PK 11195 (100 nM) produziu um aumento do *burst* oxidativo, enquanto que, a associação do clonazepam (100 nM) com o PK 11195 (100 nM), produziu uma redução deste parâmetro. Com relação à

fagocitose, verificou-se uma redução desta função neutrofílica após as três associações.

- A pré incubação de neutrófilos *in vitro* com o *L*-verapamil, na concentração de 100 nM, bloqueou os efeitos do diazepam (100 nM) e do RO 5-4864 (100 nM) sobre o *burst* oxidativo e a fagocitose de neutrófilos. Este procedimento, no entanto, produziu uma reversão dos efeitos do RO 5-4864 (100 nM) sobre o *burst* oxidativo induzido pelo PMA.
- O tratamento agudo *ex vivo*, com diazepam (10 mg/kg) e com clonazepam (10 e 1 mg/kg) aumentou os níveis séricos de corticosterona. Os níveis séricos deste hormônio não foram modificados pelo tratamento prolongado (21 dias) com diazepam (10 mg/kg).
- Receptores benzodiazepínicos periféricos (PBR) foram identificados por imunoistoquímica na membrana de leucócitos circulantes de ratos.

Estes resultados, em seu conjunto, levaram-nos a sugerir que os efeitos do diazepam e de outros ligantes de PBR sobre *burst* oxidativo e a fagocitose de neutrófilos circulantes de ratos se devem, a um aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} induzido, muito provavelmente via ativação de PBR seguida por uma aumento da permeabilidade da membrana ao Ca^{2+} , fato decorrente da abertura de canais de Ca^{2+} sensíveis ao *L*-verapamil.

REFERÊNCIAS

- ABE, Y.; SERIYA, S.; YAMASHITA, T.; SENDO, F. Vascular hypermeability induce by tumor necrosis factor and it's augmentation by IL-1 and IFN-gama is inhibited by selective depletion of neutrophils with a monoclonal antibody. **J. Immunol.**, 145: 2902-07, 1990.
- ADAMNSON, E. J.; SLOCOMBE, R. F. Flow cytometric studies of equine phagocytes following strenuous exercise. **Eq. Vet J.**, v. 18, p. 37-42, 1995.
- ADER, R. FELTEN, D.L. & COHEN, N. **Psychoneuroimmunology**, 2nd ed. (Eds.) Academic Press: San Diego, 1991.
- ADER, R. Immune-derived modulation of behavior. **Ann N. Y. Acad. Sci.** v.594, p. 280-288, 1990.
- ALLEN, R.C. Biochemiexcitation: chemiluminescence and the study of biological oxygenation reactions. In: Adam, W; & Cilento, G. eds. Chemical and biological generation of excited states **New York: Academic Press**, 1982. p. 309.
- ANHOLT, R. R. H.; DE SOUZA, E. B.; OSTER-GRANITE, M. L.; SNYDER, S. H. Peripheral-type benzodiazepine receptors: autoradiographic localization in whole-body sections of neonatal rats. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v. 233, p. 517-526, 1985.
- ARGUELLES, A.E.; ROSNER, J. Diazepam and plasma testosterone levels. **Lancet**, v. 27, p. 607-608, 1975.
- AURORA, P.K.; HANNA, E.E.; PAULO, S.M.; SKOLNIK, P. **J. Neuroimmunol**, v.15, p.1-16, 1987.
- BABIOR B.M. The respiratory bust oxidase. **Curr Opin Hematol.**, v. 2, p 55-60, 1995.
- BABIOR, B.M. NADPH Oxidase: An Update. **Blood**, v. 93, p. 1464-1476, 1999.
- BADWEY J.A., TAUBER A.I., KARNOVSKY M.L. Properties of NADH-cytochrome-b5 reductase from human neutrophils. **Blood**. v. 62(1), p. 152-157, 1983.
- BAINTON, D. F. In " Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates (eds JI. Gallin, I.M. Goldstein and R Snyderman) pp. 265-280. **Raven Press**, New York, 1988.
- BALLANTYNE, D.L.; HALPER, D.D. **Transplant Proc.**, v.7, p. 581-93, 1975.
- BARTROP, R.W.; LUCKHURST, E.; LAZARUS, L; KILOH, G.; PENNY, R. Depressed lymphocyte function after bereavement, **Lancet** v.1, p. 834-836, 1977.

BASILE A.S., SKOLNICK P., Tissue specific regulation of "peripheral-type" benzodiazepine receptor density after chemical sympathectomy. **Life Sci.**, v. 42, p. 273-283, 1988.

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, p. 88-94, 2001.

BASSOE, C. F.; LAERUM, O. D.; GLETTE, F.; HOPEN, G.; HANEBERG, B; SOLBERG, C. O. Simultaneous measurement of Phagocytosis and phagosomal pH by flow Cytometry: role of polymorphonuclear neutrophilic leukocyte granules in phagosome acidification. **Cytom.**, v. 4, p. 254-262, 1983b.

BASSOE, C. F.; LAERUM, O. D.; SOLBERG, C. O.; HANEBERG, B. Phagocytosis of bacteria by human leucocytes measured by flow cytometry. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 174, p. 182-186, 1983a.

BEATTY, P.G.; HARLAN, J.M.; ROSEN, J.M.; HANSEN, J.A.; OCHS, H.D; PRICE, T.H.; TAYLOR, R.F.; KLEBANOFF, S.J. Absence of monoclonal antibody defined protein complex in a boy with abnormal leukocyte function. **Lancet**, v.1, p. 535-7, 1984.

BENAVIDES, J.; QUARTERONET, D.; IMBAULT, F.; MALGOURIS, C.; UZAN, A.; RENAULT, C.; DUBROEUCQ, M.C.; GUEREMY, C.; LEFUR, G. Labeling of "peripheal-type" benzodiazepine binding sites in the rat brain by using [³H] PK 11195, an isoquinoline carboxamide derivate: kinetics studies and autoradiographic localization. **J. Neurochem.** , v.41, p. 1744-50, 1983.

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

BERKOVICH, A., FERRARESE, C., CAVALETTI, G., ALHO, H., MARZORATI, C., BIANCHI, G., GUIDOTTI, A., COSTA, E.,. Topology of two DBI receptors in human lymphocytes. **Life Sci.** v. 52, p. 1265-1277, 1993.

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

BESEDOVSKY, H. O.; SORKIN, E.; FELIX, D.; HASS, H. Hypothalamic changes the during immune response. **Eur. J. Immunol.**, v.7, p. 323-325, 1977.

BESEDOVSKY, H.O; DEL REY, A. SORKIN, E. Linfokine-containing supernatants from com A-stimulated cells increase corticosterone blood levels. **J. Immunol.** v.126, p. 385, 1981.

- BESSLER, H.; CASPI, B.; GAVISH, M.; REHAVI, M.; HART, J.; WEIZMAN, R., Peripheral-type benzodiazepine receptor ligands modulate human natural killer cell activity. **J. Immunopharmac.**, v. 19(5), p. 249-254, 1997.
- BISSERBE, J.C., PATEL, J., ESKAY, R.L., Evidence that the peripheral-type benzodiazepine receptor ligand Ro 5-4864 inhibits beta-endorphin release from AtT-20 cells by blockade of voltage-dependent calcium channels. **J. Neurochem.**, v.47, p.1419-1424., 1986.
- BLAHOS, H. J.; WHALIM, M E.; KRUEGER, K. E. Identification and purification of a 10-kilodalton protein associated with mitochondrial benzodiazepine receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 20285-20291, 1995.
- BLALOCK, J.E. The immune system as a sensory organ. **J.Immunology.**,132, v.3, p. 1067-70, 1984.
- BORMANN, J., Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. **Trends Neurosci.** v. 11(3), p. 112-116, 1998^a.
- BRAESTRUP, C.; SQUIRES, R. F. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity [³H] diazepam binding. Proc. **Natl. Acad. Sci.**, v. 74, p. 3805-3809, 1977.
- CALVO, D.J.; RITTA, M.N.; CALANDRA, R.S.; MEDINA, J.H.; DEL ZOMPO, M.; BOCHETTA, A.L.; CORSINI, G.U.; TALLMAN, J.F.; GESSA, G.L. Properties of benzodiazepine binding sites in the peripheral tissues. **Adv. Biochem. Psychopharmacol.** , v.38, p. 239-48, 1983.
- CANAT, X.; CARAYON, P.; BOUABOULA, M.; CAHARD, D.; ROQUE, C.; LE FUR, G.; CASELLAS, P. Distribution profile and properties of peripheral type benzodiazepine receptors on human hemopoietic cells. **Life Sci.**, v. 52, p. 107-118, 1992.
- CASELLAS, P.; GALIEGUE, S.; BASILE, A. S. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. **Neurochem. Intern.**, v. 40, p. 475-486, 2002.
- CASSATELA, M.A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunol. Today.** v.16, p. 21-6, 1995.
- CAVALLARO S, KORNEYEV A, GUIDOTTI A, COSTA E., Diazepam-binding inhibitor (DBI)-processing products, acting at the mitochondrial DBI receptor, mediate adrenocorticotrophic hormone-induced steroidogenesis in rat adrenal gland.
- CHESON, B.D.; CHRISTENSEN, R.L.; SPERLING, R.; KOHLER, B.E.; BABIOR, B.M. The origin of the chemiluminescence of phagocytosing granulocytes. **J. Clin. Invest.**, v.58, p. 789-96, 1976.
- CLARK, M.; POST, R. M. Lidocaine binds with high affinity to peripheral-type benzodiazepine receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 179, p. 473-475, 1990.

- COVELLI, V.; DECANDIA, P.; ALTAMURA, M.; and JIRILLO, E. Diazepam inhibits phagocytosis and killing exerted by polymorphonuclear cell and monocytes from healthy donors. In vitro studies. **Immunopharmacology Immunotoxicology**, v.11, n.4, p.701-714, 1989.
- COX, D.A.; MATLIB, M.A. A role for the mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchanger in the regulation of oxidative phosphorylation in isolated heart mitochondria. **The Journal of biol. chem.**, v. 268(2), p. 938-947, 1993.
- DECKERT, J.; MARANGOS, P. J. Hormonal interactions with benzodiazepine binding sites in vitro. **Life Sci.**, v. 39, p. 675-683, 1986.
- DEL ZOMPO, M.; BOCHETTA, A.L.; CORSINI, G.U.; Tallman, J.F.; Gessa, G.L. Properties of benzodiazepine binding sites in the peripheral tissues. **Adv. Biochem. Psychopharmacol.** , v.38, p. 239-48, 1983.
- DESCOTES, J.; TEDONE, R.; EVREUX, J. Supression of humoral and celular immunity in normal mice by diazepam. **Immunol. Letters.**, v. 5, p. 41-3, 1982.
- DEVAUD, L. L.; MURRAY, T. F. Involvement of peripheral-type benzodiazepine receptors in the proconvulsant actions of pyrethroid insecticides. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 247, p. 14-22, 1988.
- DEWALD B, THELEN M, BAGGIOLINI M., Two transduction sequences are necessary for neutrophil activation by receptor agonists. **J Biol Chem.**; v. 263(31), p. 16179-16184, 1988.
- DINARELLO, C.A . Interleikin-1 and interleukin antagonism. **Blood**, v. 77, p. 1627-52, 1991.
- DUBRAVEC, D.B.; SPRIGGS, D.R.; MANNICK, J.A.; RODRICK, M.L. Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor. **Proc. Natl. Acad. Sci.**,v. 87, p. 6758-61, 1990.
- DUNN, A.J. Interactions between the nervous system and the immune system. In: psychopharmacology: The fourth generation of progress. Bloom, F.E. & Kupfre, D.J. (Eds) Raven Press, New York, pp, 719-731, 1995.
- DUSI, S.; DONINI, M.; Rossi, F. Mechanisms of NADPH oxidase activation in human neutrophils: p67 phox is required for the translocation of rac 1 but not of rac 2 from cytosol to the membranes. **Biochem. J**, v.15, p. 991-4, 1995.
- FEARON, D. T.; COLLINS, L. A. Increased expression of C3b receptors on polymorphonuclear leukocytes induced by chemotactic factors and purification procedures. **J. of Immunol.**, v. 130, p. 370-375, 1983.
- FERRARESE, C.; APPOLONIO, I.; FRIGO, M.; PEREGO, M.; PIERPAOLI, C.; TRABUCCHI, M.; FRATTOLA, L. Characterization of peripheral benzodiazepine receptors in human blood mononuclear cells. **Neuropharmacol.**, v. 29, p. 375-378, 1990.

FINNERTY, M., MARCZYNSKI, T.J., AMIRAUDD, H.J., URBANIC, M., ANDERSEN, B.R., Benzodiazepines inhibit neutrophil chemotaxis and superoxide production in a stimulus dependent manner, PK-11195 antagonizes these effects.

Immunopharmacology, v. 22, p. 185-194, 1991.

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

FRIDE, E.; SKOLNICK, P.; ARORA, P. K. Immunoenhancing effects of alprazolam in mice. **Life Sci.**, v. 47, p. 2409-2420, 1990.

GALDIERO F, BENTIVOGLIO C, NUZZO I, IANNIELLO R, CAPASSO C, MATTERA S, NAZZARO C, GALDIERO M, ROMANO CARRATELLI C. Effects of benzodiazepines on immunodeficiency and resistance in mice. **Life Sci.**, v. 57(26), p. 2413-2123. 1995.

GALIÈGUE, S.; JBILO, O.; COMBES, T.; BRIBES, E.; CARAYON, P.; LE FÜR, G.; CASELLAS, P. Cloning and characterization of PRAX-1: a new protein that specifically interacts with the Peripheral Benzodiazepine Receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 2938-2952, 1999.

GARRATT, J.C., GENT, J.P., FEELY, M.F., HAIGH, J.R.M., Can benzodiazepine be classified by characterizing their anticonvulsant tolerance-inducing potential? **Eur. J. Pharmacol.**, v. 145, p. 75-80. 1988.

GOH, K.; FURUSAWA, S.; KAWA, Y.; NEGISHI-OKITSU, S.; MIZOGUSHI, M. Production of interleukin-1-alpha and beta by human peripheral polymorphonuclear neutrophils. **Int. Arch. Appl. Immunol.** v.88, p. 297-303, 1989.

GOLDFARB, G., BELGHITI, J., GAUTERO, H., BOIVIN, P., In vitro effect of benzodiazepines on polymorphonuclear leukocyte oxidative activity. **Anesthesiology**, v. 60, p. 57-60. 1984.

GRAEFF, F.G. Drogas Psicotrópicas e seu modo de ação. Editora Pedagógica e Universitária (EPU), São Paulo 1989, 135p.

GUIDOTTI, A.; FORCHETT, C. M.; CORDA, M. G.; KONNEL, D.; BENNETT, C. D.; COSTA, E. Isolation characterization and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 80, p. 3531-3535, 1983.

GUIDOTTI, A.; SLOBODYANSKY, A.; BERKOVICH, A.; COX, D.H.; WAMBELE, C. The heterogeneity of GABA_A receptors and the multiplicity of endogenous ligands for their allosteric modulatory centers. **Adv. biochem. Psychopharmacol.** , v.45, p. 161-73, 1988.

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

GWOSDOW, A. R.; O'CONNELL, N.; SPENCER, J. A.; KUMAR, M. S.; AGARWAL, R. K.; BODE, H.H.; ABOU SAMRA, A. B. Interleukin-1 induced corticosterona release occurs by an adrenergic mechanism from rat adrenal gland. **Am. J. Physiol.**, v.263, p.461-466, 1992.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Clarendon, 1989.

HAMMOND B.; HESS M.L., The oxygen free radical system: potential mediator of myocardial injury. **J Am Coll Cardiol.** v. 6(1), p. 215-220. 1985.

HARVEY, S.C., Hypnotics and sedatives, in: Gilman, A.G.; Goodman, T.W.; Rall, F. Murad (Eds), **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 7th edition, p. 339-371, 1985.

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

HELLEWELL, P.G. & WILLIAMS, T.J. The Neutrophil. In: **Immunopharmacology of Neutrophils**. New York: Academic Pres., p. 1-4. 1994.

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

HIRSCH, J. D.; BEYER, C. F.; MALKOWITZ, L.; BEER, B.; BLUME, A. J. Mitochondrial benzodiazepine receptors mediate of mitochondrial respiratory control. **Mol. Pharmacol.**, v. 35, p. 157-163, 1989.

HIRSCH, J.D.; BEYER, C.F.; MALKOWITZ, L.; BEER, B.; BLUME, A.J. Mitochondrial benzodiazepine receptors mediate inhibition of mitochondrial respiratory control. **Mol. Pharmacol.** , v. 34, p. 157-63, 1988a.

HIRSCH, J.D.; BEYER, C.F.; MALKOWITZ, L.; LOULLIS, C.C.; BLUME, A.J. Characterization of ligand binding to mitochondrial benzodiazepine receptors. **Mol. Pharmacol.** ,v. 34, p. 164-72, 1988b.

HU, H.T.; BEI, L.; QIAN, M.Z.; SHEN, X., Intracellular free calcium regulates the onset of the respiratory burst of human neutrophils activated by phorbol Myristate Acetate. **Cell. Signal**, v. 11(5), p. 355-360, 1999.

ISAKOVIC K, JANKOVIC BD. Neuro-endocrine correlates of immune response. II. Changes in the lymphatic organs of brain-lesioned rats. **Int Arch Allergy Appl Immunol.**, v. 45(3), p. 373-84. 1973.

JANKOVIC BD, ISAKOVIC K. Neuro-endocrine correlates of immune response. I. Effects of brain lesions on antibody production, Arthus reactivity and delayed

hypersensitivity in the rat. **Int Arch Allergy Appl Immunol.** v. 45(3), p. 360-372. 1973.

JANKOVIC, B.D.; HORVAT, J.; MITROVIC, K. Antigenic correlation between rat brain synaptic vesicles and rat bone marrow B lymphocytes. **Experientia**, v.35, p.1393-5, 1979.

JOHANNISSON, A.; GRO-ND AHL, G.; DEMMERS, S.; JENSEN-WAERN, M. Flow-cytometric studies on the phagocytic capacities of equine neutrophils. **Acta Vet. Scand**, v. 36, p. 553-562, 1995.

JOHNSON, N; LEONE, F. Statistics and Experimental design In: **Engeneering and physical sciences**. New York, John Wiley,. p.241-244. 1974.

KELLOGG, C.K.; CHISHOLM, J.; SIMMONS, R.D.; ISON, J.R.; MILLER, R.K. Drugs and hormones in brain development. **Munike Karger**. p. 119-29, 1983.

KESSELS, G.C.; ROOS, D.; VERHOEVEN, A. J. **J. Biol. Chem.** v. 266, p. 23152-23156, 1991.

KLOSTERHALFEN, W.; KLOSTERHALFEN, S. Pavlovian conditioning of immunosuppression modifies adjuvant arthritis in rats. **Behavioral Neurosciences**. v.4, p.663-666, 1983.

KOZIKOWSKI A.P., KOTOULA M., MA D., BOUJRAD N., TUCKMANTEL W., PAPADOPOULOS V. Synthesis and biology of a 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl derivative of 2-phenylindole-3-acetamide: a fluorescent probe for the peripheral-type benzodiazepine receptor. **J Med Chem.**, v. 40(16), p. 2435-2439. 1997.

KRUEGER, K. E.; PAPADOPOULOS,V. Peripheral-type benzodiazepine receptors mediate translocation of cholesterol from outer to inner mitochondrial membranes in adrenocortical cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 10515-22, 1990.

KRUMHOLZ, W.; KÄBISH, S.; BISCOPNIG, J.; URBEN, V. Intensivther. Notfallmed., v. 22, p. 211- 24, 1989.

LAGHI-PASINI, F., CECCATELLI, L., CAPECCHI, P.L., ORRICO, A., PASQUI, A.L., DI PERRI, T., Benzodiazepines inhibit in vitro free radical formation from human neutrophils induced by FMLP and A23187. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, v. 9, p. 101-114, 1987.

LASCHI, A.; DESCOTES, J.; TACHOM, P.; EVREUX, J.C. **Toxicol. Letters**, v. 16, p. 281-90, 1983.

LAZZARINI R., PAULINO C.A., MALUCELLI B.E., PALERMO-NETO J. Effects of high doses of diazepam on carrageenin-induced paw edema in rats. **Braz J Med Biol Res.** v. 29(11), p. 1525-1529. 1996.

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

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

LE FUR, G.; PERRIER, M. L.; VAUCHER, N.; IMBAULT, F.; FLAMIER, A.; BENAVIDES, J.; UZAN, A.; RENAULT, C.; DUBROEUCQ, M. C.; GUEREMY, C. Peripheral benzodiazepine binding sites: effect of PK 11195, 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-propyl)-3-isoquinoline carboxamide. **Life Sci.**, v. 32, p. 1839-1847, 1983.

LEHRER, R.; GANZ, T.; SELSTED, M.E.; BABIOR B.M.; CURNUTTE, J.T. Neutrophils and host defense. **Ann. Intern. Med.**, v. 109, p. 127-42, 1988.

LENFANT, M.; HAUMONT, J.; ZAVALA, F. In vivo immunomodulating activity of PK 11195, a structurally unrelated ligand for "peripheral" benzodiazepine binding sites: I. Potentiation in mice of the humoral response to sheep red blood cells. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 8, p. 825-828, 1986.

LENFANT, M.; ZAVALA, F.; HAUMONT, J.; POTIER, P. Presence of a peripheral type benzodiazepine binding site on the macrophage; its a possible role in immunomodulation. **C.R. Acad. Sci. III.** v. 300, p. 309-314, 1985.

LINDEMAN, A.; RIEDEL, D.; OSTER, W.; ZIEGLER-HEITBROCK, H.W.L.; MERTELSMANN, R.; HERRMANN, F. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor induces cytokine secretion by human polymorphonuclear leukocytes. **J. Clin. Invest.**, v.83, p. 1308-12, 1989.

LINDEMANN, A.; RIEDEL, D.; OSTER, W.; ZIEGLER-HEITBROCK, H.W.L.; MERTELSMANN, R.; HERRMANN, F. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor induces cytokine secretion by human polymorphonuclear leukocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 83, p. 1308-1312, 1989.

LLOYD, A.R. OPPENHEIM, J.J., Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. **Immunol. Today**, v. 13, p. 169-172, 1992.

LORD, P.C.W.; WILMONT, L.M.G.; MIZEL, S.B.; Mc CALL, C.E. Expression of interleukin-1 alfa and beta genes by human blood polymorphonuclear leukocytes. **J. Clin. Invest.**, v.87, p. 1312-1321, 1991.

LUKEMAN, D. S.; FANESTIL, D. D. Interactions of diuretics with a renal benzodiazepine binding site in rat kidney. **J. Pharmacol Exp. Ther.**, v. 241, p. 950-955, 1987.

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

- MANDEL, A.J., ed. Neurobiological mechanisms of adaptation and behavior advances in biochemical psychopharmacology. New York, **Raven Press**, v. 13, 1975.
- MARANGOS, P. J.; POST, R. M.; PATEL, J.; ZANDER, K.; PARMA, A.; WEISS, A. Specific and potent interactions of carbamazepine with brain adenosine receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 93, p. 175-182, 1983.
- MARANGOS, P.J.; PATEL, J.; BOULENGER, J.P.; CLARK-ROSEMBERG, P. **Mol. Pharmacol.**, v. 22, p. 26-8, 1982.
- MARC, V.; MARSELLI, P. L. Effect of diazepam on plasma corticosterone levels in the rat. **J. Pharm Pharmacol.**, v. 21, p. 784-786, 1969.
- MARINO, F., CATTANEO, S., COSENTINO, M., RASINI, E., DI GRAZIA, L., FIETTA, A.M., LECCHINI, S., FRIGO, G., Diazepam stimulates migration and phagocytosis of human neutrophils: possible contribution of peripheral-type benzodiazepine receptors and intracellular calcium. **Pharmacology**, v. 63, p. 42-49. 2001.
- MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J. Diazepam effects on peritoneal macrophage activity and corticosterone serum levels in Balb/c mice. **Life Sci.**, v. 65, p. 2157-2165, 1999.
- MASSOCO, C.O., PALERMO-NETO, J. Effects of midazolan on equine innate immune response: A flow cytometric study. Veterinary Immunology and immuno pathology. (In Press). 2003.
- MASSOCO, C.O., Receptores benzodiazepínicos e a resposta imune inata de equinos: efeitos do midazolan – tese de doutorado, São Paulo, 2003.
- MATLIB, M.A.; DOANE, J.D.; SPERELAKIS, N.; RICCIPO-NETO, F., **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 128, p. 290-296. 1985.
- McENERY, M. W.; SNOWMAN, A. M.; TRIFILETTI, R. R.; SNYDER, S. H. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 3170-3174, 1992.
- McGORUM, B. C.; DIXON, P. M.; HALLIWELL, R. E. W. Phenotypic analysis of peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes in control and chronic obstructive pulmonary disease affected horses, before and after (hay and straw) challenges. **Vet. Immunol Immunop.**, v. 36, p. 207-222, 1993.
- NALIBOFF B.D., BENTON D., SOLOMON G.F., MORLEY J.E., FAHEY J.L., BLOOM E.T., MAKINODAN T., GILMORE S.L. Immunological changes in young and old adults during brief laboratory stress. **Psychosom Med.** v. 53(2), p. 121-132, 1991.
- NATHAN, C. F. Neutrophil activation on biological surfaces: massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophage and lymphocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 80, p. 1550-1560, 1987.

NIKOLIC, V.; JOVANOVA-NESIC, K.; JANKOVIC, B.D. Locus cereleus and immunity. I. Supression of plaque-forming cell response and antibodyproduction in rats with lesioned locus ceruleus. **Inter. J. Neuroscience**, v.68, p.283-287, 1993.

NISHIZUKA, Y., **Science**, v. 233, p. 305-312, 1986.

O'BEIRNE, G.B., WOODS, M.J., WILLIAMS, D.C., Two subcellular locations for .peripheral-type benzodiazepine acceptors in rat liver. **Eur. J. Biochem.** v.188, p. 131-138. 1990.

ODA, T.: KATORI, M.: HATANAKA, K.; NAGAI, Y. Inhibition of neutrophil migration by a selective inhibitor of matrix metalloproteinase: analysis by intravital microscopy. **Med. Inflamm.**,v. 4, p. 133-7, 1995.

OKE, B. O.; SUAREZ-QUIAN, C. A.; RIOND, J.; FERRARA, P.; PAPADOPOULOS, V. Cell surface localization of the peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in adrenal cortex. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 87, p. R1-R6, 1992.

PALERMO-NETO, J., **Ciência e cultura**, v. 38, p. 1568-1574, 1986.

PALERMO-NETO, J., MASSOCO, C.O.; ROBESPIERRE, W.S.: Effects of Physical and Psychological Stressors on Stress/anxiety levels, macrophage activity and Ehrlich tumor Growth. Brain, Behavior and Immunity. 2001. (In Press)

PALMER, G.C. e SCOTT, H.R., The cyclic Amp response to noradrenalin in young adult ra t brain following post-natal injections of 6-hidroxydopamine. **Experientia, Basel**, v. 30, p. 520-521, 1974.

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

PAPADOPOULOS, V.; MUKHIN, A. G.; COSTA, E.; KRUEGER, K. E. The peripheral-type benzodiazepine receptor is functionally linked to Leydig cell steroidogenesis. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 3772-3779, 1990.

PARAGO, A.; NISHIZUKA, Y.; **FEBS Lett.** v. 268, p. 350-354, 1990.

PARK, JW & Royal CR; BENNA, JE; BABIOR, BM. Kinase-dependent activation of the leukocyte NADPH oxidase in a cell-free system. Phosphorilation of membranes and p47 (phox) during oxidase activation. **J. Biol. Chem.**,v. 272, p. 11035-43, 1997.

PARK, JW & BABIOR, B.M. Activation of the leukocyte NADPH oxidase subunit p47 phox by protein kinase C. A phosphorylation-dependent change in the conformation of the C- terminal end of p47 phox. **Biochemistry**. v.17, p. 7474-80, 1997.

PAWLIKOWSKI, M.; STEPIEN, H.; KOMOROWSKI, J. Hypothalamic-pituitary-thyroid axis and the immune system. Neuroimmunomodulation, v.1, p.149-152, 1994. **Psychopharmacol.** , v.38, p. 239-48, 1983.

- PEREIRA, B.; COSTA ROSA, L.F.B.P.; SAFI, D.A.; BECHARA, E. J. H.; CURI, R. Hormonal regulation of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in rat macrophages. **Biochem. Pharmacol.**, v.50, p. 2093-8, 1995.
- PICK, E. & MIZEL, D. Rapid microassay for measurement of superoxide and hydrogen peroxide by macrophages in culture, using an automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol. Methods**, v.49, p. 211-26, 1981.
- PITTET, D.; KRAUSE, K.H.; LEW, D.P. **Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.** v. 26, p 369-398, 1992.
- Proc Natl Acad Sci U S A.**; v. 89(22), p. 10598-10602, 1992.
- RAIDAL, S. L.; BAILEY, G. D.; LOVE, D. N. Flow cytometric determination of oxidative burst activity of equine peripheral blood and bronchoalveolar lavage-derived leukocytes. **The Vet. J.**, v. 156, p. 117-126, 1998.
- RAMPE, D., TRIGGLE, D.J., Benzodiazepines and calcium channel function. **Trends Pharmacol. Sci.** v. 7, p. 461-469. 1986.
- RAMSEIER, H.; LICHTENSTEIGER, W.; SCHULUMPF, M. In vitro inhibition of cellular immune responses by benzodiazepine and PK 11195. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, v. 15, p. 557-582, 1993.
- RAPPOLEE D.A., WANG A., MARK D., WERB Z.. Novel method for studying mRNA phenotypes in single or small numbers of cells. **J Cell Biochem.** v. 39(1), p. 1-11. 1989.
- REHM, S.R.; GROSS, G.N.; PIERCE, A.K. Early bacterial clearance from murine lungs. Species-dependent phagocyte response. **J. Clin Invest.**, v.66, p.194-9, 1980.
- RIGHI, D. A.; PINHEIRO, S. R.; GUERRA, J. L.; PALERMO-NETO, J. Diazepam effects on Mycobacterium bovis-induced infection in hamsters. **Brazil. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, p. 1145-1153, 1999.
- ROBINSON J.M., BADWEY J.A., Production of active oxygen species by phagocytic leukocytes. **Immunol Ser.**, v. 60, p. 159-178. 1994.
- ROCCA, P.; BELLONE, G.; BENNA, P.; BERGAMASCO, B.; RAVIZZA, L.; FERRERO, P. Peripheral-type benzodiazepine receptors and diazepam binding inhibitor-like immunoreactivity distribution in human peripheral blood mononuclear cells. **Immunopharmacol.**, v. 25, p. 163-178, 1993.
- ROOT, R. K.; METCALF, J.; OSHINO, N.; CHANCE, B. H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis. **J. Clin. Invest.**, v. 55, p. 945, 1975.

ROTHER, G.; VALET, G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2', 7'- dichlorofluorescein. **J. Leuk. Biol.**, v. 47, p. 440-448, 1990.

RUFF, M. R.; PERR, C. B.; WBER, R. J.; WAHL, L. M.; WAHL, S. M.; PAUL, S. M. Benzodiazepine receptor-mediated chemotaxis of human monocytes. **Science**, v. 229, p. 1281-1283, 1985.

SAAD, A. M.; HAGELTORN, M. Flow cytometric characterization of bovine blood neutrophil Phagocytosis of fluorescent bacteria and zymosan particles. **Acta Vet. Scand.**, v. 26, p. 289-307, 1985.

SAANO V., RAGO L., RATY M.. Peripheral benzodiazepine binding sites. **Pharmacol Ther.** v. 41(3), p. 503-514. 1989.

SAANO, V. Central-type and peripheral-type benzodiazepine receptors. **Ann. Clin. Res.** , v.20, p. 348-55, 1988.

SACERDOTE, P., PANERAI, A.E., FRATTOLA, L., FERRARESE, C., Benzodiazepine-induced chemotaxis is impaired in monocytes from patients with generalized anxiety disorder. **Psychoneuroendocrinology**. v. 24, p. 243-249. 1999.

SAPOLSKY, R.; RIVIER, C.; YAMAMOTO, G.; PLOTSKY, P.; VALE, W. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. **Science**, v.1, p.522-524, 1987.

SCHLUMPF, M., LICHTENSTEIGER, W., van Loveren, H. Impaired host resistance to *Trichinella spiralis* as a consequence of prenatal treatment of rats with diazepam. **Toxicology**, v.94, p. 223-230, 1994.

SCHLUMPF, M.; PARMAR, R.; LICHTENSTEIGER, W. Prenatal benzodiazepine immunosuppression: Possible involvement of peripheral benzodiazepine site. **Developmental Pharmacology Therapeutics.** , v.15, p. 178-85, 1990.

SCHLUMPF, M.; PARMAR, R.; SCHREIBER, A.; BÜTIKOFER, H.R.; Nervous and immune system as targets for developmental effects of benzodiazepines: a review of recent studies. **Developmental Pharmacology and Therapeutics**, v. 18, p. 145-58, 1992.

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

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

SHARIKABAD, M.N.; OSTBYE, K.M.; BRORS, ODD., Increased $[Mg^{2+}]$ reduces Ca^{2+} influx and disruption of mitochondrial membrane potential during reoxygenation. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** v. 281, p. H2113-H2123, 2001.

SHARPLESS, S.K., Supersensitivity-like phenomena in the central nervous system. **Fed. Proc.**, v. 34, p. 1990-1997, 1975.

SILVA, F. R., PALERMO-NETO, J. Developmental, neuro and immunotoxic effects of perinatal diazepam treatment in rats. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.** v. 21, p. 247-265, 1999.

SMITH, R.M.; CONNOR, J.A.; CHEN, M.; BABIOR, B.M., The cytosolic subunit p67phox contains a NADPH –binding site that participates in catalysis by the leukocyte NADPH-oxidase. **J. Clin. Invest.**, v. 98, p. 977-983, 1996.

SPADARO, F., DUNN, A.J. Intracerebroventricular administration of interleukin-1 to mice alters investigation of stimuli in a novel environment. **Brain, behavior and immunity.** v.4, p.308-322, 1990.

STITES, D.P.; TERR, A. L. In: Basic human immunology. **Ed. Prentice Hall**, 1991.

SYAPIN, P. J.; SKOLNICK, P. Characterization of benzodiazepine binding sites in cultured cells of neural origin. **J. Neurochem.**, v. 32, p. 1047-1051, 1979.

TAUPIN, V.; JAYAIS, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B. CAZALA, J. B.; BARRIER, G.; BACH, J. F.; ZAVALA, F. Benzodiazepine anesthesia in humans modulates the interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 responses of blood monocytes. **J. Neuroimmunomodul.**, v. 35, p. 13-19, 1991.

THELEN, M., DEWALD, B. and BAGGIOLINI, M. **Physiol. Rev.**, v. 73, p. 797-821. 1993.

TIKU, K.; TIKU, M.L; SKOSEY, J.L. Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils. **J. Immunol.**, v.136, p. 3677-85, 1986.

TORRES, S. R.; FRÖDE, T. S.; NARDI, G. M.; VITA, N.; REEB, R.; FERRARA, P.; RIBEIRO-DO-VALE, R. M.; FARGES, R. C. Anti-inflammatory effects of peripheral benzodiazepine receptor ligands in two mouse models of inflammation. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 408, p. 199-211, 2000.

TORRES, S.R., FRÖDE, T.S., NARDI, G.M., VITA, N., REEB, R., FERRARA, P., RIBEIRO DO VALLE, R.M., FARGES, R.C., Anti-inflammatory effects of peripheral benzodiazepine receptors ligands in two mouse models of inflammation. **Eur. J. Pharmacol.** v. 408, p. 199-211. 2000.

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

VERHOEF, J.; WALDVOGEL, F. A. Testing phagocytic cell function. **Eur. J. Clin. Microbiol.**, v. 4, p. 379-391, 1985.

VERMA, A. SNYDER, S.H. Peripheral type benzodiazepine receptors. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 29, p. 307-22, 1989.

VERMA, A.; NYE, J. S.; SNYDER, S. H. Porphyrins are endogenous ligands for the mitochondrial (peripheral-type) benzodiazepine receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.**, v. 84, p. 2256-2260, 1987.

VERNA, A. SNYDER, S.H. Peripheral type benzodiazepine receptors. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 29, p. 307-22, 1989.

WANG, J. K. T.; MORGAN, J. I.; SPECTOR, S. Benzodiazepines that bind at peripheral inhibit cell proliferation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, p. 753-756, 1984.

WEBSTER, C. Y.; TORPY, D. J.; ELENKOV, I. J.; CHROUSOS, G. P. Corticotropin-releasing hormone and inflammation. In: _____ MCCANN, M.; LIPTON, J. M.; STERNBERG, E. M.; CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W.; SMITH, C. C. (Ed.). **Neuroimmunomodulation: molecular aspects, integrative systems and clinical advances**. New York: Ann. N.Y. Acad. Sci., p. 21-32. 1988.

WEISS, S.J.; YOUNG, J.; LOBUGLIO, A.F.; SLIVKA, A.; NIMEH, N.F. Role of hydrogen peroxide in neutrophil-mediated destruction of cultured endothelial cells. **J. Clin. Invest.**, v.68, p. 714-20, 1981.

WEIZMAN R, LESCHINER S, SCHLEGEL W, GAVISH M. Peripheral-type benzodiazepine receptor ligands and serum steroid hormones. **Brain Res.**, v. 772(1-2), p. 203-208. 1997.

WYMAN, M.P.; von TSCHARNER, V., DERANLEAR, D.A.; BAGGIOLINI, M., **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 12043-12053, 1987.

YAMAMOTO, A., TANIUCHI, S., TSUJI, S., HASUI, M., KOBAYASHI, Y., Role of reactive oxygen species in neutrophil apoptosis following ingestion of heat-killed *Staphylococcus aureus*. **Clin. Exp. Immunol.** v. 29, p. 479-484. 2002.

ZANOTTI, A., NATOLINO, F., CONTARINO, A., LIPARTITI, M., GIUSTI, P., Abecarnil enhances recovery from diazepam tolerance. **Neuropharmacology**, v. 38 (9): p. 1281-1288. 1999.

ZAVALA, F. Benzodiazepine, Anxiety and Immunity. **Pharmacol. Ther.**, v. 75, p. 199-216, 1997.

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

ZAVALA, F., TAUPIN, V., Descamps-Latsha, B. In vivo treatment with benzodiazepines inhibits murine phagocyte oxidative metabolism and production of interleukin 1, tumor necrosis factor and interleukin-6. **Pharmacol. Expl Therap.** V.255, p. 442-450, 1990.

ZAVALA, F.; HAUMONT, J.; LENFANT, M. Interactions of benzodiazepines with mouse macrophages. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 106, p. 561-66, 1984.

ZAVALA, F.; MASSON, A.; BRYs, L.; DE BAETSELIER, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B. A monoclonal antibody against peripheral benzodiazepine receptor activates the human neutrophil NADPH-oxidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 176, p. 1577-1583, 1991.