DANIEL STANKEVICIUS

**ASPECTOS NEUROIMUNOLÓGICOS DO ECSTASY
(N-METIL-3,4-METILENODIOXIMETANFETAMINA
– MDMA), NA INFLAMAÇÃO ALÉRGICA
PULMONAR EM CAMUNDONGOS BALB/C**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Ciências (Farmacologia).

São Paulo
2010

DANIEL STANKEVICIUS

**ASPECTOS NEUROIMUNOLÓGICOS DO ECSTASY
(N-METIL-3,4-METILENODIOXIMETANFETAMINA
– MDMA), NA INFLAMAÇÃO ALÉRGICA
PULMONAR EM CAMUNDONGOS BALB/C**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Ciências (Farmacologia).

Área de concentração:
Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. João Palermo Neto
Co-orientadores: Prof. Dr. Wothan Tavares
de Lima e Prof^ª. Dra. Regina Lúcia de Moraes
Moreau

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Stankevicius, Daniel.

Aspectos neuroimunológicos do ecstasy (N-metil-3,4-Metilenodioximetanfetamina-MDMA), na inflamação alérgica pulmonar em camundongos Balb/C / Daniel Stankevicius. -- São Paulo, 2010.

Orientador: João Palermo Neto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Neuroimunomodulação.

Versão do título para o inglês: Neuroimmunological aspects of ecstasy (N-methyl-3,4-Methylenedioxymethamphetamine-MDMA) on lung inflammatory response in Balb/C mice.

Descritores: 1. Neuroimunomodulação 2. MDMA ecstasy 3. Asma 4. Corticosterona 5. Inflamação alérgica 6. Comportamento I. Neto, João Palermo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB047/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Daniel Stankevicius.

Título da Tese: Aspectos neuroimunológicos do ecstasy (N-metil-3,4-Metilenodioximetanfetamina-MDMA), na inflamação alérgica pulmonar em camundongos Balb/C .

Orientador(a): João Palermo Neto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Autor: Daniel Stankevicius

Orientador: João Palermo-Neto

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Aspectos neuroimunológicos do ecstasy (3,4-Metilenodioximetanfetamina - MDMA) na inflamação alérgica pulmonar em camundongos", protocolo nº772/2005, utilizando 250 (duzentos e cinquenta) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Palermo Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Neuroimmunological aspects of ecstasy (3,4-Methylenedioxymethamphetamine - MDMA), in the lung allergic inflammation in mice", protocol number 772/2005, under the responsibility of Prof. Dr. João Palermo Neto, utilizing 250 (two hundred and fifty) mice, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 25 de novembro de 2005

Profª Drª Júlia Maria Matera

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **074** nas fls. **33** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de João Palermo Neto, Coordenador(a) da Linha de pesquisa ***"Aspectos neuroimunológicos do ecstasy (3,4-Metilenodioximetanfetamina - MDMA) na inflamação alérgica pulmonar em camundongos"*** do qual participou(aram) o(s) alunos **Daniel Stankevicius** e os pesquisadores **Wothan Tavares de Lima, Regina Lúcia de Moraes Moreau**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa)** em **27.02.2007**.

São Paulo, 27 de fevereiro de 2007.

Prof. Dr. CARLOS PELLESCI TABORDA
Vice-Coordenador
CEEa - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária da CEEa - ICB/USP

DEDICATÓRIA

A Deus, pelo presente da vida e por me confortar nos momentos de dúvidas, de dificuldades e de apreensão. Obrigado por eu ser tão feliz!.

Ao meu amado pai Miguel, que não poupou esforços para fazer de minha vida tão plena e única. Pai saudades eternas. Te amo !

À minha mãe, um exemplo de força, garra e determinação, que faz da minha vida a melhor possível. Tenho muito orgulho de ser seu filho e quero que saiba que se não fosse por você eu não teria chegado até aqui. Te amo demais!

Se um dia, já homem feito e respeitado, sentires que a terra cede aos teus pés, que tuas obras se desmoronaram, que não há ninguém a tua volta para te estender a mão, esquece a tua maturidade, volta a tua infância e balbucia, entre lágrimas e esperança, as últimas palavras que sempre te restarão na alma – meu Pai, minha Mãe

Rui Barbosa.

DEDICATÓRIA

À minha esposa Sabrina, pela paciência, ajuda, companheirismo, amor e dedicação em todos os momentos da minha vida. Obrigado por tudo. Te amo demais!!

Ao meu filho, Giovani, um presente maravilhoso de Deus, que faz da minha vida a melhor do mundo. Filho Papai te ama.

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos, Santo e Miguel, que dedicaram parte de suas vidas para minha formação profissional. Obrigado por todo carinho e dedicação!!!
Obrigado por vocês existirem.

A Márcia, Giovanna, Matheus, Camila e Caio vocês são maravilhoso; isso sim que é uma grande família.... Amo vocês!

Ao Prof. Dr. João Palermo-Neto, no qual tenho eterna gratidão, por ter me recebido de portas abertas, pela confiança, apoio e carinho dados à minha orientação e formação profissional!!A cada ano que passa, você nos ensina que ser mestre não é apenas lecionar e que ensinar não se restringe apenas em transmitir conhecimento. Mas sim, ser mestre é ser companheiro e instrutor, é caminhar conosco, passo a passo, transmitindo os segredos da caminhada. Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima, pela orientação, ensinamentos e amizade e por ter me recebido de portas abertas no seu laboratório.

À Profa. Regina Lúcia, pela orientação, confiança, profissionalismo e amizade.

À Dona Vânia e Sr. José, pelo carinho, respeito, amizade e dedicação em todos os momentos.

À minhas irmãs científicas Elaine Cristina e Ana Paula Ligeiro de Oliveira, pela grande paciência, dedicação, apoio e amizade.

Ao Amigo Fábio Ribeiro da Silva pela amizade, carinho e confiança.

Aos Amigos Alison e Viviane, por toda dedicação, ajuda e atenção, dedico minha amizade e admiração. Obrigado por tudo!!!

Ao Fernando coelho pelo excelente convívio e ajuda nos experimentos de reatividade. Obrigado Fê.

Ao Prof. Dr. Amílcar Sabino Damazo do Departamento de Ciências Básicas em Saúde Faculdade de Ciências Médicas – UFMT pela ajuda nos experimentos de histologia.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo, (USP), pelo prazer de ter sido aluno de pós-graduação (Mestrado e Doutorado).

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por ter me recebido de braços abertos.

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

Ao Prof. Dr. Jorge Camilo Flório pela amizade, aprendizado e apoio durante os experimentos de neuroquímica, dedico minha amizade, admiração e respeito.
Jorge muito Obrigado!!

A todos os professores do Departamento de Patologia pela oportunidade e pela satisfação do convívio e pela co-orientação no decorrer deste trabalho.

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

A todos os meus colegas de pós-graduação: Eduardo, Elaine, Mônica, Glaucie, Isabel, , Milena, Wanderley, Andréia, Portela, Luciana, Renato, Ricardo, Milena, Domênica, Ísis, Natô

Ao Ricardo Souza (Jibóia) e à Magali, técnicos do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia (LABFAT) do VPT, pela ajuda e companheirismo durante a realização dos experimentos.

À Priscila pela grande amizade e pelas tantas horas que se dedicou em me ajudar nos experimentos.

A todos os funcionários do biotério do VPT, Cláudia, Nelsinho, Seu Luís, Idalina e Rosiris pela enorme carinho e dedicação na criação dos animais e pelo agradável convívio.

Às funcionárias da secretaria da Farmacologia do ICB , Celma e Julieta , dedico minha amizade, admiração e respeito – Muito obrigado!

À todas as funcionárias da biblioteca do ICB, em especial para Eva e Maria José pelo excelente atendimento e atenção a todos que necessitam.

A todo o grupo da neuroimunomodulação pela ajuda constante, pelo carinho e amizade.

A todos que direto ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido ao Projeto Temático (Processos –99/04228-7 e 04/14128-0) e CNPq (141292/2005-9).

RESUMO

STANKEVICIUS, D. **Aspectos neuroimunológicos do ecstasy (N-metil-3,4-Metilenodioximetanfetamina – MDMA), na inflamação alérgica pulmonar em camundongos Balb/C.** 188 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 2010.

O N-metil- 3-4, metilenodioximetanfetamina (MDMA) ou *ecstasy* tem sido freqüentemente usado por jovens. Analisamos neste trabalho, dentro de uma perspectiva neuroimune, os efeitos da administração aguda de MDMA em parâmetros comportamentais, neuroendócrinos, hematológicos e imunes de camundongos Balb/C, usando para esta última finalidade um modelo de asma experimental. O MDMA produziu: **1-** aumento diferencial da atividade locomotora nas diferentes zonas do campo aberto; aumento na locomoção total e diminuição da atividade exploratória no *hole-board*; aumento da porcentagem de entradas e da taxa de permanência nos braços abertos do LCE; aumento no tempo gasto na caixa de saída e diminuição do número de acessos de risco em uma caixa de exposição a um predador; **2-** aumento dos níveis séricos de corticosterona; **3-** aumento dos níveis de noradrenalina no estriado e córtex frontal, aumento nos níveis de dopamina e de DOPAC no estriado, diminuição dos níveis de DOPAC corticais, aumento de 5-HT e 5-HIAA no estriado, diminuição dos níveis de 5-HIAA e do “*turnover*” de serotonina no hipotálamo e diminuição do “*turnover*” de dopamina no estriado e córtex frontal; **4-** alteração na migração de leucócitos em camundongos alérgicos com diminuição da porcentagem de linfócitos e monócitos circulantes, diminuição do número de granulócitos no lavado bronco alveolar (LBA), efeitos estes que foram revertidos pelo pré-tratamento com RU-486; **5-** redução da expressão de L-selectinas por monócitos e tendência de redução da expressão de L-selectinas por neutrófilos no pulmão; **6-** diminuição das produções espontâneas de IL-4, IL-5 e IL-10 e de IL-4 em cultura estimulada com LPS; **7-** redução da contração da traquéia isolada de animais alérgicos e **8-** redução da desgranulação dos mastócitos em brônquios intrapulmonares. Sugeriu-se que o estresse/ansiedade induzidos pelo MDMA tenham ativado o eixo HHA e/ou do sistema nervoso autonômico simpático dos camundongos, alterando a resposta imune dos mesmos na vigência de um modelo de asma. A inflamação alérgica pulmonar desponta, assim, como importante ferramenta para o entendimento da ação de drogas de abuso em processos neuroimunológicos.

Palavras-chave: MDMA. Neuroimunomodulação. Inflamação alérgica pulmonar. Lavado broncoalveolar. Comportamento. Corticosterona. Asma. Catecolaminas.

ABSTRACT

STANKEVICIUS, D. **Neuroimmunological aspects of ecstasy (N-methyl-3,4-Methylenedioxymethamphetamine – MDMA) on lung inflammatory response in Balb/C mice.** 181 p (PhD Thesis on Pharmacology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 2010.

The N-metil- 3-4, metilenodioximetanfetamina (MDMA) or *ecstasy* is a drug widely used amongst young people. This study was undertaken to analyze, under a neuroimmune perspective, the effects of acute MDMA administration on behavioral, neuroendocrine, hematological and immune parameters on Balb/C mice, using for the latter purpose the allergic lung inflammatory response model. It was observed that MDMA produced in mice: **1-** a differential increase on total locomotion in the different open-field zones; an increase on total locomotion and a decrease on exploratory activity in the hole-board; an increase on both percentage of entrances and time spent on plus-maze open arms; an increase on time spent in the starting box and a decrease of risk assessments in a predator exposition box; **2-** an increase in corticosterone serum levels; **3-** an increase in striatal and frontal cortex noradrenaline levels, an increase in striatal dopamine and DOPAC levels, a decrease in cortical DOPAC levels, an increase in striatal 5-HT and 5-HIAA levels, a decrease in both 5-HIAA levels and 5-HT turnover rates in hypothalamus and a decrease in striatal and cortical dopamine turnover rates; **4-** an alteration on leukocyte migration in allergic mice, i.e., decreased percentage of peripheral blood lymphocytes and monocytes, decreased number of granulocytes on bronchoalveolar lavage fluid (LBA); these effects were reverted by previous RU-486 treatment; **5-** a decrease in L-selectin expression by monocytes and a tendency towards a decrease in L-selectin expression by lung neutrophils; **6-** a decrease on expontaneous production of IL-4, IL-5 e IL-10 and IL-4 in LPS-stimulated cultures; **7-** a decrease in the contraction of allergic mice isolated trachea; and, **8-** a decrease in bronchial mastocytes degranulation. It was suggested that MDMA-induced anxiety/stress symptoms increasing HHA-axis and/or the autonomic nervous system activities this leading to the immune changes observed presently in the allergic lung inflammation model of asthma used. This model, thus, emerges as a useful tool for the understanding of neuroimmune effects of drugs of abuse.

Kay words: Neuroimmunomodulation. Allergic lung inflammation. Bronchoalveolar lavage fluid. Behavior. Corticosterone. Asthma. Cathecolamines.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	- Hormônio adrenocorticotrófico
ADP	- Adenosina di-fostado
AMPH	- Anfetamina
ATP	- Adenosina trifosfato
BDZ	- Benzodiazepínico
BSA	- Albumina sérica bovina
CA	- Campo aberto
Cl⁻	- Cloro
CRF	- Fator liberador de corticotrofina
DA	- Dopamina
DHBA	- 3,4 diidroxibenzilamina
DOPAC	- Ácido diidroxifenilacético
DAG	- Diacil glicerol
DOPAC	- Ácido 4,4-diidroxifenilacético
ERO	- Espécie reativa de oxigênio
GAD	- Enzima ácido glutâmico descarboxilase
GM-CSF	- Fator estimulador de colônia (granulócito / macrófago)
GMP	- Guanosina cíclica monofosfato
HB	- Hole-Board
H₂O₂	- Peróxido de hidrogênio
HHA	- Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
HMMA	- 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina
HPA	- Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
HVA	- Ácido homovanílico
IL	- Interleucina
IP-3	- Fosfatidil inositol-3
LBA	- Lavado Broncoalveolar
LPS	- Lipopolissacáride
LCE	- Labirinto em cruz elevado
MAO	- Monoaminoxidase
MDMA	- 3,4 metilenodioximetanfetamina
MDA	- metilenodioxianfetamina
MDEA	- metilenodioxietilanfetamina
NA	- Noradrenalina
NADPH	- Diidronicotinamida-adenina-dinucleotídio-fostado
NADPH –oxidase	- Enzima ligada a produção de espécies reativas de oxigênio
NMDA	- Receptor para N-metil-D-aspartato
NO	- Óxido nítrico
NOS	- Enzima óxido nítrico sintetase
OVA	- ovalbumina
PBR	- Receptores benzodiazepínicos periféricos
PKC	- Fosfoquinase – C
PMN	- Células polimorfonucleares
PPG	- Propilenoglicol
SI	- Sistema Imunológico
SNAS	- Sistema Nervoso Autônomo Simpático
SNC	- Sistema Nervoso Central
SERT	- Transportadores de serotonina
TNF- α	- Fator de necrose tumoral
TSH	- Hormônio tireóide-estimulante
5-HT	- 5-hidroxitriptamina
5-HIAA	- Ácido hidroxindolacético

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Efeitos da administração intraperitoneal, de diferentes doses de MDMA, na locomoção de camundongos avaliada no campo aberto.....	70
TABELA 2 -	Efeitos da administração intraperitoneal, de diferentes doses de MDMA, sobre a frequência de levantar e velocidade média de camundongos observados no campo aberto.....	72
TABELA 3 -	Efeitos da administração intraperitoneal, de diferentes doses de MDMA, sobre o número e tempo de movimentos iniciados por camundongos avaliado no interior do campo aberto.....	74
TABELA 4 -	Efeitos da administração intraperitoneal, de diferentes doses de MDMA, sobre a porcentagem de entrada nos braços abertos (%EA) e a taxa de permanência nos braços abertos (%TA) de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevados (LCE).....	75
TABELA 5 -	Efeitos da administração intraperitoneal, de diferentes doses de MDMA, sobre a porcentagem de entrada nos braços fechados (%EF) e a taxa de permanência nos braços fechados (%TF) de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevados (LCE).....	77
TABELA 6 -	Efeitos da administração intraperitoneal, de diferentes doses de MDMA, sobre a locomoção total e velocidade média de camundongos observados no Hole-Board (HB).....	79
TABELA 7 -	Efeitos da administração intraperitoneal, de diferentes doses de MDMA, sobre o tempo e número de mergulhos de cabeça de camundongos avaliado no Hole-Board (HB).....	81
TABELA 8 -	Efeitos da administração, de 10,0 MDMA mg/kg de sobre o tempo de permanência na caixa de saída e túnel de acesso à arena de camundongos avaliados na caixa de exposição ao predador.....	82
TABELA 9 -	Efeitos da administração, de 10,0 mg/kg de MDMA, sobre número de entradas de camundongos nas zonas interna e periférica da caixa de exposição ao predador.....	83
TABELA 10 -	Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número e tempo gasto realizando o movimento de autolimpeza, avaliados na caixa de exposição ao predador.....	85
TABELA 11 -	Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número de acessamentos de risco de camundongos, avaliados na caixa de exposição ao predador.....	86
TABELA 12 -	Efeitos da administração, de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o tempo de permanência na caixa de saída e no túnel de acesso à arena de camundongos expostos ao odor de gatos, avaliada na caixa de exposição ao predador.....	87
TABELA 13 -	Efeitos da administração, de 10,0 mg/kg de MDMA, sobre número de entradas de camundongos nas zonas interna e periférica da caixa de exposição ao predador na presença do odor de gatos	88
TABELA 14 -	Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número e o tempo gasto em autolimpeza de camundongos expostos ao odor de gato, avaliados na caixa de exposição ao predador.....	90
TABELA 15 -	Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número de acessamento de risco de camundongos expostos ao odor de gatos avaliados na caixa de exposição ao odor do predador	91

TABELA 16 -	Efeitos da administração intraperitoneal, de 5,0 e 10,0 mg/kg de MDMA ecstacy sobre os níveis noradrenalina e sobre os níveis e “turnover” hipotalâmicos, corticais e estriatais de dopamina e serotonina	94
TABELA 17 -	Efeitos da administração de 5,0 e 10,0 mg/kg de MDMA sobre os níveis de corticosterona sérica medidos trinta, sessenta e cento e vinte minutos após os tratamentos.....	100
TABELA 18 -	Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA seis e doze horas antes da colheita do sangue para medida dos níveis de corticosterona sérica.....	101
TABELA 19 -	Efeitos da administração, de 5,0 e 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número total de glóbulos brancos, glóbulos vermelhos, hematócrito e plaquetas de camundongos.....	103
TABELA 20 -	Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número total de leucócitos no lavado broncoalveolar, na medula óssea e no sangue periférico de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados.....	107
TABELA 21 -	Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número de leucócitos totais e o peso relativo do baço de camundongos.....	109
TABELA 22 -	Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre contagem diferencial de leucócitos sangüíneos em camundongos sensibilizados e desafiados.....	110
TABELA 23 -	Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a porcentagem de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos no lavado broncoalveolar de camundongos Balb/C sensibilizados e desafiados com OVA, trinta minutos antes do desafio antigênico.....	112
TABELA 24 -	Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número total de leucócitos no lavado broncoalveolar, na medula óssea e no sangue periférico de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados após o tratamento com Mifepristona (RU-486) 30,0 mg/kg.....	116
TABELA 25 -	Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a contagem diferencial de leucócitos sangüíneos em camundongos OVA- sensibilizados e desafiados após o tratamento com Mifepristona (RU-486) 30,0 mg/kg.....	118
TABELA 26 -	Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a porcentagem de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos no lavado broncoalveolar de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados após o tratamento com Mifepristona (RU-486) 30,0 mg/kg.....	121
TABELA 27 -	Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a quantificação da produção de interleucinas IL-4, IL5 e IL-10 em explante pulmonar de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados.....	124
TABELA 28 -	Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a expressão de molécula de adesão - L-selectina em leucócitos presentes no sangue de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados medidos por citometria de fluxo.....	129
TABELA 29 -	Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a expressão de molécula de adesão - L-selectina em leucócitos presentes no lavado broncoalveolar de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados medidos por citometria de fluxo.....	131
TABELA 30 -	Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a reatividade à metacolina das vias aéreas in vitro de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados.....	133

TABELA 31 -	Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a reatividade à metacolina das vias aéreas in vitro de camundongos.....	135
TABELA 32 -	Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a quantificação e desgranulação de mastócitos em brônquio intrapulmonar de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados.....	137

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	EthoVision® - (Video Tracking Motion & Behavior Recognition System Versã 1.90) – equipamento de rastreamento em vídeo, usado para análise de movimentos e reconhecimento comportamental.....	50
FIGURA 2 -	Representação gráfica das áreas virtualmente marcadas pelo aparelho EthoVision® no campo aberto.....	50
FIGURA 3 -	Representação gráfica das áreas virtualmente marcadas pelo aparelho EthoVision® no LCE.....	52
FIGURA 4 -	Representação gráfica das áreas virtualmente marcadas pelo aparelho EthoVision® do hole-board.....	53
FIGURA 5 -	Representação gráfica da caixa de exposição ao predador para análise do comportamento defensivo e níveis de ansiedade.....	55
FIGURA 6 -	Sistema de HPLC – ED (SHIMATZU Modelo 6A) utilizado neste trabalho para dosagem neuroquímica.....	59
FIGURA 7 -	Citômetro de fluxo modelo FACScalibur da Becton Dickinson acoplado a um computador Macintosh (G4) da Apple utilizado para avaliar a expressão de L - selectinas.....	66
FIGURA 8 -	Efeitos da administração de MDMA na atividade geral de camundongos, avaliada no campo aberto.....	71
FIGURA 9 -	Efeitos da administração de MDMA na frequência de levantar e velocidade média de camundongos, avaliado no campo aberto.....	73
FIGURA 10 -	Efeitos da administração de MDMA no número de movimentos iniciados e no tempo gasto em movimento por camundongos, no campo aberto.....	74
FIGURA 11 -	Efeitos da administração de MDMA na porcentagem de entrada (%EA) e taxa de permanência (%TA) nos braços abertos no labirinto em cruz elevado (LCE).....	76
FIGURA 12 -	Efeitos da administração de MDMA na porcentagem de entrada (%EA) e taxa de permanência (%TA) nos braços abertos no labirinto em cruz elevado (LCE).....	78
FIGURA 13 -	Efeitos da administração de MDMA na locomoção total de camundongos no labirinto em cruz elevado.....	78
FIGURA 14 -	Efeitos da administração de MDMA na locomoção total e velocidade média de camundongos no <i>Hole-Board</i>	80
FIGURA 15 -	Efeitos da administração de MDMA no número e tempo gasto de <i>head-dipping</i> por camundongos, avaliado no <i>Hole-Board</i>	81
FIGURA 16 -	Efeitos da administração de MDMA 10,0 mg/kg no tempo de permanência na caixa de saída e túnel de acesso de camundongos, avaliada na caixa de exposição ao predador.....	83
FIGURA 17 -	Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número de entradas de camundongos nas zonas interna e periférica da caixa de exposição ao predador.....	87
FIGURA 18 -	Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA no número e tempo gasto realizando <i>grooming</i> de camundongos, avaliados na caixa de exposição ao predador.....	87
FIGURA 19 -	Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA no número de acessamento de risco de camundongos, avaliados na caixa de exposição ao predador.....	86

FIGURA 20 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA no tempo de permanência na caixa de moradia e túnel de acesso de camundongos, expostos ao odor de gatos, avaliada na caixa de exposição ao predador.....	88
FIGURA 21 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA no número de entradas de camundongos nas zonas interna e periférica da caixa de exposição ao predador na presença do odor de gatos.....	89
FIGURA 22 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA no número e o tempo gasto realizando <i>grooming</i> de camundongos, avaliados na caixa de exposição ao odor de gato.....	90
FIGURA 23 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA no número de acessamento de risco de camundongos expostos ao odor de gatos avaliados na caixa de exposição ao predador.....	91
FIGURA 24 - Efeitos da administração intraperitoneal de MDMA 5,0 e 10 mg/kg sobre os níveis hipotalâmicos, estriatais e corticais de noradrenalina.....	95
FIGURA 25 - Efeitos da administração intraperitoneal de MDMA 5,0 e 10 mg/kg sobre os níveis hipotalâmicos, estriatais e corticais de dopamina.....	95
FIGURA 26 - Efeitos da administração intraperitoneal de MDMA 5,0 e 10 mg/kg sobre os níveis hipotalâmicos, estriatais e corticais de HVA.....	96
FIGURA 27 - Efeitos da administração intraperitoneal de MDMA 5,0 e 10 mg/kg sobre os níveis hipotalâmicos, estriatais e corticais de DOPAC.....	96
FIGURA 28 - Efeitos da administração intraperitoneal de MDMA 5,0 e 10 mg/kg sobre o “turnover” hipotalâmico, estriatal e cortical de dopamina.....	97
FIGURA 29 - Efeitos da administração intraperitoneal de MDMA 5,0 e 10 mg/kg sobre o “turnover” hipotalâmico, estriatal e cortical de dopamina.....	97
FIGURA 30 - Efeitos da administração intraperitoneal de MDMA 5,0 e 10 mg/kg sobre os níveis hipotalâmicos, estriatais e corticais de serotonina.....	98
FIGURA 31 - Efeitos da administração intraperitoneal de MDMA 5,0 e 10 mg/kg de MDMA, sobre os níveis hipotalâmicos, estriatais e corticais de 5HIAA.....	98
FIGURA 32 - Efeitos da administração intraperitoneal de MDMA 5,0 e 10 mg/kg sobre o “turnover” hipotalâmico, estriatal e cortical de serotonina.....	99
FIGURA 33 - Efeitos da administração intraperitoneal de MDMA 5,0 e 10 mg/kg sobre os níveis séricos de corticosterona de camundongos medidos 30, 60 e 120 min após os tratamentos.....	100
FIGURA 34 - Efeitos da administração intraperitoneal, de 10 mg/kg de MDMA, sobre os níveis séricos de corticosterona de camundongos medidos 6 e 12 h após o tratamento.....	102
FIGURA 35 - Efeitos da administração de 5,0 e 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número total de glóbulos brancos, glóbulos vermelhos, hematócrito e plaquetas de camundongos avaliados no contador de automático de células.....	104
FIGURA 36 - Ilustração do delineamento experimental para caracterização dos efeitos do MDMA- sobre o número total de leucócitos no lavado broncoalveolar, na medula óssea e no sangue periférico de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados.....	105
FIGURA 37 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número total de leucócitos no lavado broncoalveolar, na medula óssea e no sangue periférico de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados.....	108

FIGURA 38 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número total de leucócitos no lavado broncoalveolar, na medula óssea e no sangue periférico de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados.....	109
FIGURA 39 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre contagem diferencial de leucócitos sangüíneos em camundongos sensibilizados e desafiados.....	111
FIGURA 40 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número de eosinófilos, macrófagos e neutrófilos no lavado broncoalveolar de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA, trinta minutos antes do desafio antigênico.....	113
FIGURA 41 - Ilustração do delineamento experimental para caracterização dos efeitos do MDMA- 10mg/kg após o tratamento com Mifepristona (RU-486) 30mg/kg sobre o número total de leucócitos no lavado broncoalveolar, na medula óssea e no sangue periférico de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados.....	114
FIGURA 42 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número total de leucócitos na medula óssea, no sangue periférico e no lavado broncoalveolar de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados após o tratamento com Mifepristona (RU-486).....	117
FIGURA 43 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a contagem diferencial de linfócitos, monócito e neutrófilos sangüíneos de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados após o tratamento com Mifepristona (RU-486).....	119
FIGURA 44 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a contagem de eosinófilo, macrófago e neutrófilo do LBA de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados após o tratamento com Mifepristona (RU-486)...	122
FIGURA 45 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a quantificação da produção de interleucinas IL-4, IL5 e IL-10 em explante pulmonar de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados trinta minutos antes do desafio antigênico.....	125
FIGURA 46 - Citograma dos leucócitos do sangue circulantes A e do lavado broncoalveolar de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.....	127
FIGURA 47 - Citograma dos leucócitos do sangue circulantes A e Histograma dos monócitos após marcação com Anti-CD62 dos animais sensibilizados e desafiados com OVA.....	127
FIGURA 48 - Citograma dos leucócitos do lavado Broncoalveolar (LBA) dos animais não manipulados, citograma dos leucócitos do lavado Broncoalveolar (LBA) dos animais alérgicos e Histograma dos Neutrófilos após marcação com Anti-CD62 dos animais sensibilizados e desafiados com OVA.....	128
FIGURA 49 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a expressão de molécula de adesão - L-selectina em leucócitos presentes no sangue de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados.....	130
FIGURA 50 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a expressão de molécula de adesão - L-selectina em leucócitos presentes no lavado broncoalveolar de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados.....	131
FIGURA 51 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a reatividade a metacolina das vias aéreas in vitro de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados.....	134

FIGURA 52 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a reatividade a metacolina das vias aéreas in vitro de camundongos tratados com MDMA...	135
FIGURA 53 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a quantificação e desgranulação de mastócitos em brônquio intrapulmonar de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados.....	137
FIGURA 54 - Análise dos mastócitos no tecido pulmonar.....	138
FIGURA 55 - Fotomicrografia do parênquima pulmonar de camundongos.....	139

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO DA LITERATURA	28
2.1 Neuroimunomodulação.....	28
2.2 MDMA- ECSTASY.....	32
2.3 Asma	38
3 OBJETIVOS	43
3.1 Obetivo Geral	43
3.2 Objetivos Específicos	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Animais	44
4.2 Fármacos.....	44
4.3 Corantes Celulares	44
4.4 Corantes e Soluções	45
4.5 Procedimentos Comportamentais	46
4.5.1 Rastreamento do Animal e Análise do Movimento	47
4.5.2 Reconhecimento Comportamental: Parâmetros Semi - Automáticos	48
4.5.3 Compilação e Análise dos Dados	48
4.5.4 Medida da Atividade Geral no Campo Aberto	49
4.5.5 Avaliação do Comportamento no Labirinto em Cruz Elevado	51
4.5.6 Medida da Atividade Exploratória no <i>Hole-Board</i>	52
4.5.7 Medida do comportamento defensivo e ansiedade através do teste de exposição ao odor e presença do predador.....	54
4.6 Metodologias neuroquímicas	56
4.6.1 Coleta e processamento dos tecidos.....	56
4.6.2 Dosagens neuroquímicas.....	57
4.7 Dosagem dos níveis séricos de corticosterona sérica.....	59
4.7.1 Coleta de sangue para obtenção do soro.....	59
4.7.2 Dosagem de corticosterona.....	59
4.8 Hemograma	61
4.9 Metodologias do estudo da reatividade das vias aéreas e influxo celular pulmonar.....	61
4.9.1 Inflamação alérgica pulmonar - sensibilização e broncoprovocação <i>in vivo</i>	61
4.9.2 Obtenção do lavado broncoalveolar (LBA)	62
4.9.3 Determinação do número de células presentes no LBA.....	62
4.9.4 Determinação do número de células presentes na medula óssea	63
4.9.5 Determinação do número de leucócitos circulantes	63
4.9.6 Determinação do número de leucócitos no baço	63
4.10 Cultura de tecido pulmonar isolado (explante).....	64
4.11 Quantificação de citocinas IL-4, IL-5 E IL-10	64
4.12 Citometria de fluxo.....	65
4.13 Avaliação da expressão de l- selectinas em células obtidas do lavado broncoalveolar (LBA) e do sangue por citometria de fluxo.....	66
4.14 Avaliação da reatividade das vias aéreas <i>in vitro</i> através da traquéia isolada murina	67

4.15	Fixação, processamento e inclusão do tecido pulmonar para avaliação da desgranulação dos mastócitos.....	67
4.16	Estudo histopatológico	68
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	68
6	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS	69
6.1	Experimento 1: Caracterização dos efeitos comportamentais do MDMA	69
6.2	Experimento 2: Caracterização dos efeitos da administração de MDMA 5,0 e 10,0 mg/kg sobre a atividade exploratória em um <i>hole-board</i>	79
6.3	Experimento 3: Caracterização dos efeitos da administração de MDMA sobre o teste de exposição a presença de um rato.....	82
6.4	Experimento 4: Caracterização dos efeitos da administração de MDMA 10,0 mg/kg sobre o teste de exposição ao odor de gatos na caixa de exposição ao predador.....	87
6.5	Experimento 5: Caracterização dos efeitos agudos do MDMA 5,0 e 10,0 mg/kg sobre os níveis e “turnover” hipotalâmicos, corticais e estriatais de serotonina e dopamina.....	92
6.6	Experimento 6: Caracterização dos efeitos do MDMA 5,0 e 10,0 mg/kg sobre os níveis séricos de corticosterona.....	99
6.7	Experimento 7: Caracterização dos efeitos do MDMA 10,0 mg/kg sobre os níveis séricos de corticosterona medidos 6 e 12 horas após a administração.....	101
6.8	Experimento 8: Caracterização dos efeitos da administração de MDMA (5,0 e 10,0 mg/kg) sobre o número de leucócitos, eritrócitos e hematócrito de camundongos.....	102
6.9	Experimento 9: Caracterização dos efeitos do MDMA 10,0 mg/kg sobre o número total de leucócitos no lavado broncoalveolar (LBA), na medula óssea e no sangue periférico de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados.....	104
6.10	Experimento 10: Caracterização dos efeitos do MDMA 10mg/kg após o tratamento com Mifepristona (RU-486) sobre o número total de leucócitos no lavado broncoalveolar, na medula óssea e no sangue periférico de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados.....	114
6.11	Experimento 11: Caracterização dos efeitos do MDMA- <i>ecstasy</i> 10mg/kg na quantificação da produção de interleucinas IL-4, IL5 e IL-10 em explante pulmonar de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados.....	123
6.12	Experimento 12: Caracterização dos efeitos do MDMA- <i>ecstasy</i> 10mg/kg sobre a expressão de molécula de adesão – selectina - (L e E) em leucócitos presentes no sangue e lavado broncoalveolar de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados.....	126
6.13	Experimento 13: Caracterização dos efeitos do MDMA- <i>ecstasy</i> 10mg/kg sobre a reatividade das vias aéreas <i>in vitro</i> de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados.....	132
6.14	Experimento 14: Caracterização dos efeitos do MDMA- <i>ecstasy</i> 10mg/kg sobre a desgranulação de mastócitos em brônquio intrapulmonar de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados.....	136
7	DISCUSSÃO	140
6	CONCLUSÃO	163
	REFERÊNCIAS	166

1 INTRODUÇÃO

Neuroimunomodulação ou Psiconeuroimunologia é o ramo da ciência que estuda o relacionamento direto e bidirecional do Sistema Nervoso com os vários componentes do Sistema Imunológico (COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010). Na compreensão das múltiplas conexões entre estes dois sistemas, diferentes abordagens experimentais têm sido relevantes para estabelecer, criteriosamente, as vias neuroanatômicas, neuroquímicas e neuroendócrinas envolvidas com essa relação bidirecional. Evidências experimentais advindas de estudos “*in vitro*” e “*in vivo*” têm reportado que estados emocionais, como o estresse e a ansiedade (ALVES; VISMARI; PALERMO-NETO., 2007; MORGULIS et al., 2004; PALERMO-NETO et al., 2008; SA-ROCHA et al., 2006); bem como substâncias químicas de ação central, como por exemplo os benzodiazepínicos (DE PAULA, 2009; LAZZARINI et al., 2003; LAZZARINI et al., 2010; SAKAI et al., 2006; SAKAI et al., 2010) os psicoestimulantes (LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2004; LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2008;) e a picrotoxina (STANKEVICIUS et al., 2008) interferem na atividade do sistema imunológico de animais de laboratório. Neste sentido, as drogas de abuso detêm a capacidade de alterar diversos aspectos da função do sistema imunológico, atuando diretamente em células ou órgãos imunes e/ou indiretamente por meio de vias neuroimunes, influenciando o início, o curso e o tratamento de doenças severas, em especial, da asma (LIGEIRO DE OLIVEIRA, 2008; RIETVELD; EVERAERD; CREER, 2000).

O 3-4, metilenodioximetanfetamina (MDMA) ou *ecstasy* é uma substância sintética derivada da família das anfetaminas de uso recreacional que vem se destacando, nos dias de hoje, por ser utilizada em situações sociais pela população jovem que alega observar, após seu uso, um aumento da auto-estima, da simpatia e da empatia, com sensação de maior proximidade e intimidade com pessoas ao redor (CAPELA et al., 2009; GREER; TOLBERT, 1986; NICHOLS, 1986).

Em matéria divulgada recentemente pela mídia informou-se que o Relatório Mundial sobre Drogas da ONU em 2009 apontava um crescimento no consumo do *ecstasy* no mundo entre os jovens das áreas urbanas. O aumento no consumo de *ecstasy* em nosso país pode ser inferido também pelas apreensões da Polícia Federal; em 2007 aproximadamente 211 mil unidades foram interceptadas pelas autoridades; um aumento de 199.352 comprimidos, em relação aos anos de 2005 e 2006, fazendo com que o Brasil entrasse na lista dos 22 países com

maiores apreensões de substâncias desde grupo. Em 2008, a Polícia Federal (PF) brasileira desmantelou o primeiro laboratório clandestino de *ecstasy* do país. Uma publicação na revista *Veja* (31 de janeiro de 2007) apontava os jovens de classe média como “o principal motor do crescente tráfico da bala”. Este fato, que continua em ascensão concorda com os dados do atual relatório da ONU que relata a prisão, em fevereiro de 2009, de 55 jovens de classe média brasileira integrantes de uma quadrilha internacional de drogas que levavam cocaína da América do Sul para a Europa e aproveitavam para, na volta, trazer *ecstasy* a ser vendido no Brasil.

Estudos mostraram que o MDMA é um potente liberador de neurotransmissores no Sistema Nervoso Central (SNC) como por exemplo, de serotonina e de dopamina (KOCH; GALLOWAY, 1997; CALLAWAY; WING; GEYER, 1990). Estas ações neuroquímicas resultam em propriedades psicoestimulantes em animais e humanos (COLE; SUMNALL, 2003; LIECHTI; VOLLENWEIDER, 2001). Em adição a estas propriedades estimulantes do *ecstasy* observaram-se, também, hipertermia e efeitos simpatomiméticos agudos, caracterizados por aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial, aumento transitório dos níveis de ansiedade, ativação do eixo hipotálamo hipófise adrenal (GREEN et al., 2003; JAEHNE; SALEM; IRVINE, 2008) e alterações imunológicas (CONNOR, 2004; DE PAULA, 2009). Por outro lado, é relevante ressaltar que o uso do MDMA pode levar a efeitos neurotóxicos a longo prazo, em especial em neurônios serotoninérgicos centrais (STONE et al., 1986; STONE et al., 1987). Estas alterações podem resultar em um fator predisponente tanto de distúrbios psicológicos como de doenças psiquiátricas (HEGADOREN; BAKER; BOURIN, 1999; HARKIN et al., 2003) e de alterações na imunidade inata e adaptativa (CONNOR, 2004).

Por outro lado, a despeito de todo conhecimento que se tem alcançado das interações entre os Sistemas Nervoso e Imunológico, e do envolvimento do *ecstasy* com a atividade do Sistema Nervoso Central e com a imunidade desconhecemos qualquer abordagem científica desta relação que tenha sido feita em modelo murino de asma. Neste sentido, escolheu-se trabalhar com a resposta inflamatória pulmonar desencadeada pelo desafio antigênico, em camundongos previamente sensibilizados, por ser este método importante ferramenta para os estudos dos mecanismos desencadeadores da asma (WEERSINK et al., 1994) e por reproduzir em camundongos uma inflamação alérgica pulmonar (foco neuroimunológico deste trabalho) reprodutível, semelhante àquela que se observa na asma humana (GLEICH; KITA, 1997).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Neuroimunomodulação

As relações bidirecionais do Sistema Nervoso Central (SNC) com os vários componentes do Sistema Imunológico (SI) tornam-se cada vez mais relevantes e despertam grande interesse na comunidade científica. Desde a antiguidade observa-se a integração existente entre corpo-mente. Aristóteles, já afirmava que a “psique” (alma) e o corpo reagiam complementarmente um com outro; para ele, uma mudança no estado da psique produzia uma mudança na estrutura do corpo e, inversamente, uma mudança na estrutura do corpo produzia uma mudança na estrutura da psique. Apesar dos inúmeros relatos da existência das relações entre o SNC e o SI, apenas nos dias de hoje tem sido possível o entendimento das bases biológicas dessas interações.

Em estudo realizado em 1936 mostrou-se ser o Sistema Nervoso Central (SNC), pela mediação que exerce sobre as funções neurovegetativas frente a um estímulo estressor, capaz de influenciar a resposta do Sistema Imunológico. Nesta ocasião, Hans Selye mostrou que o estresse causava alterações no tamanho do timo, do baço e dos linfonodos (SELYE, 1998). Foi, no entanto, no final da década de 1950, que experimentos realizados com animais mostraram, de forma mais clara, que o estresse afetava 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 avaliados na vida adulta (FESSEL; SOLOMOM, 1960).

Em 1977 publicou-se o primeiro trabalho mostrando, de forma inequívoca, que uma situação de estresse de natureza psicológica produzia alterações da função imune, fato que ocorria de maneira independente de hormônios (BARTROP et al., 1977). De fato, Bartrop e colaboradores observaram que pessoas em luto pela perda do companheiro apresentavam diminuição da proliferação de células T, independentemente de alteração dos níveis de glicocorticóides (BARTROP et al., 1977). Nesse sentido, demonstrou-se a existência de uma correlação antigênica entre timócitos, linfócitos B e vesículas sinápticas do cérebro de ratos (JANKOVIC et al., 1979). Uma reflexão sobre esta função mostra que há uma razão bioquímica

lógica para a ocorrência de interações entre os Sistemas Nervoso e Imune. De fato, 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, 1989, 1994, 2005) e citocinas sendo produzidas no SNC (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996). Estas observações reforçam a noção da existência de comunicações e relacionamento bidirecional entre os sistemas neuroendócrino e imune (MADDEN et al., 1995).

Modelos que envolvem lesões de estruturas específicas do SNC e a análise das alterações ocasionadas por estas em parâmetros ligados à atividade do sistema imune têm sido, também, utilizados para o estudo destas relações. Ratos com lesões no *locus ceruleus* apresentaram uma menor produção de anticorpos contra BSA (albumina sérica bovina), uma redução no tamanho do timo e uma redução da população de linfócitos CD4⁺ no sangue periférico (NIKOLIC; JOVANOVA-NESIC; JANKOVIC, 1993). Na mesma direção, observou-se que lesões eletrolíticas no hipotálamo e em outras áreas do sistema límbico resultaram em mudanças na arquitetura do tecido linfóide (IZAKOVIC, LUKAC; 1973), diminuição de reações anafiláticas (LUPARELLO; STEIN; PARK, 1964) e diminuição das respostas humorais a antígenos protéicos (JANKOVIC; IZACOVIC, 1973). Por outro lado, alterações psicológicas induzidas por estímulos estressores que favorecem quadros de ansiedade e depressão, também podem interferir com a imunidade. De fato, em nossos laboratórios, verificou-se que animais ansiosos e/ou deprimidos, por estimulação aversiva, apresentaram alterações na imunidade (PALERMO-NETO; MASSOCO; SOUZA, 2003). Também foram demonstradas alterações no comportamento e na imunidade de camundongos cujas mães receberam um estresse pré-natal (FONSECA; PALERMO-NETO, 2002, 2005); mostrou-se também, que o estresse reduziu a atividade de células Natural Killer (NK), a atividade de macrófagos e de neutrófilos, a proliferação de linfócitos T e B, alterações estas associadas a uma redução da resistência a infecções e a neoplasias nos animais de laboratório (ALVES et al., 2007; MORGULIS et al., 2004; PALERMO-NETO et al., 2008; QUEIROZ et al., 2008; SA-ROCHA et al., 2006). Especificamente, observou-se que animais submetidos a um estresse físico ou psicológico apresentavam elevados níveis de corticosterona, diminuição da atividade de macrófagos peritoneais e aumento do crescimento do tumor ascítico de Ehrlich (PALERMO-NETO; MASSOCO; SOUZA, 2003; PALERMO-NETO et al., 2008, COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010). Queiroz et al. (2008), observaram que o estresse físico e psicológico induziu uma

mielosupressão e uma piora no desenvolvimento de um processo infeccioso experimental induzido por *Listeria monocytogenes*. No mesmo sentido, camundongos machos submissos apresentavam elevados níveis de ansiedade, reduzida atividade de células NK e aumento das metástases pulmonares induzidas pelo implante de um melanoma, B16/F10, quando comparados com os animais dominantes (SA-ROCHA et al., 2006). Em outro estudo, observou-se que animais estressados por conviverem com companheiros doentes apresentaram um aumento no turnover de noradrenalina hipotalâmica, reduzida atividade de macrófagos e aumento do crescimento do tumor ascítico de Ehrlich (ALVES et al., 2006; ALVES et al., 2007); estes animais mostraram ainda, um déficit na maturação de células dendríticas e no desenvolvimento de uma hipersensibilidade do tipo tardio induzida por ovalbumina (TOMIYOSHI et al., 2009).

É relevante ressaltar que os corticosteróides e as catecolaminas são capazes de alterar o padrão de citocinas Th1/Th2 com um direcionamento para o perfil de Th2. De fato, alguns estressores podem induzir uma supressão de citocinas de perfil Th1 ou aumento da síntese das citocinas de perfil Th2 (SALICRÚ; SAMS; MARSHALL, 2007). Em nossos laboratórios, Portela, et al. (2002) mostraram que ratos estressados e imunizados com ovoalbumina apresentaram edema pulmonar mais intenso e um aumento no número de células do lavado broncoalveolar. Neste sentido, o SNC regula a atividade do SI por meio de dois mecanismos, a saber: 1- resposta hormonal com produção de glicocorticóides e 2- resposta do Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNAS) via liberação de catecolaminas (SANDERS, 2006). No mesmo sentido, têm sido descritas outras moléculas importantes nas relações entre o SNC e SI, tais como a melatonina, opióides endógenos, dopamina e neuropeptídeos (COUTO-MORAES et al., 2009; FONSECA et al., 2005; HERBERTH et al., 2008).

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; COSTA-PINTO et al., 2005). De fato, estes autores mostraram a existência 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. Basso, et al. (2003), em nossos laboratórios, mostraram que uma reação alérgica intestinal era capaz de alterar tanto o comportamento de animais como a atividade de células do núcleo ventromedial do hipotálamo e da região baso-lateral da amígdala de maneira dependente nos níveis circulantes de IgE. Mostraram, também, que as fibras nervosas do tipo C desempenhavam um importante papel nos

mecanismos ligados a esta motivação neuroimune (BASSO et al., 2004). No mesmo sentido, Costa-Pinto, Basso e Russo (2007), demonstraram que a repercussão da asma alérgica murina, na atividade do SNC e no comportamento são dependentes de IgE, fato mediado por desgranulação de mastócitos e independente da presença de infiltrado inflamatório pulmonar.

Na mesma direção, Besedovsky (1981) já havia observado que o sobrenadante de células imunes ativadas com concavalina “A” eram capazes de induzir um aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona em ratos, fato explicado por ele, como sendo devido à ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). Mostrou, também, que a ativação do eixo HHA relatada para o tratamento de animais 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 (BESEDOVSKY, 1981).

Neste sentido, a injeção de interleucina-1 (IL-1), substância liberada por macrófagos ativados, também é capaz de ativar o eixo HHA, promovendo um aumento dos níveis plasmáticos de ACTH, e de corticosterona (BESEDOVSKY et al., 1986; DUNN, 2006). Mostrou-se que IL-1 ativa o eixo HHA 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). Sugere-se que esse circuito tenha um relevante papel no controle de reações inflamatórias exacerbadas e expansão inespecífica de células imune (BESEDOVSKY; DEL REY, 2000; BOTTASSO et al., 2009; BOTTASSO; MORALES-MONTOR, 2009; DEL REY; BESEDOVSKY, 2000; DUNN, 2006; ROGGERO, 2009).

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 (GRAEFF, 1989). A ativação do HHA 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,

sugerindo este achado presença de estresse e/ou ansiedade (SPADARO; DUNN, 1990). Neste mesmo contexto, sabe-se que a administração periférica de lipopolissacarídeo de *Echerichia Coli* (LPS) ou de interleucinas (IL-1) podem produzir o chamado comportamento doentio (febre, perda de apetite, diminuição da interação social e da atividade exploratória) (KELLEY et al., 2003); no entanto, é relevante ressaltar que a expressão do comportamento doentio induzido por LPS pode ser dependente de fatores individuais (idade e ranking social, por exemplo) (COHN; SA-ROCHA, 2006; GODBOUT et al., 2008; KINOSHITA et al., 2009).

Os dados da literatura levantam, assim, sólidas evidências comportamentais e bioquímicas, que suportam a hipótese de haver uma comunicação direta e bidirecional entre os sistemas nervoso, endócrino e imunológico (COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010). Desta forma, não é difícil de se supor que substâncias que atuem no Sistema Nervoso Central tenham a capacidade de influenciar as respostas imunes. Sabe-se que alguns fármacos ou drogas psicoestimulantes também são capazes de ativar o eixo HHA ou até mesmo de atuar como estressores químicos e, conseqüentemente, interferir com a imunidade de animais de laboratório (COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010) e até mesmo do ser humano (ROGERS et al., 2009). Neste sentido, fármacos com ação no SNC carregam potencial para modificar a imunidade por alterar principalmente, mas não exclusivamente, as atividades do eixo HHA e/ou do sistema nervoso autônomo simpático (ABBUD; PALERMO-NETO, 2003; ALVES et al., 2006; DE PAULA et al., 2009; LAZZARINI; PALERMO-NETO, 2003; LAZZARINI et al., 2010; LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2004; LIGEIRO DE OLIVEIRA, 2008; QUINTEIRO-FILHO, RIGHI, PALERMO-NETO, 2009; SAKAI et al., 2006a; STANKEVICIUS et al., 2008), como também, por agir diretamente em células imunes (MASSOCO; PALERMO-NETO, 2003; SILVA et al., 2003; LAZZARINI et al., 2006; RIBEIRO et al., 2010).

2.2 MDMA- *Ecstasy*

A anfetamina e seu isômero dextrógiro ativo, dextro-anfetamina, juntamente com a metanfetamina e o metilfenidato, formam um grupo de fármacos com propriedade farmacológicas, muito semelhantes que incluem as também chamadas “drogas de rua”, como a metilenodioximetanfetamina (MDMA ou *ecstasy*) (FORENSIC SCIENCE SERVICE, 2008a). O *ecstasy* é produzido sinteticamente a partir da metanfetamina sendo comercializado em forma de comprimidos que têm morfologia e conteúdo químico variado. Dada sua ilegalidade, os

comprimidos e cápsulas de MDMA são fabricados sem controle e supervisão farmacêutica. Sendo assim, nem todos os comprimidos e cápsulas vendidos e consumidos como *ecstasy* necessariamente contém o MDMA ou a mesma quantidade da droga (ELK, 1996). De fato, trabalhos da literatura reportaram a presença de outras substâncias associadas aos comprimidos de *ecstasy* tais como, a cafeína, efedrina, paracetamol, cetamina, quetamina e compostos análogos como a metilenodioxianfetamina (MDA), metilenodioxietilamfetamina (MDEA), metanfetamina e amfetamina (EL-MALLAKH; ABRAHAM, 2007).

Inicialmente desenvolvida como um controlador de apetite em 1914 pela Merck Farmacêutica, a 3,4-metilenodioxianfetamina (MDMA), tornou-se popular na década de 80 como droga de uso recreacional, alegando-se ser ela capaz de produzir uma elevação da auto-estima, de simpatia e de empatia, causando talvez por isso, uma sensação de proximidade e intimidade dos usuários com as pessoas ao redor (GREER; TOLBERT, 1986; CHECK, 2004; NICHOLS, 1986; YACOUBIAN; PETERS, 2007).

Em 1976 o MDMA tornou-se formalmente conhecido na comunidade científica através da publicação de Nichols e Shulgin, que sugeriram ser o mesmo detentor de propriedades farmacológicas que poderiam auxiliar alguns tipos de tratamentos psicoterapêuticos (JOHANSEN; KREBS, 2009; PARROTT, 2007). Assim, o *ecstasy* chegou a ser utilizado como favorecedor da aliança terapêutica com o profissional, na medida que aumentava a empatia e a confiança dos pacientes com o terapeuta, fato acompanhado de autoconfiança destes pacientes (BOUSSO et al., 2008; PENTNEY, 2001). A partir daí, este fármaco foi postulado como a mais nova classe de compostos capazes de engendrar sensações agradáveis que envolvem redução da ansiedade, aumento de comunicação e diminuição dos mecanismos defensivos (BOUSSO et al., 2008; COLE; SUMNALL, 2003a).

A alta popularidade que ganhou a partir desta época, vinculada ao potencial neurotóxico do análogo MDA (metilenodioxianfetamina), fez com que a fase de uso legal do êxtase tivesse um fim. De fato, em 1985 a agência de controle de drogas (*Drug Enforcement Administration*) dos Estados Unidos, enquadrou o MDMA, como substância controlada de nível 1 - a saber: a) droga com alto potencial de abuso; b) sem benefício terapêutico/médico; e c) cujo uso é inseguro mesmo sob supervisão médica (MCCLAIN; SAPIENZA, 1989).

O MDMA é metabolizado pelo fígado. Especificamente, é N-demetilado pela enzima citocromo (CYP450)2D6 em 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) (MAURER et al., 2000) e O-demetilado em 3,4-dihidroximetanfetamina sendo novamente O-metilado para 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA) (EASTON et al., 2003). Segundo, De La Torre e Farre, (2004) a toxicidade aguda, e em especial, a neurotoxicidade induzida pelo MDMA diferem entre as espécies animais por depender da disponibilidade dos metabólitos desta droga, como também, dos parâmetros cinéticos das enzimas que regulam suas formações. Neste sentido, estudos em camundongos mostraram que o MDMA é a principal espécie química encontrada no plasma e no cérebro dos animais. Embora, o MDMA tenha sido observado em ratos e humanos após sua administração, estão também presentes e em altas concentrações no plasma destas espécies, os metabólitos HHMA e HMMA, que são produzidos em diferentes proporções.

As drogas psicotrópicas podem ser classificadas de acordo com o efeito provocado no SNC em estimulantes, depressoras e alucinógenas (DE ALMEIDA; SILVA, 2003, 2005). O MDMA possui classificação dupla com propriedades ora estimulantes, ora alucinógenas, sendo por vezes classificado como uma anfetamina alucinógena (JOHANSEN; KREBS, 2009). Sabe-se, ser ele um potente liberador de neurotransmissores como serotonina e dopamina (BAUMANN et al., 2008; BRENNAN; SCHENK, 2006; KOCH; GALLOWAY, 1997), resultando em propriedades psicoestimulantes em animais e seres humanos (COLE; SUMNALL, 2003a; LIECHTI; VOLLENWEIDER, 2001). Neste contexto, estudos conduzidos com animais de laboratório mostraram que a administração de MDMA desencadeia uma resposta bifásica compreendida em efeitos de curto prazo (24 horas), associados à estimulação serotoninérgica e efeitos de longo prazo (após 24 horas), associados provavelmente a uma neurotoxicidade serotoninérgica (MCKENNA; PEROUTKA, 1990). Especificamente, mostrou-se que o MDMA atravessa a membrana pré-sináptica promovendo um efluxo de serotonina da vesícula para o citoplasma do neurônio, sendo esta rapidamente liberada para o meio extracelular pelos transportadores serotoninérgicos (HUETHER; ZHOU; RÜTHER, 1997). Segundo, McKenna e Peroutka (1990) a administração de MDMA provocou uma diminuição na atividade da enzima triptofano-hidroxilase. Assim, os autores mostraram que os altos níveis de serotonina liberada, associados aos bloqueios de sua recaptação e à desativação da triptofano-hidroxilase, resultavam no esgotamento intraneuronal de serotonina (5-HT). Baumann et al. (2008) observaram que ratos expostos a altas doses de MDMA exibiram uma tolerância temporária na liberação de serotonina e efeitos comportamentais estimulantes.

Em outras espécies animais incluindo-se aqui o homem, os efeitos de longo prazo associados ao uso do MDMA, também, foram caracterizados por reduções nos níveis cerebrais de serotonina, do seu metabólito 5-HIAA e da atividade da enzima triptofano-hidroxilase (GREEN et al., 2003; MCKENNA; PEROUTKA, 1990; RATTRAY, 1991; ROGERS et al., 2009). Neste sentido, diversos trabalhos mostraram que a serotonina capturada dentro dos terminais serotoninérgicos pelos transportadores de recaptura de serotonina (SERT), e subsequente deaminação pela monoamino oxidase-B (MAO-B) leva à formação de peróxido de hidrogênio, sendo esta, a maior responsável pela toxicidade observada no sistema serotoninérgico (COLADO et al., 1997; ESTEBAN et al., 2001; SHANKARAN; YAMAMOTO; GUDELSKY, 2001).

Também já foi relatado um efeito do MDMA sobre a liberação de dopamina em sinapses dopaminérgicas. Huether, Zhou e Rüther (1997b), mostraram que o MDMA atravessa a membrana pré-sináptica promovendo a liberação de dopamina semelhante ao que faz com a serotonina. Segundo os autores, a ativação dos receptores 5-HT_{2A}, através da liberação de 5-HT, facilita a liberação de dopamina (DA) induzida pelo MDMA. Halladay et al. (2003), mostraram, que a administração prolongada de metanfetamina em camundongos Balb/C induziu liberação de dopamina produzindo hipertermia, agressividade, indução de interleucina - 1 β (IZCO et al., 2007).

A literatura têm mostrado que células do sistema imunológico, também, apresentam receptores para serotonina e dopamina, (GORDON; BARNES, 2003; MOSSNER; LESCH, 1998), assim é possível acreditar que o MDMA possa interagir com sítios presentes em células imunes alterando sua atividade funcional. De fato, alguns estudos mostraram que a serotonina interage com células imunes suprimindo a atividade destas células, conferindo a este neurotransmissor propriedade imunomodulatória (KUT et al., 1992; JONES et al., 2005). Hrometz et al. (2004) mostraram que o tratamento com dopamina (0,1 mM) em cultura de células de coriocarcinoma humano expostos ao MDMA (1,2 mM) por 6 horas, aumentou em 420% a produção de peróxido de hidrogênio em relação à produção basal e diminuiu a viabilidade celular em até 30 %. Ainda neste trabalho, os autores mostraram que as células tratadas apenas com dopamina aumentaram a produção de peróxido de hidrogênio em 84% acima da liberação basal e não apresentaram diminuição significativa da viabilidade celular.

A exposição de animais ao MDMA e seus análogos pode ativar o eixo HHA (CONNOR, 2004) e, conseqüentemente alterar por via indireta a atividade imunológica (DE PAULA et al., 2009; CONNOR et al., 2004; LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2004; LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2008). Estudos que registraram alterações de comportamento e/ou alterações endócrinas concomitantes com alterações de parâmetros relacionados à atividade do sistema imune após o tratamento *in vivo* com anfetamina fortalecem essa visão. Assim, por exemplo, já foi observado que o tratamento agudo ou prolongado com anfetamina, além de aumentar a locomoção de ratos no campo aberto, diminui a proliferação de células T induzidas por concanavalina A (KUBERA et al., 2002). Neste sentido, diversos estudos conduzidos com animais de laboratório e com seres humanos, tem revelado que o uso de MDMA produz imunossupressão (CONNOR et al., 2004; PACIFICI et al., 2002). De fato, Connor et al. 2004 mostraram que administração a de 10 mg/kg de MDMA diminuiu o *burst* oxidativo de neutrófilos em resposta à fagocitose do zimozan opsonizado. Em publicação anterior, Connor et al. 1998, mostraram que administração de 20mg/kg de MDMA produziu uma rápida redução na proliferação de linfócitos e uma redução número total de leucócitos circulantes em ratos inoculados com concanavalina A. Mostrou-se também, ser o MDMA capaz de suprimir o *burst* oxidativo de neutrófilos e de inibir a produção de TNF- α e IL-1 por macrófagos estimulados *in vitro* e *in vivo* com LPS (CONNOR et al., 2000). Em nossos laboratórios, De Paula et al. (2009) observaram que camundongos tratados com MDMA (10 mg/kg) apresentaram um aumento do “turnover” de noradrenalina hipotalâmica, dos níveis séricos de corticosterona, diminuição no burst oxidativo de neutrófilos circulantes e diminuição da porcentagem e intensidade de fagocitose destas células. Ainda neste estudo, os autores observaram que a administração de 10 mg/kg da droga alterou a distribuição de leucócitos no sangue, medula e baço (De PAULA et al., 2009).

Além de alterar parâmetros relacionados à resposta imune inata, o MDMA também modificou aqueles ligados à resposta imune adaptativa. Assim, já se observou ser o MDMA capaz de provocar diminuição do número de células T CD4+ circulantes, de inibir a proliferação de linfócitos T induzida por mitógenos e de suprimir a produção de citocinas do padrão Th1 (CONNOR, 2004). De fato, em ratos imunizados com *Keyhole limpet hemocyanin* (KLH), o tratamento *in vivo* com 10 mg/Kg de MDMA, apesar de não alterar a produção de IgM específica para o antígeno, modificou a capacidade das células produtoras de anticorpos de realizarem o *switch* para a produção de IgG2a (padrão Th1), o que resultou em uma redução nos níveis deste anticorpo (CONNOR; CONNELLY; KELLY, 2001). Este efeito foi interpretado como

relacionado à observada supressão da produção de INF- γ por células do baço estimuladas por KLH (CONNOR; CONNELLY; KELLY, 2001).

O MDMA induz uma variedade de efeitos comportamentais em animais de laboratório, incluindo-se aqui hipertermia e hiperatividade locomotora (FLETCHER et al., 2002; MORLEY; ARNOLD; MCGREGOR, 2005), prejuízo da memória (BRAIDA et al., 2002; O'SHEA et al., 2005), preferência por lugares condicionados e diminuição do limiar de compensação da estimulação elétrica do cérebro (HUBNER et al., 1988; MARONA-LEWICKA et al., 1996). A estimulação de receptores 5HT₂ mostrou-se crucial para o aparecimento destes efeitos (DOLY et al., 2009; FANTEGROSSI et al., 2002). Estudos mais recentes indicam que a análise dos subtipos de receptores de 5HT parece contribuir para o entendimento dos efeitos comportamentais do MDMA. Os 5HT₂ e 5HT_{1B/1D} possuiriam papel facilitador, mediando os efeitos estimulantes do MDMA e os receptores 5HT_{2C} seriam inibitórios (FLETCHER et al., 2002). Neste sentido, mudanças comportamentais estariam associadas às alterações na densidade regional de transportadores de serotonina (SERT), 5HT_{2A/2C}, e receptores 5-HT_{1B} (MCGREGOR et al., 2003).

McGregor et al. (2003), mostraram que ratos tratados com altas doses de MDMA exibiram aumento nos índices de ansiedade associados a perda significativa de 5-hidroxitriptamina (5-HT) e 5-HIAA na amígdala, hipocampo, estriado e córtex, e também, um aumento na densidade do receptor 5HT_{1B} em várias regiões cerebrais. Por outro lado, baixas doses de MDMA diminuíram a densidade deste receptor. Os autores sugeriram que exposições breves a baixas doses de MDMA podem produzir mudanças significativas e em curto prazo na densidade e transporte do receptor 5-HT, associados a comportamento emocional. Neste sentido, Fone et al. (2002) observaram que o MDMA diminuiu a interação social de ratos, e não produziu depleção significativa dos níveis de 5-HT no cérebro dos mesmos. Estes dados sugeriram os que o MDMA tenha produzido, após longo período de uso, efeitos comportamentais e emocionais que não estariam, necessariamente, associados à perda de níveis de 5-HT (GREEN; MCGREGOR, 2002).

Por tudo quanto exposto, fica evidente que os estudos animais que têm examinado os efeitos agudos do MDMA na ansiedade não são claros. De fato, embora tenha sido descrito, uma ação ansiogênica do MDMA em diferentes modelos animais de ansiedade (HO et al., 2004; LIN et al., 1999; MORLEY; MCGREGOR, 2000; SUMNALL et al., 2004; WINSLOW; INSEL,

1990) existem evidências substâncias suportando efeitos ansiolíticos para esta droga (GURTMAN et al., 2002; NAVARRO; MALDONADO, 2002). Entretanto, metodologias farmacológicas diferentes usadas para analisar os efeitos ansiogênicos e ansiolíticos do MDMA sugerem que as diferenças relatadas tenham como uma das causas a natureza dose dependente dos efeitos medidos (COLE; SUMNALL, 2003; DAZA-LOSADA; 2009). Neste contexto, vale lembrar que a expressão de c-fos pode ser utilizada como um marcador para análise de mudanças de estimulações induzidas e de atividade metabólica de neurônios; permite, assim, abordagens integradas entre alterações comportamentais, sistemas de neurotransmissores em regiões cerebrais específicas e ações de drogas psicoativas (HARLAN; GARCIA, 1998; STEPHENSON et al., 1999), contribuindo para um melhor entendimento destas relações.

Sabe-se que a amígdala exerce um papel relevante na regulação da ansiedade. De fato, a ativação da amígdala resulta em respostas comportamentais e fisiológicas associadas com ansiedade (FARIA et al., 2006; KILLCROSS et al., 1997; MORLEY; ARNOLD; MCGREGOR, 2005; SAJDYK; SHEKHAR, 2000); a expressão de c-fos em neurônios específicos ocorre freqüentemente mostrando uma recente ativação permitindo gerar um mapa celular *in vivo* para o estímulo dado (CURRAN; MORGAN, 1985). Neste mesmo sentido, Navarro et al. (2004) avaliaram mudanças dos níveis de ansiedade através de um teste de interação social e da expressão de c-fos na amígdala de camundongos após uso de MDMA. Especificamente, os autores verificaram uma diminuição no tempo e na duração despendida na investigação social associados com um aumento significativo na expressão de c-fos, suportando os achados um efeito ansiogênico para o *ecstasy*. Estes dados corroboram com outros estudos, que descreveram um efeito ansiogênico para o MDMA utilizando métodos diferentes para avaliar os níveis de ansiedade dos animais, como por exemplo, a caixa de claro e escuro (MALDONADO; NAVARRO, 2002), testes de emergência e labirinto em cruz elevado (MORLEY; MCGREGOR, 2000; GURTMAN et al., 2002). Neste sentido, outros estudos mostraram que ratos pré-tratados com MDMA, tendem a apresentar uma diminuição da freqüência de levantar, da locomoção total e da exploração em um campo aberto (GURTMAN et al., 2002; MORLEY et al., 2001; MCGREGOR et al., 2003); o MDMA, também alterou a função cardiovascular (BADON et al., 2002; BLESSING; SEAMAN, 2003; BEXIS; DOCHERTY, 2006; JAENE; SALEM; IRVINE, 2008; OOTSUKA; NALIVAICO; BLESSING, 2004) e as respostas neuroquímicas ao estresse (BAUMANN et al., 2008; DE PAULA et al., 2009; MATUSZEWICH et al., 2002).

2.3 Asma

Em grego, a palavra asma significa “peito comprimido” (CHAN; IRVIN, 1995). Assim sendo, é fácil perceber a relação da doença com as origens do termo: uma alusão à dificuldade de respiração. Neste sentido, a importância desse comprometimento do sistema respiratório já havia sido evidenciada quando, em 1959, a fundação CIBA definiu asma como “amplo estreitamento brônquico cuja severidade pode ser revertida em curto período de tempo, seja por tratamento, seja espontaneamente” (CIBA FOUNDATION GUEST SYMPOSIUM, 1991).

Deste modo, verifica-se que há muito tempo vêm se fazendo estudos sobre a asma ou indivíduos asmáticos, ou ainda, de reatividade brônquica (ou hiperreatividade), a diversos estímulos. Por conta disso, em 1962 a hiperreatividade brônquica foi considerada como critério para o diagnóstico da asma, por uma das principais entidades norte americanas envolvidas com esse assunto (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 1962). Desde então, a asma tem sido considerada uma doença caracterizada pela presença de hiperreatividade das vias aéreas, que leva a broncoespasmos episódicos e reversíveis em decorrência do aumento da responsividade da árvore traqueobrônquica a vários estímulos (BARNES, 1992; BATEMAN et al., 2008, VAN BEVER, 2009).

Em 1997, o National Institutes of Health (NIH) dos EEUU, em seu *NIH 1997 Guidelines for Diagnosis and Management os Asthma* definiu a asma como sendo uma “doença inflamatória crônica das vias aéreas, caracterizada por broncospasmo, aumento do número de células inflamatórias no espaço aéreo (mastócitos, eosinófilos, linfócitos T, macrófagos, neutrófilos e células epiteliais) (BATEMAN et al., 2008). Neste documento, foram incluídas, ainda, informações do *National Heart Lung and Blood Institute*, de 1995, as quais dão conta de que “em indivíduos susceptíveis, esta inflamação causa episódios recorrentes de chiados, dificuldades respiratória e tosse, os quais estão associados à obstrução das vias aéreas” (GLOBAL STRATEGY FOR ASTHMA MANAGEMENT AND PREVENTION, 2008; BRITISH GUIDELINE ON THE MANAGEMENT OF ASTHMA, 2008).

Do ponto de vista epidemiológico, a prevalência da asma está aumentando tanto nos países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento, afetando pessoas de todas as idades, raças e grupos étnicos. As estimativas do *Global Initiative for Asthma* da Organização Mundial da Saúde (OMS) são de que esta enfermidade atinge na atualidade aproximadamente 300

milhões de pessoas no mundo. Com a projeção de que a proporção da população mundial urbana passará de 45% para 59% até 2025, estima-se que mais 100 milhões de pessoas serão asmáticas até aquela data (BAHADORI et al., 2009; GLOBAL STRATEGY FOR ASTHMA MANAGEMENT AND PREVENTION, 2008; MASOLI et al., 2004). Além do mais, a asma representa um relevante papel nas estatísticas de mortalidade e morbidade (BOUSQUET et al., 1994; CARLSEN, 1998; GUPTA, et al., 2006). De fato, Segundo estimativas da OMS, a asma provoca a perda de 15 milhões de *disability-adjusted life years* (anos de incapacitação ajustados pela idade), que representa a soma dos anos de vida perdidos por morte prematura ou por incapacitação; em especial, cerca de 250 mil mortes têm sido relatadas como ligadas à asma anualmente em todo o mundo (MASOLI et al., 2004; CAMPOS; LEMOS, 2009). No Brasil a estimativa de prevalência da asma situa-se em torno de 20% (THE INTERNATIONAL STUDY OF ASTHMA AND ALLERGY IN CHILDHOOD - ISSAC, 1998; SOLÉ et al., 2001).

A asma é uma doença complexa e multimediada, com diversos fatores que contribuem para o seu desencadeamento ou para a exacerbação dos seus sintomas (TILLIE-LEBLOND et al., 2009). De fato, sabe-se que o aumento significativo das doenças alérgicas nos últimos anos pode estar relacionado ao aumento da exposição a alérgenos intra-domiciliares, exposição a agentes poluentes, contato com novos produtos químicos e o menor estímulo ao sistema imune pelo emprego de antimicrobianos na defesa contra infecções (BUCKLEY, 1988; GAFFIN; PHIPATANAKUL, 2009; GRUCHALLA et al., 2005; ULBRICH et al., 2003). Neste sentido, sugere-se que o desencadeamento da crise asmática após o contato com ácaros, polens, fungos, pêlos de animais, entre outros antígenos, esteja relacionado à existência de anticorpos para estas substâncias (ARBES et al., 2007; GAFFIN; PHIPATANAKUL, 2009; PLATTS-MILLS; LEUNG; SCHATZ, 2007). Não obstante, outros aspectos podem corroborar no desenvolvimento da asma tais como: a fumaça, o ar poluído e infecções virais (SIBBALD; ANDERSON; MCGUIGAN, 1992; VAN BEVER, 2009). De fato, Existe uma associação entre a presença de anticorpos e doenças alérgicas caracterizada pela produção de imunoglobulina E (IgE) (BUSSE, 2001; BUSSE et al., 2005; para revisão ver PEACHELL, 2005), onde indivíduos que possuem propensão para sintetizar quantidades elevadas de imunoglobulinas (Ig's) são relatados como sendo particularmente susceptíveis às alergias e à asma (BLANCHET; McNAGNY, 2009).

Na patogenia da asma, apesar de extremamente relacionadas, distinguem-se duas fases: uma precoce e uma tardia. No que concerne à fase precoce (também conhecida como fase aguda) destacam-se, pelo seu importante papel, os mastócitos, considerados as principais células

envolvidas nas reações de hipersensibilidade imediata. (BLANCHET; McNAGNY, 2009; MIADONNA et al., 1990, STIRLING; CHUNG, 2001). A ligação antígeno-IgE nos receptores promove a ativação da célula. A ativação dos mastócitos tem como consequência a liberação de aminas vasoativas (histamina e serotonina), eicosanóides, PAF, citocinas, óxido nítrico e outros produtos (MAESTRELLI, 2004; PEACHELL, 2005; MAYR, 2003). Dentre os principais efeitos decorrentes da liberação destes mediadores destacam-se a vasodilatação, o aumento do fluxo sanguíneo, da permeabilidade vascular, da produção e secreção de muco e da contração da musculatura lisa das vias aéreas; em casos mais severos, estes efeitos podem causar a morte por choque anafilático ou por falência respiratória (PAGE, 1992; SIRACUSA et al., 2004).

As reações de fase tardia da asma induzidas por alérgenos persistem por até 24 horas. Os grânulos de mastócitos contêm citocinas (TNF) e mediadores lipídicos (PAF e LTB₄) que podem causar aumento da expressão endotelial de moléculas de adesão como selectinas e integrinas. Desta forma, a desgranulação mastocitária pode levar a facilitação do “rolling” e da diapedese e promover a migração celular e a consequente inflamação pulmonar (AMMIT, 2005; HAMELMANN, 1999; HAMELMANN; SCHLEIMER, 2003; METCALFE; BARAM; MEKORI, 1997). O produto de secreção destas células agindo diretamente ou por meio de mecanismos neurais sobre as vias aéreas pode comprometer a atividade funcional pulmonar (FISH; PETERS, 1999; YAWN, 2008).

Os linfócitos T liberam citocinas implicadas com o recrutamento de células para o pulmão, bem como na ativação de mastócitos. Neste contexto, os linfócitos T *helper* 1 (Th1) produzem e liberam citocinas voltadas principalmente ao combate de fungos e bactérias, ao passo, que os linfócitos Th2 têm maior participação na inflamação alérgica (CORRY; KHERADMAND, 2009; NADEL; BUSSE, 1998; MUCIDA et al., 2003). Mosmann e Coffman (1989), descreveram sub-populações de linfócitos, discriminadas pela função e pelos tipos de citocinas liberadas. Desta forma, as principais citocinas liberadas por linfócitos Th2, as quais estão implicadas na inflamação alérgica pulmonar, são as interleucinas IL-3,-4,-5,-9,-13 e o INF- γ entre outras; as IL-3,-4 e -5 produzidas por Th2, podem atuar na migração e ativação de eosinófilos (AKDIS; AKDIS, 2009; BOCHNER; BUSSE, 2005; HOLGATE, 2004).

Os eosinófilos também estão fortemente ligados ao desencadeamento da asma, principalmente no que concerne à fase tardia desta patologia. Entre os fatores que ativam os eosinófilos destacam-se fator ativador de plaquetas (PAF), leucotrieno B₄ (LTB₄), fator

estimulador de colônia macrofágica-granulocítica (GM-CSF), fator de necrose tumoral (TNF), proteína inflamatória do macrófago 1 α (MIP-1 α), IL-3, IL4 e IL5 (COYLE, 1995). Uma vez migradas para o pulmão estas células têm capacidade de liberar agentes que apresentam elevada citotoxicidade, como a proteína básica principal (MBP), eosinófilo peroxidase (EPO) e proteína catiônica eosinofílica (ECP), os quais contribuem para a lesão epitelial e, conseqüentemente, para o desenvolvimento da hiperreatividade das vias aéreas (DURCAN et al., 2006; LAMPINEM et al., 2004; THOMAS; WARNER, 1996).

Os neutrófilos correspondem a outro tipo celular associado à inflamação pulmonar verificada na asma. Assim, em vários modelos experimentais de inflamação alérgica das vias aéreas verifica-se o relevante papel que eles têm no desenvolvimento da inflamação pulmonar (MONTESEIRIN et al., 2005; PAUWELS et al., 1990). Sabe-se que estas células também estão envolvidas na síntese e liberação de citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α) e, ainda, que modulam os efeitos de linfócitos T e B (LLOYD; OPPENHEIM, 1992; MONTESEIRIN et al., 2005).

Como já salientado, os corticosteróides e as catecolaminas liberados em conseqüência de um estímulo estressor são potentes imunomoduladores, sendo capazes de alterar o padrão de citocinas Th₁/Th₂ com um direcionamento para o perfil de Th₂ (SALICRÚ; SAMS; MARSHALL, 2007). Desta forma, na presença de um estresse, os indivíduos podem apresentar um padrão de resposta inflamatória que aumente a susceptibilidade dos mesmos a algumas doenças, como a asma e outras doenças alérgicas (MARSHALL; AGARWAL, 2000; CHEN; MULLER, 2007; CHEN et al., 2010). Em nossos laboratórios, Portela et al. (2002) observaram que ratos estressados e imunizados com ovoalbumina apresentaram maior edema pulmonar e um aumento no número de células do lavado broncoalveolar (PORTELA et al., 2007). Sabe-se que alguns fármacos ou drogas psicoestimulantes também são capazes de ativar o eixo HHA ou até mesmo de atuar como estressores químicos e, conseqüentemente, interferir com a imunidade de ratos e camundongos (DE PAULA et al., 2009; LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2008; SAKAI et al., 2006; STANKEVICIUS et al., 2008). Dados de literatura mostram que a ativação do eixo HHA durante o estresse altera tanto a capacidade funcional quanto o padrão migratório de células do sistema imunológico (ALVES et al., 2006; AZPIROZ et al., 2008; ENGLER et al., 2004).

Neste sentido, considerando-se as relações entre os Sistemas Nervoso e Imunológico buscamos entender dentro de uma perspectiva neuroimune os efeitos agudos do 3,4

metilenodioximetanfetamina - MDMA em modelo murino de asma experimental, mais especificamente sobre a resposta inflamatória pulmonar de camundongos sensibilizados com ovalbumina.

3 OBJETIVO

Investigar os efeitos da exposição ao 3,4-Metilenodioximetanfetamina (MDMA ou ecstasy) sobre a atividade do Sistema Nervoso Central e sobre a inflamação alérgica pulmonar estabelecendo relações neuroimunológicas.

3.1 Objetivos específicos

3.1.1 Caracterizar os efeitos comportamentais da administração do MDMA por meio de diferentes metodologias: campo aberto, labirinto em cruz elevado, Hole-board e caixa de exposição ao predado;

3.1.2 Caracterizar os efeitos bioquímicos da administração do MDMA através da medida: dos níveis de corticosterona e dos níveis e “turnover” hipotalâmicos e corticais de serotonina e dopamina;

3.1.3 Caracterizar os efeitos imunológicos da administração *in vivo* do MDMA através de estudos hematológicos, de celularidade do baço, pulmão e medula óssea;

3.1.4 Caracterizar os efeitos do bloqueio dos receptores de corticosterona sobre as respostas hematológicas, de celularidade do baço, pulmão e medula óssea de camundongos tratados com MDMA;

3.1.5 Caracterizar os efeitos da administração do MDMA na produção de interleucinas em explante pulmonar de camundongos;

3.1.6 Caracterizar os efeitos do MDMA sobre a expressão de molécula de adesão – selectina - (L e E) em leucócitos presentes no sangue periférico e no lavado broncoalveolar de camundongos.

3.1.7 Caracterizar os efeitos da administração de MDMA na reatividade das vias aéreas frente a um desafio com metacolina;

3.1.8 Caracterizar os efeitos do MDMA na desgranulação de mastócitos em brônquio intrapulmonar de camundongos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Balb/C, machos, com aproximadamente 4 a 8 semanas de idade. Os animais foram obtidos através de cruzamentos sucessivos, feitos no Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ – USP e permaneceram em gaiolas de moradia (caixas plásticas de polipropileno, medindo 41 x 34 x 16 cm); 5 camundongos foram alojados por caixa. A sala de alojamento das gaiolas de moradia permaneceu com umidade (65 a 70%) e temperatura ambiente (22°C – 26 °C) controladas por meio de aparelhos apropriados de ventilação, exaustão e refrigeração, em um ciclo de 12 horas de claro e escuro (luz ligada às 7 horas). Água e comida foram fornecidas aos animais “ad libitum” durante todo o procedimento experimental. Os animais foram utilizados de acordo com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório da FMVZ da USP e do Instituto de Ciências Biomédicas ICB-USP (protocolo de aprovação do Comitê de Ética – nº- 772/2005).

4.2 Fármacos

ECSTASY - Comprimidos fornecidos pela Polícia Federal do Estado de São Paulo obtidos através de apreensões – Departamento de Investigações sobre Narcóticos (DENARC).

MDMA – (**3,4-Metilenodioximetanfetamina**) Extraído e purificado do comprimido no Laboratório de Análises Toxicológicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF – USP), com grau de pureza de 99%.

MIFREPISTONA (RU 486) – (*Tocris Bioscience,® Ellisvill, MO, USA*) – antagonista do receptor de corticóide tipo II (GRII).

METISERGIDE - (*Sigma® St Louis, MO, USA*) – antagonista do receptor de serotonina do tipo II (5HT₂).

4.3 Corantes celulares

AZUL DE TRIPAN (*Merck,[®] Darmstadt, Germany*) a 0,1%. Utilizado para corar as células colhidas do lavado broncoalveolar, baço e medula óssea.

ROSENFELD (*Merck[®]*) - Utilizado para corar as células colhidas do sangue periférico para contagem diferencial de leucócitos.

4.4 Reagentes e soluções

PBS - SALINA TAMPONADA COM FOSFATO - SOLUÇÃO 10X CONCENTRADA.

- Na ₂ HPO ₄ 7 H ₂ O	(Fosfato Dissódico Hepta Hidratado)	26,79 g
- NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	(Fosfato Diácido de Sódio)	4,14 g
- NaCl	(Cloreto de Sódio)	82,00 g
- H ₂ O milli-Q		1.000 mL

No momento do uso esta solução foi 1:10 em H₂O Milli – Q mantendo-se um pH em torno 7,2 a 7,4.

PBS - SALINA TAMPONADA COM FOSFATO – SOLUÇÃO 1X - Solução 10X diluída para coleta do lavado broncoalveolar dos animais e para a técnica de citometria de fluxo.

HEPARINA - (Liquemine[®]- Roche, São Paulo, SP, Brasil) – anticoagulante utilizado nas coletas de amostras de sangue.

KIT DE ELISA PARA IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 – (*kits Duo Set – R & D System[®] Minneapolis, MN, USA*) – utilizado para quantificar citocinas em amostras de cultura de parênquima pulmonar.

ANTICORPOS CONJUGADOS COM FICOERITRINA (PE) anti-CD62 (anti-selectina) – (*BD[®] Biosciences, San Jose, CA, USA*) – utilizados para marcar as células provenientes do sangue e do lavado broncoalveolar dos animais.

OVOALBUMINA GRAU II - (Sigma®) – utilizada na imunização e desafio na técnica de hipersensibilidade do tipo tardio.

ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND (FCA) - (Sigma®) – utilizado na técnica de hipersensibilidade do tipo tardio.

KIT DE CORTICOSTERONA COAT-A-COUNT - (DPC® Los Angeles, CA, USA) – kit de radioimunoensaio para a dosagem de corticosterona.

SOLUÇÃO DE NaCl 0,9% - Solução utilizada para diluição do fármaco e para o preparo da solução de ovalbumina.

SOLUÇÕES DE NaCl 0,2 e 1,6% - Soluções utilizadas com a finalidade de romper as hemácias presentes nas amostras analisadas no citômetro de fluxo.

PARAFORMALDEÍDO a 4% - Solução utilizada com a finalidade fixar o pulmão para os cortes histológicos.

- Paraformaldeído	4 g
- NaOH 1M (hidróxido de Sódio)	4 gotas
- H ₂ O milli-Q	100 mL

GLUTARALDEÍDO a 4% EM TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO 0,2M - pH 7,4 - Solução utilizada com a finalidade fixar o pulmão para os cortes histológicos.

- NaH ₂ PO ₄ (Fosfato de sódio monobásico)	2,76 g
- Na ₂ HPO ₄ (Fosfato de sódio dibásico)	1,42 g
- H ₂ O milli-Q	200 mL

4.5 Procedimentos comportamentais

Para registro das análises comportamentais foi utilizado o aparelho Ethovision® (Noldus Information Technology®, Leesburg, VA, USA) que consiste em um sistema de rastreamento em vídeo, análise de movimento e reconhecimento comportamental. O sistema é composto pelo

programa EthoVision Pro-Color 1.9 e pelos itens de hardware: câmara filmadora (CCD-Iris color Sony), monitor de vídeo (Sony), computador (Pentium 133, 16 MB de memória RAM, 1,2 GB de disco rígido) com placa de captura de vídeo (TARGA + Truevision, 2D, NTSC), monitor SVGA, teclado e *mouse*, além de cabos e conectores.

4.5.1 Rastreamento do animal e análise do movimento

A partir de imagens recebidas pela câmera filmadora e digitalizadas na placa de captura, o programa gera coordenadas (x e y) do centro de gravidade do animal, em intervalos de tempo determinados, obedecendo a uma taxa de amostragem 6,66 amostra por segundo¹. As coordenadas foram geradas pelo método de subtração- ideal para rastrear um animal branco em uma arena cinza, no qual o sistema subtrai a imagem de cada amostra dos pontos de imagem de referência (imagem do campo aberto, ou do labirinto em cruz elevado vazios, isto é sem o animal, e captada antes do experimento).

Para que o sistema pudesse reconhecer em qual zona² do aparelho se encontrava o animal, foi necessário fazer uma representação gráfica dos aparelhos comportamentais. Assim, sobrepondo a imagem destes aparelhos, no monitor de vídeo, ao canal de edição de imagem do programa, foi possível desenhar o contorno e as subdivisões de cada arena³ e nomear as zonas.

Antes do início dos experimentos foi necessário configurar o limiar de ruído (*noise threshold*) – diferença mínima de intensidade entre o fundo (*background*) e o animal, a fim de ignorar possíveis ruídos no sinal de vídeo durante o processamento de imagens subseqüentes. Esse ajuste depende da intensidade de iluminação da arena e é feito automaticamente.

¹ A taxa de amostragem ideal para roedores é de 2ª 8 amostras/seg, já que uma configuração de amostragem inferior causaria perda de detalhes, enquanto um valor superior a 8 excederia a dinâmica do roedor, captando movimentos corporais que não indicam deslocamento e, portanto, superestimado a distância movida.

² Zonas são as subdivisões da arena: exemplos – zonas interna, média e periférica do campo aberto.

³ Arena é a representação gráfica da área do aparelho que o animal pode percorrer, dentro da qual o sistema rastreia o movimento.

A iluminação da sala de observação era do tipo difusa, que foi obtida colocando-se uma placa semi-opaca de acrílico abaixo da fonte luminosa, a fim de espalhar a luz uniformemente em todas as direções e minimizar o aparecimento de reflexos e sombras. Outro fator importante para eliminar reflexos foi o contraste perfeito entre a arena e o animal, fato alcançado pintando-se as superfícies do campo aberto e do labirinto em cruz elevado de cor cinza chumbo fosco.

Uma vez que a imagem digitalizada é representada em *pixels* (*Picture elements*-elementos de imagem), para que as coordenadas do animal sejam, fielmente usadas para calcular seu deslocamento real em centímetros, foi necessário o procedimento de calibração da arena. A calibração simples usa dois pontos de distância conhecida em centímetros (uma régua, por exemplo); no entanto, por assumir uma relação linear entre as distâncias no mundo real e aquela da imagem digitalizada, esse método negligencia a distorção provocada pela lente da câmara, o que afetaria os valores dos parâmetros de deslocamento (por exemplo, a distância movida). Deste modo, foi usado um método de calibração avançado, no qual, sobre a imagem digitalizada de uma cartolina com pontos desenhados com distâncias entre si conhecidas foram “plotados” 35 pontos correspondentes às coordenadas reais em centímetro, para que o sistema tivesse uma representação homogênea das distâncias em toda arena, isto é, tanto no centro como nas extremidades.

4.5.2 Reconhecimento comportamental: parâmetros semi-automáticos

Com o EthoVision[®], simultaneamente ao rastreamento, ainda foi possível o registro de eventos comportamentais (levantar) através de letras pré-escolhidas do teclado do computador; assim, foi possível registrar o tempo de duração e o número de ocorrências destes comportamentos, na arena e em cada zona. O método usado foi o não-exclusivo, no qual a duração do comportamento correspondia ao tempo em que se mantinha a tecla pressionada, enquanto o número de ocorrências era registrado conforme o número de vezes que se pressionava a tecla. Uma vez que o sistema armazenou e calculou os dados segundo a localização do animal, e foi o experimentador quem observou o comportamento, essa etapa foi chamada de registro semi-automático do comportamento.

4.5.3 Compilação e análise dos dados

O teste de cada animal (cada sessão de 5 minutos no campo aberto ou no labirinto em cruz elevado ou no *hole-board*) correspondia a uma trilha (*track*). A análise feita pelo EthoVision® consistiu em processar os dados do conjunto de trilhas de um experimento, isto é, a partir do registro das coordenadas e do que ocorreu em cada amostra, o sistema calculou os valores numéricos das características de distribuição escolhidas para cada parâmetro (frequência e duração, para parâmetros de estado; valor total e média, para parâmetros contínuos). Os resultados foram “exportados” na forma de um arquivo “.txt” (extensão de arquivo texto) que, ao ser aberto na planilha do programa *Microsoft Excel 2003*, continha nas colunas as informações relacionadas ao número da trilha, zona, grupo e características de distribuição de cada parâmetro. Antes da análise estatística, a planilha com esses dados passou por uma série de etapas de organização e de cálculos de porcentagens de tempo e de número de ocorrências dos parâmetros em cada zona.

4.5.4 Medida da atividade geral no campo aberto

O campo aberto foi utilizado para medir a atividade geral dos animais. Trata-se de uma arena circular de madeira medindo 40,0 cm de diâmetro e 40,0 cm de altura pintada na cor cinza grafite. O fundo da arena circular é dividido, virtualmente, por 3 círculos concêntricos em 3 partes iguais: zona central, média e periférica.

A medida da atividade geral no campo aberto foi feita por intermédio de um sistema indireto, ETHOVISION (VIDEO TRACKING MOTION e BEHAVIOR RECOGNITION SYSTEM® VERSÃO 1.90) e foi avaliada colocando-se cada animal individualmente na zona central do aparelho (centro da arena) por 5 minutos.

Como indicadores da atividade geral no campo aberto foram registrados os seguintes parâmetros:

- Distância percorrida: corresponde ao ato de o animal entrar com as quatro patas em uma das divisões (zonas) do piso da arena e se locomover (cm).
- Velocidade média: corresponde ao ato de o animal entrar com as quatro patas em uma das divisões (zonas) do piso da arena e se locomover (cm) em um determinado tempo (s).

- Frequência de levantar: corresponde ao ato de o animal permanecer apoiado em suas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão da arena, com sua cabeça voltada para cima, apoiando-se ou não nas paredes do campo aberto.
- Número de movimentos iniciados: corresponde ao ato de o animal iniciar movimentos na arena.
- Tempo em movimento: quanto tempo em segundos, o animal se movimentou no interior das zonas do campo aberto (s).

Como já comentado, as observações foram realizadas através do sistema de rastreamento Ethovision[®] como descrito no item 4.6, sempre no mesmo período do dia (entre as 8:00 hs e 14:00 hs) intercalando-se os animais dos diferentes grupos para observação. Com a finalidade de evitar influência de odores, a arena foi limpa com uma solução aquosa de álcool a 5 % imediatamente antes da introdução de cada animal. A figura 1 ilustra os equipamentos e a sala de rastreamento do animal e análise do movimento e a figura 2 ilustra a representação gráfica das áreas virtualmente marcadas no aparelho EthoVision

FIGURA 1- EthoVision[®] - (Video Tracking Motion & Behavior Recognition System Versã 1.90) – equipamento de rastreamento em vídeo, usado para análise de movimentos e reconhecimento comportamental.

FIGURA 2- Representação gráfica das áreas virtualmente marcadas pelo aparelho EthoVision® no campo aberto - ● zona externa; ● zona média; ● zona interna (A) e representação gráfica do trajeto (em linha vermelha) percorrido por um animal nas zonas virtuais do campo aberto (B).

4.5.5 Avaliação do comportamento no labirinto em cruz elevado (plus-maze)

Confeccionado totalmente em madeira, o labirinto em cruz elevado é constituído por dois braços abertos medindo 30 cm de comprimento por 5 cm de largura e dois braços fechados 30 x 5 x 15 cm de altura. Na junção dos braços abertos com os fechados há um espaço central medindo 5 cm² de área e chamamos de área central (Figura 3).

O estudo dos níveis de ansiedade foi feito como aquele descrito para ratos por Pellow (1995) e validado para uso em camundongos por Lister (1987). A avaliação do comportamento no labirinto em cruz elevado foi feita colocando-se cada animal, individualmente, no centro do aparelho, com a cabeça voltada para um dos braços fechados. Foi considerada como “entrada” em um dos braços ou permanência nos braços o ato de o animal colocar as quatro patas dentro de cada área do aparelho. Cada animal foi observado por 5 minutos através do sistema indireto, o ETHOVISION como descrito em 4.3. (Figura 1).

Como indicativo da avaliação do comportamento no aparelho registramos os seguintes parâmetros:

- Número de entradas nos braços abertos (EA): corresponde ao ato de o animal entrar nos braços abertos com as quatro patas.
- Número de entrada nos braços fechados (EF): corresponde ao ato de o animal entrar nos braços fechados com as quatro patas.
- Tempo de permanência nos braços abertos (TA): corresponde ao tempo de permanência neste braço em segundos.
- Tempo de permanência nos braços fechados (TF): corresponde ao tempo de permanência neste braço em segundos.
- Distância percorrida: corresponde ao ato de o animal entrar com as quatro patas em uma das divisões (zonas) do piso da arena e se locomover (cm).

Foi calculado, para cada animal, o número total de cruzamentos (soma do número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados) e a porcentagem de entradas e de tempo despendidos por eles na exploração nos braços abertos conforme mostrado a seguir:

$$\% \text{ de entrada em EA} = \frac{EA \times 100}{EA + EF} \quad \text{e} \quad \% \text{ de tempo em TA} = \frac{TA \times 100}{\text{tempo TA} + TF}$$

$$\% \text{ de entrada em EF} = \frac{EF \times 100}{EF + EA} \quad \text{e} \quad \% \text{ de tempo em BF} = \frac{TF \times 100}{\text{tempo TA} + TF}$$

As observações foram realizadas sempre no mesmo período do dia (entre as 8:00 hs e 14:00 hs), intercalando-se os animais dos diferentes grupos. A arena foi limpa com uma solução aquosa de álcool a 5 % imediatamente antes da introdução de cada animal.

FIGURA 3- Representação gráfica das áreas virtualmente marcadas pelo aparelho EthoVision® no LCE - ● braços abertos; ● braços fechados; ● zona central (A) e representação gráfica do trajeto (em linha vermelha) percorrido por um animal nos braços do labirinto em crus elevado (B).

4.5.6 Medida da atividade exploratória no hole-board

O *hole-board* foi utilizado para medir a atividade exploratória dos animais. Trata-se de uma arena circular em madeira medindo 40,0 cm de diâmetro e 20,0 cm de altura pintada na cor cinza grafite. O fundo da arena circular é composto por quatro orifícios igualmente espaçados medindo 3 cm de diâmetro; abaixo de cada orifício há uma plataforma onde foram colocados peletes de ração. (Figura 1)

A medida da atividade exploratória no *hole-board* foi feita por intermédio de um sistema indireto, ETHOVISION como descrito em 4.3, e foi avaliada colocando-se cada animal individualmente na zona central do aparelho (centro da arena) por 5 minutos.

Como indicadores da atividade geral exploratória no *hole-board* foram registrados os seguintes parâmetros:

- Distância percorrida: corresponde ao ato de o animal entrar com as quatro patas e se locomover em uma das divisões (zonas) do piso da arena.
- Velocidade média desenvolvida: corresponde com que velocidade o animal se locomoveu na arena.
- Número de mergulho de cabeça: corresponde ao movimento exploratório de cabeça e ombro.

- Tempo de mergulho de cabeça: quanto tempo em segundos, o animal se utilizou para realizar o mergulho de cabeça em segundos.

As observações foram realizadas sempre no mesmo período do dia (entre as 8:00 hs e 14:00 hs) intercalando-se os animais dos diferentes grupos para observação. Com a finalidade de evitar influência de odores, a arena foi limpa com uma solução aquosa de álcool a 5 % imediatamente antes da introdução de cada animal.

FIGURA 4- Representação gráfica das áreas virtualmente marcadas pelo aparelho EthoVision® do hole-board - O corresponde aos orifícios de (3 cm) no chão da arena (A) e representação gráfica do trajeto (em linha vermelha) percorrido por um animal no *Hole-Board* (B).

4.5.7 Medida do comportamento defensivo e ansiedade através do teste de exposição ao odor e presença do predador

Foi utilizada uma caixa de exposição ao odor e presença do predador para medir comportamento defensivo e os níveis de ansiedade dos animais. Trata-se de duas caixas em acrílico conectadas por um túnel também de acrílico. O estudo do comportamento defensivo foi feito como aquele descrito para camundongos por M. Yang et al. (2004). A avaliação foi conduzida colocando-se os animais individualmente em uma caixa de acrílico (arena) medindo 46 cm de comprimento, 21 cm de largura e 24 cm de altura, dividida em dois compartimentos de tamanhos iguais (B1 e B2) por uma tela de arame e uma caixa de saída –A, também de acrílico medindo 12 cm de comprimento, 7 cm de largura e 7 cm de altura com 3 lados escuros e o lado frontal transparente. As caixas foram conectadas uma à outra por um túnel de acrílico transparente medindo 4,4 cm de diâmetro e 13 cm de comprimento. O chão do lado B1 da arena

foi dividido em duas partes: a zona interna próxima ao túnel de acesso e a zona periférica próxima à tela de arame.

Os procedimentos dos testes consistiram de duas fases:

Fase 1 – Habituação: cada animal foi colocado por 3 dias consecutivos no centro da arena por 10 minutos/dia sem a presença do rato;

Fase 2 – Teste: no dia 4, após a habituação, os animais foram colocados no centro da região B1 na presença de um rato Wistar tratado com MDMA que foi introduzido atrás da tela de arame (região B2).

A medida do comportamento defensivo e ansiedade dos camundongos foi realizada por intermédio de um sistema indireto, composto de uma câmera de vídeo conectada a um computador portátil, e foi realizada colocando-se cada camundongo individualmente na caixa de saída (A) observando-se seu comportamento por 10 minutos.

Como indicativos do comportamento defensivo e dos níveis de ansiedade na caixa de exposição ao predador foram registrados os seguintes parâmetros:

- Tempo de permanência na caixa de saída: duração em segundos, do tempo gasto pelo animal dentro da caixa de saída (A).
- Tempo de permanência no túnel: duração em segundos, do tempo gasto pelo animal dentro do túnel de acesso.
- Número de Entradas da Zona Interna da Arena (B1): corresponde ao número de vezes em que o animal entra nesta zona com as quatro patas.
- Número de Entradas da Zona Periférica da Arena (B1): corresponde ao número de vezes em que o animal entra nesta zona com as quatro patas.
- Número de autolimpeza: corresponde ao número de vezes que o animal se limpa.
- Tempo de autolimpeza: corresponde ao tempo gasto na realização deste comportamento.
- Número de acesso de risco: corresponde ao número de vezes em que o animal explora com estiramento do corpo para frente e as patas traseiras esticadas na arena.

As observações foram realizadas sempre no mesmo período do dia (entre as 12:00 hs e 18:00 hs) intercalando-se os animais dos diferentes grupos para observação. Com a finalidade de

evitar influência de odores, a arena foi limpa com uma solução aquosa de álcool a 5 % imediatamente antes da introdução de cada animal.

Foram realizados dois experimentos; no primeiro deles o estímulo aversivo a ser colocado em B2 foi um rato e no segundo, um pano com odor de gato.

FIGURA 5- Representação gráfica da caixa de exposição ao predador para análise do comportamento defensivo e níveis de ansiedade - (A) e representação gráfica da caixa de saída; (B) representação gráfica das duas regiões (B1 e B2) arena de exposição.

4.6 Metodologias neuroquímicas

4.6.1 Coleta e processamento dos tecidos

Os animais foram submetidos à eutanásia por decaptação, sendo os cérebros retirados e lavados com solução salina gelada (4° C). Imediatamente após, o cérebro foi dissecado sobre placa de “petri” rodeado por pedras de gelo seco, formando-se assim um micro-ambiente o mais frio possível. Foram retirados o córtex frontal, o estriado e o hipotálamo que foram pesados e congelados a -80 °C num tempo máximo de 3 minutos, onde permaneceram por no máximo 2 meses.

Os tecidos cerebrais foram homogeneizados por sonicação (caneta sonicadora), durante 2 ou 3 minutos sobre uma cuba de gelo seco, com solução de ácido perclórico 0,1 M contendo 0,02% de Na₂S₂O₅, EDTA dissódico e uma concentração conhecida de DHBA, **utilizado como**

padrão interno para as dosagens de monoaminas. O DHBA (3,4 diidroxibenzilamina) foi escolhido como padrão interno por ter as mesmas características físico-químicas que as monoaminas dosadas (COSTA; FRUSSA-FILHO; FELÍCIO, 2001).

Dopamina (DA), seus metabólitos ácido homovanílico (HVA) e ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC), a Noradrenalina (NA), a serotonina (5HT) e o seu metabólito ácido 5-hidroxiindolacético (5HIA) foram dosadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), com detector eletroquímico. Foram calculadas também as relações DOPAC/DA, HVA/DA e 5HT/5HIA como indicadores da taxa de renovação (*turnover*) de DA e de 5HT, respectivamente.

Os animais foram submetidos à eutanásia por decaptação, sendo os cérebros retirados e lavados com solução salina gelada (4 °C). Imediatamente após, o cérebro foi dissecado sobre placa de petri rodeado por pedras de gelo seco, formando-se, assim, um micro-ambiente o mais frio possível. Foram retirados o córtex frontal, o estriado e o hipotálamo que foram pesados e congelados a -80 °C num tempo máximo de 3 minutos, onde permaneceram por no máximo 2 meses.

Os tecidos cerebrais foram homogeneizados por sonicação (caneta sonicadora), durante 2 ou 3 minutos sobre uma cuba de gelo seco, com solução de ácido perclórico 0,1 M contendo 0,02% de Na₂S₂O₅, EDTA dissódico e uma concentração conhecida de DHBA, utilizado como padrão interno para as dosagens de monoaminas. O DHBA (3,4 diidroxibenzilamina) foi escolhido como padrão interno por ter as mesmas características físico-químicas que as monoaminas dosadas (COSTA, FRUSSA-FILHO, FELÍCIO, 2001).

4.6.2 Dosagens neuroquímicas

As dosagens neuroquímicas foram realizadas a partir de método previamente descrito (Felicio et al., 1996). O sistema de HPLC – ED (SHIMATZU Modelo 6A) é composto por uma bomba, um amortecedor de impulsos, uma válvula injetora de 20 µL, um detector eletroquímico, um forno de coluna para manutenção da temperatura, um registrador e um integrador (Modelo

Chromatopac), todos marca SHIMATZU. A coluna utilizada foi a C-18 (SUPELCO) medindo 220X4,6 mm com filtro de linha (Figura 6).

A técnica utilizada foi a de cromatografia em fase reversa com pareamento iônico. Esta técnica fundamenta-se na cromatografia de partição ou absorção.

No preparo da fase móvel utilizada na quantificação das monoaminas e seus metabólitos, foi utilizado um sistema isocrático constituído de fosfato dissódico (7,16 g/L), ácido cítrico (4,20 g/l), EDTA (40,0 mg/L), ácido heptanossulfônico (556 mg/L) e metanol (80 mL/L). O pH desta solução foi acertado para 3,0 com auxílio de ácido ortofosfórico.

A fase móvel foi filtrada em um sistema a vácuo e deaerado por 30 minutos com um fluxo de hélio antes de ser instalada no HPLC. Após sua instalação no sistema cromatográfico, ela ainda permaneceu por uma noite (*overnight*) circulando em sistema fechado para estabilização do aparelho, com um fluxo constante de 1,2 mL/min. O detector eletrolítico foi mantido com potencial de +0,83 V no eletrodo de trabalho. A temperatura para amostragem no HPLC foi mantida em 25 °C.

As substâncias foram reconhecidas segundo seu tempo de retenção na coluna cromatográfica, comparando-os com aquela de concentração conhecida. O tempo total de cada amostra foi de 20 min. O limite de detecção foi de 0,02 ng para DA, DOPAC, NOR, 5HT e 5HIAA e de 0,2 ng para HVA.

Os padrões de concentrações de 1mM de NOR, MHPG, DHBA, DA, DOPAC, HVA, 5HIAA e 5HT foram diluídos em ácido clorídrico 0,1 M contendo 0,02% de Na₂S₂O₅, distribuídos em tubos eppendorf (1,5 mL) e, em seguida estocados em freezer (-80 °C) por um período de até dois meses. No momento da análise os padrões foram descongelados e diluídos 5.000, 10.000 e 20.000 vezes em ácido perclórico 0,1 M.

Para a quantificação dos neurotransmissores foram estabelecidas curvas de calibração, tendo-se calculado os coeficientes de correlação linear (R^2), sendo considerados adequados valores de R^2 superiores a 0,9. Para o estabelecimento da precisão intra-ensaio do método cromatográfico foram calculados os coeficientes de variação (CV%) de diferentes concentrações dos neurotransmissores analisados e foram considerados adequados valores com CV% inferiores a 15%.

A recuperação do método foi estudada acrescentando-se a triplicata de amostras de concentrações conhecidas dos diferentes padrões mensurados, sendo que foi aceito como adequados valores superiores a 80%.

A cada amostra proveniente dos animais foi adicionada concentrações conhecidas de padrão interno (DHBA 14 ng/mL), e os valores obtidos foram utilizados para os devidos ajustes nas concentrações dos neurotransmissores.

As micro-seringas, pipetas automáticas e vidrarias volumétricas foram de boa procedência tendo em vista a necessidade de precisão exigida para estas dosagens.

FIGURA 6- Sistema de HPLC – ED (SHIMATZU Modelo 6A) utilizado neste trabalho para dosagem neuroquímica.

4.7 Dosagem dos níveis séricos de corticosterona sérica

4.7.1 Coleta de sangue para obtenção do soro

Após a coleta, o sangue dos animais foi centrifugado (2.000 rpm/20 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 eutanasiados 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.

4.7.2 Dosagem da corticosterona

As amostras de soro dos animais foram retiradas do freezer e mantidas à temperatura ambiente (22 ± 2 °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 murina.

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.

a) 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.

b) 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.

Os animais foram manuseados a cada 2 dias a fim de facilitar o manejo e evitar-se, ao máximo, a ocorrência de possíveis situações estressantes durante a fase experimental.

Os seguintes parâmetros de eficácia foram registrados:

Experimento-6

- Sensibilidade do método: 92,98%;
- Coeficiente de Variação Baixo: 6,81 %;
- Coeficiente de Variação Alto: 0,63 %;
- Limite de Detecção: 1,98 ng/mL.

Experimento-7

- Sensibilidade do método: 90,0%;
- Coeficiente de Variação Baixo: 4,07 %;
- Coeficiente de Variação Alto: 0,13 %;
- Limite de Detecção: 3,68 ng/mL.

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.

4.8 Hemograma

O hemograma foi constituído pelo eritrograma e pelo leucograma. Os animais foram anestesiados e a coleta de sangue foi realizada imediatamente após, através de punção cardíaca dos camundongos, com auxílio de seringas e agulhas previamente umedecidas em heparina. A contagem diferencial dos leucócitos sangüíneos foi realizada segundo método recomendado por Birgel (1982). Em seguida, uma amostra deste sangue foi diluída no Diluidor DA-500 CELM[®] para determinação do número de eritrócitos, número de leucócitos, hemoglobina e hematócrito dos animais no Contador de Células CC530 CELM[®] de uso veterinário.

4.9 Metodologias do estudo da reatividade das vias aéreas e influxo celular pulmonar

4.9.1 Inflamação alérgica pulmonar - sensibilização e broncoprovocação *in vivo*

Para sensibilização os animais receberam 10 µg de ovoalbumina (OVA) dissolvidas em 10 mg de hidróxido de alumínio por via intraperitoneal. Após 7 dias da sensibilização os animais receberam por via subcutânea, 0,3 mL de uma solução de 1 mg de OVA (reforço) diluída em 1

mL de PBS. A broncoprovocação foi desencadeada nos dias 7 e 8 após o reforço, expondo-se os animais à uma inalação de 10 mL de OVA (2,5%) diluída em PBS. A sessão de inalação foi realizada por 20 minutos colocando-se 05 animais por sessão em caixa plástica (18,5 cm X 18,5 cm X 13,5 cm) acoplada a um nebulizador ultrassônico (marca ICEL) com capacidade de produzir névoa com partículas entre 0,5 a 1,0 μm^3 . Este período de sensibilização e broncoprovocação foi escolhido visto que, de acordo com Coleman et al. (1983) após a injeção intraperitoneal de ovoalbumina emulsificada em alumínio, os níveis circulantes de imunoglobulinas E (IgE) aumentam rapidamente entre 7 e 14 dias.

4.9.2 Obtenção do lavado broncoalveolar (LBA)

O LBA foi realizado de acordo com Tavares de Lima et al. (1992). Em resumo, decorrido o tempo de estudo desejado os animais foram anestesiados (xilazina 20,0 mg/kg + cetamina 75,0 mg/kg; i.p.) e exsangüinados (secção da aorta abdominal). Para lavagem do espaço broncoalveolar, foi feita uma incisão longitudinal na região cervico-ventral seguida pela canulação da traquéia. Para tanto, foi utilizada uma válvula reguladora com três entradas, sendo uma entrada acoplada a uma cânula de polietileno, a outra entrada ligada a uma seringa de plástico contendo 3 mL de salina tamponada com fosfato (PBS) e finalmente, a terceira entrada a uma seringa vazia. A cânula foi inserida na traquéia e feita a lavagem do espaço broncoalveolar. Esta lavagem foi feita em etapas, injetando-se lentamente no espaço alveolar um volume de 3 mL de PBS. A seguir, a válvula ligada à seringa contendo PBS era fechada, abrindo-se aquela ligada à seringa vazia para a aspiração do PBS injetado, fato acompanhado de delicadas massagens no pulmão. Esse procedimento foi repetido até que todo o volume de PBS fosse injetado.

4.9.3 Determinação do número de células presentes no LBA

O LBA obtido foi centrifugado por 10 minutos a 1.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o botão ressuspenso em 1 mL de PBS. Alíquotas da amostra (100 μL) foram colocadas em Cytospin® a 1.000 rpm por 5 minutos. As lâminas obtidas foram coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa modificado segundo Rosenfeld (Rosenfeld, 1947).

A contagem total de células presentes no LBA foi feita em câmara de Neubauer. Para tanto, uma alíquota da amostra (90 µl) foi acrescida de 10 µl de cristal violeta (0,2%) dissolvido em ácido acético (30%), desta uma alíquota (10 µl) foi diluída em 90 µl de PBS; totalizando, portanto, uma diluição de 1:100. Os resultados foram expressos em número de células x 10⁵/mL.

4.9.4 Determinação do número de leucócitos na medula óssea femoral

Decorrido o tempo de estudo desejado, os animais foram anestesiados (xilazina 20,0 mg/kg + cetamina 75,0 mg/kg; i.p.) e exsangüinados (secção da aorta abdominal). Fragmento de aproximadamente 1 cm do fêmur esquerdo dos animais foi retirado, lavado em PBS e seco em papel de filtro. Com auxílio de uma pinça dente-de-rato, o fragmento de fêmur foi mantido sobre um tubo eppendorf (2 mL), em seguida introduz-se no canal medular do fêmur uma agulha (0,13 x 30 mm) acoplada a uma seringa de polipropileno contendo 1 mL de PBS e o fragmento femural foi, então, perfundido. A suspensão medular obtida foi homogeneizada com auxílio de pipeta automática de 1 mL e alíquotas de 90 µl das amostras foram diluídas em 10 µl cristal violeta (0,2%) dissolvido em ácido acético (30%), desta alíquota (10 µl) foi diluída em 90 µl de PBS (S1); desta alíquota (10 µl) será diluída em 90 µl de PBS (S2), totalizando, portanto, uma diluição de 1:1000 e processadas para contagem total em câmara de Neubauer em microscopia óptica comum e os resultados expressos em número de células x 10⁶/mL.

4.9.5 Determinação do número de leucócitos circulantes

As amostras foram coletadas e processadas para contagem total em câmara de Neubauer. A contagem diferencial dos leucócitos circulantes foi feita em esfregaços de amostras de sangue periférico. As lâminas preparadas foram coradas por May-Grünwald-Giemsa modificado segundo Rosenfeld. O número de leucócitos presentes foi quantificado por microscopia óptica comum e o resultado obtido foi expresso em número de células/mm³ de sangue.

4.9.6 Determinação do número de leucócitos no baço

A celularidade do baço foi determinada após a fricção destes órgãos por meio de RPMI – 1640 a 4 °C, com auxílio de lâminas de microscopia (Fisherbrand®). A seguir esta suspensão de células foi centrifugada a 1932g (1200) por 8 minutos, sendo ressuspensa em 1 mL de água

destilada para lise das hemácias, e após 20 segundos, completada com 9 mL de PBS 1X. A quantificação foi realizada em câmara de Neubauer (diluídas 1:1000), sendo a viabilidade celular das mesmas observadas pela coloração com azul de tripan, aceitando o mínimo 95% de viabilidade.

4.10 Cultura de tecido pulmonar isolado (explante)

A cultura de parênquima pulmonar foi realizado de acordo com Proust et al. (2003). Os animais após os tratamentos farmacológicos foram sensibilizados e desafiados com OVA. Após 24 horas do desafio os animais foram anestesiados, dessangrados e o leito vascular pulmonar perfundido com 3 mL de PBS heparinizado (5 UI/mL) através de um cânula inserida na artéria pulmonar, para remoção do sangue. Fragmentos de igual peso de lóbulo pulmonar foram incubados em placas de 24 poços a 37°C e 5% de CO₂ em meio DMEM, contendo 1% de L-glutamina e gentamicina (10 µg/mL). As culturas foram estimuladas ou não com lipopolissacarídeo (LPS, *Escherichia coli*) 100 µg/mL. Após 24 horas os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C até a análise. Os resultados foram expressos em pg de citocinas produzidas por mg de tecido pulmonar (peso seco).

4.11 Quantificação de citocinas IL-4, IL-5 e IL-10

As citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 foram quantificadas por ELISA em amostras de cultura de parênquima pulmonar. Para tanto, foram utilizados kits *Duo Set* disponíveis comercialmente (*R & D System®*) com ensaios conduzidos de acordo com as instruções do fabricante. Placas de 96 poços NUNC-MAXSORP foram sensibilizadas *overnight* e a uma temperatura ambiente com 100µL de anticorpos monoclonais específicos de captura para as citocinas: Anti-IL-4, Anti-IL-5 e Anti-IL-10. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS *Tween* 0,05% e bloqueadas por 2 horas com 200 µL de PBS contendo 1% de BSA e 5% de sacarose. Após este período, as placas foram novamente lavadas e 50 µl da amostra ou da curva padrão foram adicionados e incubados por duas horas a temperatura ambiente. A seguir, as placas foram lavadas e adicionados 100 µL do anticorpo de detecção biotilnado específico para cada citocina e que foi seguido de incubação por 2 h à temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente e incubadas com solução de peroxidase conjugada a avidina em PBS contendo 1% de BSA durante 20 min. a 37 °C. Após a lavagem das placas foram adicionados 100 µL de reagente para revelação da reação. Por fim, após 30 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1M e a densidade óptica lida em

450 nm. A concentração da citocinas presentes nas amostras foi calculada com base em curva padrão.

4.12 Citometria 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*) (Figura 7).

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, 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.

Os dados de fluorescência foram colhidos em escala logarítmica. A fluorescência do Anti-CD62 (L+E) foi medida em 585 ± 42 nm (detector FL2). A quantificação das expressão dos marcadores foi estimada pela intensidade de fluorescência média.

FIGURA 7- Citômetro de fluxo modelo FACScalibur da Becton Dickinson acoplado a um computador Macintosh (G4) da Apple utilizado para avaliar a expressão de L - selectinas.

4.13 Avaliação da expressão de L – selectinas em células obtidas do lavado broncoalveolar (LBA) e do sangue por citometria de fluxo

Para a colheita do LBA e do sangue, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (75mg/kg e 20mg/kg, respectivamente) via intraperitoneal. O sangue foi coletado pela veia hepática e adicionado em microtubos contendo heparina. Em seguida, foi realizada uma incisão longitudinal na região cêrvico-ventral e a traquéia foi exposta e canulada com o auxílio de uma cânula metálica de 20 Gauge, fixada com fio de algodão ao redor da traquéia. A cânula foi acoplada a uma seringa contendo 1,5 ml de PBS que foi injetado no espaço alveolar e coletado em seguida num eppendorf. Após este procedimento, mais 1,5 ml de PBS foi injetado e coletado, totalizando o volume de aproximadamente 3 ml de LBA. 100 μ L de sangue foram submetido à lise osmótica das hemácias com solução salina 0,2% por 20 segundos e, em seguida, foi adicionado solução salina 1,6%. As células do LBA foram contadas em câmara de Neubauer, com o auxílio de azul de Tripán, e ajustadas para 2×10^6 cel/ml. Em seguida, tanto as amostras de sangue como as amostras de LBA, foram incubadas com anticorpo anti-CD62-L conjugado com PE, conforme a especificação do fabricante (*BD Biosciences*). Seguidos 60min as células foram lavadas e ressuspensas em 200uL de PBS, sendo lidas em citometro de fluxo FACScalibur (*Becton and Dickinson, Mountain View, CA*).

As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades *FSC Forward Scatter* e *SSC - Side Scatter* do aparelho que avaliam o tamanho e a complexidade interna das mesmas, respectivamente. Os valores referentes a expressão de CD62-L das amostras foram avaliados por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pela população de neutrófilos, monócitos e linfócitos no sangue e dos neutrófilos e macrófagos no LBA, sendo os valores da média geométrica fornecido pelo software CellQuest Pro.

4.14 Avaliação da reatividade das vias aéreas *in vitro* através da traquéia isolada murina

Os animais foram anestesiados (xilazina 20,0 mg/kg + cetamina 75,0 mg/kg; i.p.) e exsanguinados (secção da aorta abdominal) e a seguir tiveram seus tóraxes abertos. A traquéia foi isolada e o tecido conjuntivo adjacente removido. A seguir, segmentos de traquéia foram montados para registro isométrico de contrações em cubas para órgão isolado (15 mL) contendo solução de Krebs-Henseleit aerada com 95% e 5% CO₂ com a seguinte composição (mM): NaCl, 115.0; KCl, 4.6; CaCl₂ 2. H₂O, 2.5; KH₂PO₄, 1.2; MgSO₄. 7 H₂O, 2.5; NaHCO₃, 25.0 e glicose 11.0 . O registro da força isométrica foi realizado usando o sistema, *POWER LAB 4sp* e transdutores isométricos (F-60), utilizando-se o programa *Chart 3.4* para análise.

Os segmentos de traquéias murina isolada foram expostos a uma carga inicial de 500 mg e a análise feita a uma DDP de 500mV. Durante o período de equilíbrio (40 minutos), a solução de Krebs-Henseilet foi trocada a cada 10 minutos. Decorrido esse período, a tensão foi reajustada para 500 mg. A capacidade contrátil (viabilidade tecidual) dos segmentos de traquéia foi avaliada substituindo-se o tampão Krebs-Henseilet por tampão KCl despolarizante (60mM). As preparações dos tecidos foram expostas ao KCl a fim de se obter um padrão de contração. Após a avaliação da viabilidade das preparações, o KCl foi substituído novamente pelo tampão Krebs-Henseilet. Decorridos 20 minutos de equilíbrio foram adicionado OVA (100ug/mL) e após nova lavagem e estabilização foram construídas curvas concentração-efeito à metacolina.

4.15 Fixação, processamento e inclusão do tecido pulmonar para avaliação da desgranulação dos mastócitos

Após eutanásia, os animais tiveram a traquéia canulada e os pulmões insuflados com 1 mL de ar. Em seguida, os brônquios foram amarrados para se evitar a perda de ar e o pulmão foi fixado em paraformaldeído a 2% e glutaraldeído a 2%, tampão fosfato Sorensen 0,1 M, pH 7,4, por 24 h, a 4 °C. Em seguida, as amostras foram lavadas no mesmo tampão, desidratadas em soluções crescentes de etanol, clarificadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes de 3 µm foram realizados no micrótomo Leica RM 2265 (*Reichert Ultracut; Leica, Áustria*) e, posteriormente, corados com solução de azul de toluidina 0,25% e borato de sódio a 0,25% para análise histológica. As amostras (10 cortes por animal, n = 100 por grupo) foram analisadas em um microscópio Axioskop 2 mot plus (*Zeiss, GR*). Os cortes histológicos foram analisados por morfometria através do Software Axiovision® (*Zeiss*) para determinação das áreas teciduais e contagem das células. As células foram expressas em média $\pm$ DP por mm² de tecido pulmonar.

4.16 Estudo histopatológico

Os pulmões foram fixados em paraformaldeído 4%. Após 24 horas, foram transferidos para uma solução de etanol 70%. Depois de terminada a fixação, o material foi submetido às técnicas histológicas habituais com parafina, para obtenção de cortes de 4 µm de espessura, corados com hematoxilina e eosina. O tecido foi retirado de regiões bronquiais proximais e distais dos pulmões, em cortes transversais em relação ao brônquio principal.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados pelo teste de Bartlett para determinação da homogeneidade das variâncias. Os dados paramétricos foram analisados através do teste “t” de Student ou através de uma análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, para avaliação dos contrastes. Os resultados não paramétricos foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney ou através do teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Foram considerados significantes as análises com nível de significância menor ou igual $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram feitas com o auxílio de programa estatístico denominado INSTAT.

6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

6.1 Experimento 1: Caracterização dos efeitos comportamentais do MDMA.

Quarenta camundongos foram distribuídos ao acaso em 6 grupos iguais: um grupo controle (C) e cinco grupos experimentais (E1, E2, E3, E4, e E5). Os animais dos grupos experimentais foram tratados pela via intraperitoneal com doses crescentes de MDMA, a saber: 0,2, 1,0, 5,0, 10,0 e 20,0 mg/kg. Os animais do grupo controle receberam idêntico volume (0,1 ml/10g) de solução controle de NaCl 0,9%. Trinta minutos após os tratamentos, os animais foram colocados individualmente na arena do campo aberto e, imediatamente, após no Labirinto em Cruz Elevado para a medida dos níveis de atividade geral e ansiedade conforme descritos nos itens 4.5.4 e 4.5.5 do materiais e métodos. As doses de MDMA e o tempo de latência para as observações foram embasadas em dados de literatura (Navarro et al., 2004; McGregor et al., 2003; Thompson et al., 2004).

A tabela 1 apresenta e a figura 8 ilustra os efeitos das diferentes doses de MDMA na atividade geral de camundongos avaliados no campo aberto. Resumidamente os resultados demonstraram uma interação entre as diferentes doses de MDMA na locomoção total e na locomoção desenvolvida pelos animais nas zonas externa e tigmotóxica deste aparelho.

Especificamente pudemos observar, que a administração de MDMA nas doses de 5,0, 10,0 e 20,0 mg/kg aumentou a locomoção total dos animais em relação àquela observada no grupo controle ($F_{(5,42)} = 30.786$; $p \leq 0,001$). Observamos também, que a administração de MDMA 10,0 e 20,0 mg/kg, aumentou a locomoção total dos animais em relação aos animais dos grupos tratados com MDMA 0,2 mg/kg e 1,0 mg/kg ($F_{(5,42)} = 30.786$; $p \leq 0,001$). Ao analisarmos a locomoção nas zonas interna, média, periférica e tigmotóxica, verificamos que os tratamentos com MDMA 5,0, 10,0 e 20,0 mg/kg aumentaram a locomoção desenvolvida nas zonas periférica e tigmotóxica quando comparada à do grupo controle (KW = 36.071; $p \leq 0,01$ e KW = 26,603; $p \leq 0,05$ respectivamente).

TABELA 1 – Efeitos da administração intraperitoneal, de diferentes doses de MDMA, na locomoção de camundongos avaliada no campo aberto.

LOCOMOÇÃO (cm)	C	E1	E2	E3	E4	E5
	1676,8	1916,2	2049,6	3640,3	3973,6	3862,7
Total	±	±	±	±	±	±
	417,0	285,2	574,2	503,9 ^(1,2,3)	842,5 ^(1,2,3)	510,3 ^(1,2,3b)
	176,2	183,0	256,5	211,2	162,4	206,1
Zona Interna	±	±	±	±	±	±
	67,8	44,6	57,3	108,0	73,6	73,1
	444,3	450,0	343,6	606,6	571,0	717,1
Zona Média	±	±	±	±	±	±
	94,5	98,1	196,1	232,3	262,9	380,6
	593,5	707,0	687,2	1559,7	1645,6	1749,6
Zona Periférica	±	±	±	±	±	±
	200,4	102,2	134,6	379,7 ^(1,2)	528,7 ^(1,2,3)	386,7 ^(1,2,3)
	543,3	591,1	721,2	1316,2	1607,3	1204,9
Zona Tigmotóxica	±	±	±	±	±	±
	219,7	146,3	219,4	610,3 ⁽¹⁾	610,5 ^(1,2)	449,7 ⁽¹⁾

Os dados representam as médias ± desvio padrão.

C = controle; E1 = 0,2 mg/kg; E2 = 1,0 mg/kg; E3 = 5,0 mg/kg; E4 = 10,0 mg/kg; E5 = 20,0 mg/kg

⁽¹⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo C, ⁽²⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo E1 e ⁽³⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo E2; N = 8 animais por grupo. Teste de Tukey-Kramer e de Kruskal Wallis.

FIGURA 8 -Efeitos da administração de MDMA na atividade geral de camundongos, avaliada no campo aberto. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão. N= 8 camundongos por grupo. ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ em relação ao controle, ⁽²⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com MDMA 0,2 mg/kg e ⁽³⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com MDMA 1,0 mg/kg. Teste de Tukey-kramer e de Kruskal Wallis.

A tabela 2 apresenta e a figura 9 ilustra os efeitos das diferentes doses de MDMA sobre a frequência de levantar e velocidade média desenvolvida pelos camundongos no campo aberto.

Animais tratados com 5,0, 10,0 e 20,0 mg/kg de MDMA apresentaram menor frequência de levantar quando comparados aos do grupo controle ($F_{(5,42)} = 15.398$; $p \leq 0,001$) e aos dos

grupos tratados com MDMA 0,2 e 1,0 mg/kg ($F_{(5,42)} = 15.398$; $p \leq 0,01$) e aumento da velocidade média na arena, quando comparados aos do grupo controle e àqueles tratados com MDMA 0,2 e 1,0 mg/kg ($F_{(5,42)} = 30,785$; $p \leq 0,001$, $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,001$ respectivamente).

TABELA 2 – Efeitos da administração intraperitoneal, de diferentes doses de MDMA, sobre a frequência de levantar e velocidade média de camundongos observados no campo aberto.

Parâmetros	C	E1	E2	E3	E4	E5
Frequência de levantar	34,1	28,1	24,5	7,9	5,1	6,3
	±	±	±	±	±	±
	13,4	10,3	8,8	6,1 ^(1,2,3)	5,7 ^(1,2,3)	8,5 ^(1,2,3)
Velocidade Média	5,6	6,4	6,8	12,1	13,3	12,8
	±	±	±	±	±	±
	1,4	1,0	1,9	1,7 ^(1,2,3)	2,8 ^(1,2,3)	1,7 ^(1,2,3)

Os dados representam as médias ± desvio padrão.

C = controle; E1 = 0,2 mg/kg; E2 = 1,0 mg/kg; E3 = 5,0 mg/kg; E4 = 10,0 mg/kg; E5 = 20,0 mg/kg

⁽¹⁾ - $p < 0,001$ em relação ao grupo C, ⁽²⁾ - $p < 0,001$ em relação ao grupo tratado com MDMA 0,2 mg/kg e

⁽³⁾ - $p < 0,01$ em relação ao grupo tratado com MDMA 1,0 mg/kg. N = 8 animais por grupo. Teste de Tukey-Kramer.

FIGURA 9 - Efeitos da administração de MDMA na frequência de levantar e velocidade média de camundongos, avaliado no campo aberto. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 8 camundongos por grupo; ⁽¹⁾ - $p < 0,001$ - em relação ao grupo controle, ⁽²⁾ $p < 0,001$ em relação ao grupo tratado com MDMA 0,2 mg/kg e ⁽³⁾ $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com MDMA 1,0 mg/kg. Teste de Tukey-kramer.

A tabela 3 apresenta e a figura 10 ilustra os efeitos das diferentes doses de MDMA no número de movimentos iniciados e no tempo gasto em movimento no interior do campo aberto. Observamos que animais tratados com MDMA 5,0, 10,0 e 20,0 mg/kg apresentaram menos movimentos do que os animais do grupo tratado com salina ($F_{(5,42)} = 19,788$; $p \leq 0,001$) e MDMA 0,2 mg/kg e 1,0 mg/kg ($F_{(5,42)} = 19,788$; $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,01$ respectivamente). Observamos, ainda, nos animais tratados com MDMA 5,0, 10,0 e 20,0 mg/kg um aumento no tempo gasto em movimento tanto em relação aos do grupo controle ($F_{(5,42)} = 41,136$; $p \leq 0,001$) como àqueles dos grupos tratados com MDMA 0,2 e 1,0 mg/kg ($F_{(5,42)} = 41,136$; $p \leq 0,001$).

TABELA 3 – Efeitos da administração intraperitoneal, de diferentes doses de MDMA, sobre o número e tempo de movimentos iniciados por camundongos avaliado no interior do campo aberto.

Parâmetros	C	E1	E2	E3	E4	E5
Número de Movimentos	62,8	54,9	57,5	46,4	35,9	44,0
	±	±	±	±	±	±
	7,4	5,9	5,6	6,4 ^(1,3)	3,7 ^(1,2,3)	6,6 ^(1,2,3)
Tempo Gasto Em Movimento	73,4	94,8	111,6	235,9	238,0	235,3
	±	±	±	±	±	±
	32,3	36,2	53,6	21,0 ^(1,2,3)	33,0 ^(1,2,3)	24,1 ^(1,2,3)

Os dados representam as médias ± desvio padrão.

C = controle; E1 = 0,2 mg/kg; E2 = 1,0 mg/kg; E3 = 5,0 mg/kg; E4 = 10,0 mg/kg; E5 = 20,0 mg/kg

⁽¹⁾ - $p < 0,001$ em relação ao grupo C, ⁽²⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo E1 e ⁽³⁾ - $p < 0,01$ em relação ao grupo E2. N = 8 animais por grupo. Teste de Tukey-Kramer.

FIGURA 10 -Efeitos da administração de MDMA no número de movimentos iniciados e no tempo gasto em movimento por camundongos, no campo aberto. Os dados representam as médias ± desvio padrão de 8 camundongos por grupo; ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo controle, ⁽²⁾ - $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado com MDMA 0,2 mg/kg e ⁽³⁾ - $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado com MDMA 1,0 mg/kg. Teste de Tukey-kramer.

A tabela 4 apresenta e a figura 11 ilustra os efeitos das diferentes doses de MDMA sobre a porcentagem de entradas nos braços abertos (%EA) e sobre a taxa de permanência nos braços abertos (%TA) do labirinto em cruz elevado (LCE). Analisando-se os dados podemos observar que animais tratados com MDMA 10,0 e 20,0 mg/kg apresentaram um aumento na porcentagem de entrada nos braços abertos (%EA) em relação aos do grupo controle ($F_{(5,42)} = 10,001$; $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,05$ respectivamente). Neste sentido observou-se, também, a existência de diferenças nos efeitos produzidos pela dose de 10,0 mg/kg em relação àquela produzida por 0,2 mg/kg. ($F_{(5,42)} = 10,001$; $p \leq 0,01$). Foram observados aumentos na taxa de permanência nos braços abertos (%TA) dos animais tratados com MDMA 10,0 e 20,0 mg/kg em relação aos do grupo controle ($KW = 25,811$; $p \leq 0,01$) e grupo tratado com MDMA 0,2 mg/kg ($KW = 25,811$; $p \leq 0,05$).

TABELA 4 – Efeitos da administração intraperitoneal, de diferentes doses de MDMA, sobre a porcentagem de entrada nos braços abertos (%EA) e a taxa de permanência nos braços abertos (%TA) de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevados (LCE).

Braços Abertos	C	E1	E2	E3	E4	E5
% de Entrada	26,5	36,2	41,8	34,2	68,2	49,7
	±	±	±	±	±	±
	11,1	12,8	11,3	11,6	16,8 ^(1,2,3,4)	14,1 ⁽¹⁾
% de Permanência	22,8	25,1	31,3	32,2	77,2	87,9
	±	±	±	±	±	±
	8,4	9,5	12,6	18,3	28,4 ^(1,2)	8,6 ^(1,2)

Os dados representam as médias ± desvio padrão.

C = controle; E1 = 0,2 mg/kg; E2 = 1,0 mg/kg; E3 = 5,0 mg/kg; E4 = 10,0 mg/kg; E5 = 20,0 mg/kg

⁽¹⁾ - $p < 0,001$ em relação ao grupo C, ⁽²⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo E1, ⁽³⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo E2 e ⁽⁴⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo E3; N = 8 animais por grupo. Teste de Tukey-Kramer.

FIGURA 11 - Efeitos da administração de MDMA na porcentagem de entrada (%EA) e taxa de permanência (%TA) nos braços abertos no labirinto em cruz elevado (LCE). Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 8 camundongos por grupo; ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo controle, ⁽²⁾ - $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado com MDMA 0,2 mg/kg, ⁽³⁾ - $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado com MDMA 1,0 mg/kg e ⁽⁴⁾ - $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado com MDMA 1,0 mg/kg. Teste de Tukey-kramer e de Kruskal Wallis.

A tabela 5 apresenta e a figura 12 ilustra os efeitos das diferentes doses intraperitoneais de MDMA sobre a porcentagem de entrada nos braços fechados (%EF) e sobre a taxa de permanência nos braços fechados (%TF) do labirinto em cruz elevado (LCE). Analisando-se os dados, foi possível observar que animais tratados com MDMA 10,0 mg/kg apresentaram menor porcentagem de entradas nos braços fechados (%EA) quando comparados àqueles do grupo controle ($F_{(5,42)} = 6,880$; $p \leq 0,001$). Observamos, também, uma diminuição na taxa de permanência nos braços fechados (%TF) dos animais tratados com MDMA 10,0 e 20,0 mg/kg em relação aos do grupo tratado solução controle de NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) ($F_{(5,42)} = 6,880$; $p \leq 0,001$) e aos dos grupos tratados com MDMA 0,2, 1,0 e 5,0 mg/kg ($F_{(5,42)} = 6,880$; $p \leq 0,001$, $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,01$ respectivamente). Por fim, observamos um aumento na locomoção total dos animais tratados com MDMA 10,0 e 20,0 mg/kg no LCE quando comparados aos animais dos grupos tratados com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) e MDMA 0,2, 1,0 e 5,0 mg/kg ($F_{(5,42)} = 6,435$; $p \leq 0,01$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,01$ respectivamente). A figura 13, por fim mostra um aumento da locomoção total dos animais tratados com MDMA 10,0 e 20,0 mg/kg em relação àquelas observadas nos grupos controle e tratados com MDMA 0,2, 1,0 e 5,0 mg/kg ($F_{(5,42)} = 7,620$; $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$, $p \leq 0,001$, e $p \leq 0,05$ respectivamente).

TABELA 5 – Efeitos da administração intraperitoneal, de diferentes doses de MDMA, sobre a porcentagem de entrada nos braços fechados (%EF) e a taxa de permanência nos braços fechados (%TF) de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevados (LCE).

Braços Fechados	C	E1	E2	E3	E4	E5
% de Entrada	68,9	63,7	58,2	69,9	31,8	54,9
	±	±	±	±	±	±
	15,1	12,8	11,3	14,4	16,8 ^(1,2,3,4)	19,3 ⁽⁵⁾
% de Permanência	82,2	79,9	73,6	76,8	38,5	11,9
	±	±	±	±	±	±
	12,9	14,6	17,5	24,5	21,3 ^(1,2)	8,5 ^(1,2)

Os dados representam as médias ± desvio padrão.

C = controle; E1 = 0,2 mg/kg; E2 = 1,0 mg/kg; E3 = 5,0 mg/kg; E4 = 10,0 mg/kg; E5 = 20,0 mg/kg

⁽¹⁾ - $p < 0,001$ em relação ao grupo C, ⁽²⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo E1, ⁽³⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo E2, ⁽⁴⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo E3 e ⁽⁵⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo E4. N = 8 animais por grupo. Teste de Tukey-Kramer.

FIGURA 12- Efeitos da administração de MDMA na porcentagem de entrada (%EA) e taxa de permanência (%TA) nos braços abertos no labirinto em cruz elevado (LCE). Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 8 camundongos por grupo; ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo controle, ⁽²⁾ - $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado com MDMA 0,2 mg/kg, ⁽³⁾ - $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado com MDMA 1,0 mg/kg, ⁽⁴⁾ - $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado com MDMA 5,0 mg/kg e ⁽⁵⁾ - $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado com MDMA 10,0 mg/kg. Teste de Tukey-kramer.

FIGURA 13 - Efeitos da administração de MDMA na locomoção total de camundongos no labirinto em cruz elevado. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 8 camundongos por grupo. ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo controle, ⁽²⁾ - $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado com MDMA 0,2 mg/kg, ⁽³⁾ - $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado com MDMA 1,0 mg/kg e ⁽⁴⁾ - $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado com MDMA 5,0 mg/kg. Teste de Tukey-kramer.

6.2 Experimento 2: Caracterização dos efeitos da administração de MDMA 5,0 e 10,0 mg/kg sobre a atividade exploratória em um *hole-board*.

Trinta camundongos foram distribuídos ao acaso em 3 grupos iguais: um grupo controle (C) e dois grupos experimentais (E1 e E2). Os animais do grupo experimental foram tratados pela via intraperitoneal com doses crescentes de MDMA, a saber: 5,0 e 10,0 mg/kg. Os animais do grupo controle receberam, por mesma via, idêntico volume (0,1 ml/10g) de solução controle de NaCl 0,9%. Trinta minutos após as administrações, os animais foram colocados individualmente na arena do *hole-board* para a medida da atividade exploratória conforme descrito no item 4.5.6.

A tabela 6 apresenta e a figura 14 ilustra os efeitos das diferentes doses de MDMA sobre a distância total percorrida pelos camundongos no *Hole-Board*. Analisando-se os dados podemos observar que nos animais dos grupos que receberam 5,0 e 10,0 mg/kg de MDMA tiveram um aumento na atividade locomotora, em relação àquelas dos animais do grupo controle ($F_{(2,27)} = 29,277$; $p \leq 0,001$); observou-se também, nestas doses um aumento da velocidade média desenvolvida no interior do aparelho, quando comparada àquela do grupo controle ($F_{(2,27)} = 29,277$; $p \leq 0,001$).

TABELA 6 – Efeitos da administração intraperitoneal, de diferentes doses de MDMA, sobre a locomoção total e velocidade média de camundongos observados no *Hole-Board* (HB).

Parâmetros	C	E1	E2
Locomoção Total (cm)	1573,4 ± 441,5	2649,2 ± 352,7 ⁽¹⁾	3010,6 ± 467,0 ⁽¹⁾
Velocidade Média (cm/s)	5,2 ± 1,5	8,8 ± 1,2 ⁽¹⁾	10,0 ± 1,6 ⁽¹⁾

Os dados representam as médias ± desvio padrão.

C = controle; E1 = 5,0 mg/kg; E2 = 10,0 mg/kg;

⁽¹⁾ - $p < 0,001$ em relação ao controle. N = 10 animais por grupo. Teste de Tukey-Kramer.

FIGURA 14- Efeitos da administração de MDMA na locomoção total e velocidade média de camundongos no *Hole-Board*. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 10 camundongos por grupo; ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo controle. Teste de Tukey-kramer.

A tabela 7 apresenta e a figura 15 ilustra os efeitos das diferentes doses de MDMA sobre o movimento exploratório de cabeça e ombro (*head-dipping*), como também, sobre o tempo gasto com este parâmetro por camundongos avaliados no *Hole-Board*. Analisando-se os dados podemos observar que animais tratados com MDMA 5,0 e 10,0 mg/kg apresentaram uma diminuição do número (KW = 19,570; $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,001$ respectivamente) e tempo gasto (KW = 19,570; $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,001$ respectivamente) de *head-dippings*, quando comparado aos animais do grupo controle.

TABELA 7 – Efeitos da administração intraperitoneal, de diferentes doses de MDMA, sobre o tempo e número de mergulhos de cabeça de camundongos avaliado no *Hole-Board* (HB).

<i>Head - Dipping</i>	C	E1	E2
Tempo (s)	54,9 ± 20,7	7,6 ± 5,3 ⁽¹⁾	4,0 ± 0,4 ⁽¹⁾
Número (n)	61,9 ± 19,2	7,1 ± 8,9 ⁽¹⁾	4,7 ± 0,8 ⁽¹⁾

Os dados representam as médias ± desvio padrão.

C = controle; E1 = 5,0 mg/kg; E2 = 10,0 mg/kg;

⁽¹⁾ - $p < 0,001$ em relação ao controle. N = 10 animais por grupo. Teste de Kruskal - Wallis.

FIGURA 15- Efeitos da administração de MDMA no número e tempo gasto de *head-dipping* por camundongos, avaliado no *Hole-Board*. Os dados representam as médias ± desvio padrão de 10 camundongos por grupo; ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo controle. Teste de Kruskal - Wallis.

6.3 Experimento 3: Caracterização dos efeitos da administração de MDMA sobre o teste de exposição a presença de um rato.

Dezesseis camundongos foram distribuídos ao acaso em 2 grupos iguais: um grupo controle (C) e um grupo experimental (E1). Os animais do grupo experimental E1 foram tratados pela via intraperitoneal com dose de 10,0 mg/kg de MDMA. Os animais do grupo controle receberam idêntico volume (0,1 ml/10g) de solução controle de NaCl 0,9%. Trinta minutos após as administrações, os animais foram colocados individualmente na arena da caixa de exposição, sendo testados quanto a presença de um rato, conforme o item 4.5.7.

A tabela 8 apresenta e a figura 16 ilustra os efeitos da administração de MDMA sobre o tempo de permanência na caixa de saída e túnel de acesso à arena de camundongos na caixa de exposição ao predador no dia do teste. Como podemos observar, a administração de MDMA 10,0 mg/kg aumentou o tempo de permanência dos animais na caixa de saída, ($t = 3,032$; $p \leq 0,001$) assim como o tempo de permanência no túnel de acesso a arena ($U = 55.000$; $p \leq 0,001$) em relação aos animais do grupo controle.

TABELA 8 – Efeitos da administração, de 10,0 MDMA mg/kg de sobre o tempo de permanência na caixa de saída e túnel de acesso à arena de camundongos avaliados na caixa de exposição ao predador.

Tempo (s)	C	E1
Caixa de Saída	308,3 ± 141,1	495,7 ± 87,7 ⁽¹⁾
Túnel de Acesso	73,3 ± 30,0	17,85 ± 16,3 ⁽¹⁾

Os dados representam as médias ± desvio padrão.

C = controle; E1 = 10,0 mg/kg de MDMA.

⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo controle.

N = 8 animais por grupo. Teste “t” de *Student*.

FIGURA 16 - Efeitos da administração de MDMA 10,0 mg/kg no tempo de permanência na caixa de saída e túnel de acesso de camundongos, avaliada na caixa de exposição ao predador. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 8 camundongos por grupo. - ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo controle. Teste “t” de *Student* e teste U` de Mann – Whiteny.

A tabela 9 apresenta e a figura 17 ilustra os efeitos do MDMA sobre o número de entrada nas zonas interna e periférica da arena de camundongos avaliados na caixa de exposição ao predador. Observamos que os animais tratados com o MDMA (10,0 mg/kg) apresentaram menor número de entradas nas zonas interna ($t = 3,500$; $p \leq 0,001$) e periférica ($U = 56,000$ e $p \leq 0,001$) quando comparados aos dos grupo controle.

TABELA 9 – Efeitos da administração, de 10,0 mg/kg de MDMA, sobre número de entradas de camundongos nas zonas interna e periférica da caixa de exposição ao predador.

Parâmetros	C	E1
Número de Entrada (n) - Zona Interna	$8,7 \pm 4,2$	$2,4 \pm 2,2$ ⁽¹⁾
Número de Entrada (n) - Zona Periférica	$7,6 \pm 3,0$	$1,3 \pm 0,8$ ⁽¹⁾

Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão.

C = controle; E1 = MDMA - 10,0 mg/kg.

⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo controle.

N = 8 animais por grupo. Teste “t” de *Student*.

FIGURA 17 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número de entradas de camundongos nas zonas interna e periférica da caixa de exposição ao predador. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 8 camundongos por grupo; - ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ em relação ao controle. Teste “t” de student e teste U’ de Mann – Whiteny.

A tabela 10 apresenta e a figura 18 ilustra os efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número e tempo gasto em movimentos de autolimpeza na caixa de exposição ao predador. Observamos que os animais que foram tratados com MDMA 10,0 mg/kg passaram menos tempo realizando movimentos de autolimpeza ($U = 52,500$ e $p \leq 0,001$) quando comparados aos animais do grupo controle. Por outro lado não foram observadas diferenças significantes entre os grupos quanto ao número de *grooming*.

TABELA 10 – Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número e tempo gasto realizando o movimento de autolimpeza, avaliados na caixa de exposição ao predador.

Grooming	C	E1
Número (n)	4,1 ± 2,3	4,0 ± 2,9 ⁽¹⁾
Tempo Gasto (s)	37,8 ± 14,5	9,6 ± 4,6 ⁽¹⁾

Os dados representam as médias ± desvio padrão.

C = controle; E1 = MDMA - 10,0 mg/kg.

⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo controle.

N = 8 animais por grup. Teste “t” de Student.

FIGURA 18- Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA no número e tempo gasto realizando *grooming* de camundongos, avaliados na caixa de exposição ao predador. Os dados representam as médias ± desvio padrão de 8 camundongos por grupo; - ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ em relação ao controle. Teste U' de Mann – Whiteny.

A tabela 11 apresenta e a figura 19 ilustra os efeitos da administração de MDMA 10,0 mg/kg sobre o número de acessamentos de risco de camundongos, avaliados na caixa de exposição ao predador. Observamos que animais tratados com MDMA 10,0 mg/kg apresentaram uma redução deste parâmetro em relação aos dos animais do grupo controle ($t = 2,375$ e $p \leq 0,05$).

TABELA 11– Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número de acessamentos de risco de camundongos, avaliados na caixa de exposição ao predador.

Acesso de Risco	C	E1
Número (n)	$8,7 \pm 4,2$	$2,4 \pm 2,2^{(1)}$

Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão.

C = controle; E1 = MDMA 10,0 mg/kg.

⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo controle.

N = 8 animais por grupo. Teste “t” de *Student*.

FIGURA 19- Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA no número de acessamento de risco de camundongos, avaliados na caixa de exposição ao predador. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 8 camundongos por grupo; - ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ em relação ao controle. Teste “t” de *Student*.

6.4 Experimento 4: Caracterização dos efeitos da administração de MDMA 10,0 mg/kg sobre o teste de exposição ao odor de gatos na caixa de exposição ao predador.

Vinte camundongos foram distribuídos ao acaso em 2 grupos iguais: um grupo controle (C) e um grupo experimental (E1). Os animais do grupo experimental E1 foram tratados pela via intraperitoneal com dose de 10,0 mg/kg de MDMA. Os animais do grupo controle receberam idêntico volume (0,1 ml/10g) de solução controle de NaCl 0,9%. Trinta minutos após as administrações, os animais foram colocados individualmente na arena da caixa de exposição sendo testados em relação ao odor de gato, o item 4.5.7.

A tabela 12 apresenta e a figura 20 ilustra os efeitos da administração de MDMA sobre o tempo de permanência na caixa de saída e no túnel de acesso à arena de camundongos expostos ao odor de gato. Como pode ser observada, a administração de MDMA 10,0 mg/kg aumentou a permanência dos animais na caixa de saída, em relação àquela observada nos animais do grupo controle ($t = 7.843$; $p \leq 0,001$). Por outro lado, ao analisarmos o tempo de permanência no túnel de acesso a arena, verificamos que os animais tratados com MDMA 10,0 mg/kg permaneceram menos tempo em relação aos animais do grupo controle ($t = 6,063$; $p \leq 0,001$).

TABELA 12– Efeitos da administração, de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o tempo de permanência na caixa de saída e no túnel de acesso à arena de camundongos expostos ao odor de gatos, avaliada na caixa de exposição ao predador.

Tempo (s)	C	E1
Caixa de Moradia	369,4 ± 48,0	519,6 ± 36,6 ⁽¹⁾
Túnel de Acesso	63,8 ± 12,5	25,4 ± 15,6 ⁽¹⁾

Os dados representam as médias ± desvio padrão.

C = controle; E1 = MDMA - 10,0 mg/kg.

⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo controle.

N = 10 animais por grupo; teste “t” de *Student*.

FIGURA 20 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA no tempo de permanência na caixa de moradia e túnel de acesso de camundongos, expostos ao odor de gatos, avaliada na caixa de exposição ao predador. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 10 camundongos por grupo; - ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Teste “t” de *Student*.

A tabela 13 apresenta e a figura 21 ilustra os efeitos do MDMA 10,0 mg/kg sobre o número de entrada nas zonas interna e periférica da arena de camundongos expostos ao odor de gatos, avaliados na caixa de exposição ao predador. Podemos observar que animais tratados com MDMA 10,0 mg/kg apresentaram menor o número de entradas nas zonas interna ($t = 4,951$; $p \leq 0,001$) e periférica ($t = 4,610$ e $p \leq 0,001$) do aparelho quando comparado aos do grupo controle.

TABELA 13 – Efeitos da administração, de 10,0 mg/kg de MDMA, sobre número de entradas de camundongos nas zonas interna e periférica da caixa de exposição ao predador na presença do odor de gatos.

Parâmetros	C	E1
Número de Entrada Zona Interna	7,2 $\pm$ 2,3	2,6 $\pm$ 1,9 ⁽¹⁾
Número de Entrada Zona Periférica	3,7 $\pm$ 0,7	1,5 $\pm$ 0,8 ⁽¹⁾

Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão.

C = controle; E1 = MDMA 10,0 mg/kg.

⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo controle.

N = 10 animais por grupo. Teste “t” de *Student*.

FIGURA 21 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA no número de entradas de camundongos nas zonas interna e periférica da caixa de exposição ao predador na presença do odor de gatos. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 10 camundongos por grupo; - ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Teste “t” de student.

A **TABELA 14** apresenta e a **FIGURA 22** ilustra os efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número e o tempo de autolimpeza, de camundongos expostos ao odor de gatos e avaliados na caixa de exposição ao predador. Analisando-se os dados podemos observar que nos animais tratados com MDMA 10,0 mg/kg permaneceram menos tempo realizando autolimpeza que os animais do grupo controle ($U = 95,000$ e $p \leq 0,001$). Não foram observadas diferenças significantes entre os dois grupos no número de movimentos de *grooming*.

TABELA 14 – Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número e o tempo gasto em autolimpeza de camundongos expostos ao odor de gato, avaliados na caixa de exposição ao predador.

Grooming	C	E1
Número (n)	4,1 ± 2,1	4,5 ± 2,0 ⁽¹⁾
Tempo Gasto (s)	38,5 ± 13,0	9,8 ± 4,8 ⁽¹⁾

Os dados representam as médias ± desvio padrão.

C = controle; E1 = MDMA 10,0 mg/kg.

⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo controle.

N = 10 animais por grupo. Teste U` de Mann – Whiteny.

FIGURA 22- Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA no número e o tempo gasto realizando *grooming* de camundongos, avaliados na caixa de exposição ao odor de gato. Os dados representam as médias ± desvio padrão de 10camundongos por grupo; - ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ em relação ao controle. Teste U` de Mann – Whiteny.

A tabela 15 apresenta e a figura 23 ilustra os efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número de acessamento de risco de camundongos expostos ao odor de gatos e avaliados na caixa de exposição ao predador. Uma redução deste parâmetro foi observada nos animais tratados com MDMA 10,0 mg/kg quando comparados aos do grupo controle ($t = 3,791$ e $p \leq 0,001$).

TABELA 15– Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número de acessamento de risco de camundongos expostos ao odor de gatos avaliados na caixa de exposição ao odor do predador.

Acesso de Risco	C	E1
Número (n)	3,7 ± 0,9	2,0 ± 1,1 ⁽¹⁾

Os dados representam as médias ± desvio padrão.

C = controle; E1 = MDMA 10,0 mg/kg.

⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo controle.

N = 10 animais por grupo. Teste “t” de *Student*.

FIGURA 23– Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA no número de acessamento de risco de camundongos expostos ao odor de gatos avaliados na caixa de exposição ao predador. Os dados representam as médias ± desvio padrão de 10 camundongos por grupo; - ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Teste “t” de *Student*.

6.5 Experimento 5: Caracterização dos efeitos agudos do MDMA 5,0 e 10,0 mg/kg sobre os níveis e “turnover” hipotalâmicos, corticais e estriatais de serotonina e dopamina.

Trinta camundongos foram distribuídos ao acaso em 3 grupos: um grupo controle (C) e dois grupos experimentais (E1 e E2). Os animais dos grupos experimentais foram tratados pela via intraperitoneal com 5,0 mg/kg e 10 mg/kg de MDMA respectivamente. Os animais do grupo controle receberam idêntico volume (0,1 ml/10g) de solução salina (NaCl 0,9%). Trinta minutos após os tratamentos, eles foram eutanasiados em câmara de CO₂, após este procedimento, foi colhido o cérebro para remoção do hipotálamo, córtex-frontal e do estriado para dosagem dos níveis e “turnover” de serotonina, dopamina e noradrenalina. As dosagens foram feitas conforme descrito nos itens 4.6.1 e 4.6.2.

A tabela 16 apresenta e as figuras 24 a 32 ilustram os efeitos de diferentes doses de MDMA sobre os níveis e “turnover” hipotalâmicos, estriatais e corticais de noradrenalina, serotonina e dopamina. Observamos que a administração de MDMA 5,0 e 10,0 mg/kg aumentou os níveis estriatais de dopamina em relação aos animais do grupo controle (KW=15,290 e $p \leq 0,02$ e $p \leq 0,001$ respectivamente). No mesmo sentido, um aumento dos níveis de DOPAC também foi observado no estriado dos animais tratados com MDMA 10,0 mg/kg ($F_{(2,27)} = 3.158$ e $p \leq 0,05$). Para análise adicional avaliamos o “turnover” de dopamina (DOPAC/DA) e observamos que os tratamentos com MDMA 5,0 e 10,0 mg/kg diminuíram este parâmetro (KW = 18,222 - $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,001$ respectivamente) nesta região em relação aos camundongos do grupo controle. Em relação aos níveis corticais e hipotalâmicos de dopamina dos camundongos, não foram observadas diferenças significantes quando comparados àquelas dos animais do grupo controle. Evidenciamos também, no córtex frontal, uma diminuição dos níveis de DOPAC após tratamentos com MDMA 5,0 e 10,0 mg/kg ($F_{(2,27)} = 7,741$; $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,01$), bem como uma diminuição do “turnover” de dopamina (HVA/DA – KW = 9,215; $p \leq 0,05$ e DOPAC/DA - $F_{(2,27)} = 10,730$; $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,001$ respectivamente) ambos, em relação aos dos animais do grupo controle.

Não foram observadas diferenças significantes nos níveis hipotalâmicos e corticais de serotonina entre os animais dos grupos experimentais e controle. Porém, ao analisarmos os níveis estriatais de serotonina nos animais tratados com MDMA 5,0 mg/kg observamos uma diminuição deste parâmetro ($F_{(2,27)} = 18,544$; $p \leq 0,05$) quando comparados aos animais do grupo

controle; por outro lado, o tratamento com MDMA 10,0 mg/kg aumentou os níveis estriatais de serotonina em relação aos grupos controle e tratado com 5,0 mg/kg de MDMA ($F_{(2,27)} = 9,626$; $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,001$ respectivamente). Observamos também, uma diminuição dos níveis hipotalâmico de 5HIAA dos animais tratados com MDMA 5,0 e 10,0 mg/kg ($F_{(2,27)} = 7,667$; $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,05$), bem como do “*turnover*” de serotonina no hipotálamo ($5HIAA/5HT - F_{(2,27)} = 28,784$; $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,001$ respectivamente), em relação aos dos animais do grupo controle. Por fim, observamos um aumento dos níveis estriatais e corticais de noradrenalina dos animais tratados com MDMA 5,0 e 10,0 mg/kg, quando comparado aos do grupo controle (estriado - $F_{(2,27)} = 6,308$; $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,05$ respectivamente e córtex frontal - $F_{(2,27)} = 7,713$; $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,01$ respectivamente).

FIGURA 24- Efeitos da administração intraperitoneal de MDMA 5,0 e 10 mg/kg sobre os níveis hipotalâmicos, estriatais e corticais de noradrenalina. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 10 camundongos por grupo ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Teste de Tukey-Kramer e de Kruskal Wallis.

FIGURA 25- Efeitos da administração intraperitoneal de MDMA 5,0 e 10 mg/kg sobre os níveis hipotalâmicos, estriatais e corticais de dopamina. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 10 camundongos por grupo ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Teste de Tukey-Kramer e de Kruskal Wallis.

FIGURA 26- Efeitos da administração intraperitoneal de MDMA 5,0 e 10 mg/kg sobre os níveis hipotalâmicos, estriatais e corticais de HVA. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 10 camundongos por grupo. Teste de Tukey-Kramer e de Kruskal Wallis.

FIGURA 27- Efeitos da administração intraperitoneal de MDMA 5,0 e 10 mg/kg sobre os níveis hipotalâmicos, estriatais e corticais de DOPAC. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 10 camundongos por grupo. ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Teste de Tukey-Kramer e de Kruskal Wallis.

FIGURA 28 – Efeitos da administração intraperitoneal de MDMA 5,0 e 10 mg/kg sobre o “turnover” hipotalâmico, estriatal e cortical de dopamina. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 10 camundongos por grupo. ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Teste de Tukey-Kramer e de Kruskal Wallis.

FIGURA 29- Efeitos da administração intraperitoneal de MDMA 5,0 e 10 mg/kg sobre o “turnover” hipotalâmico, estriatal e cortical de dopamina. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 10 camundongos por grupo. ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Teste de Tukey-Kramer de Kruskal Wallis.

FIGURA 30- Efeitos da administração intraperitoneal de MDMA 5,0 e 10 mg/kg sobre os níveis hipotalâmicos, estriatais e corticais de serotonina. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 10 camundongos por grupo. ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e ⁽²⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo E1 (MDMA 5,0 mg/kg). Teste de Tukey-Kramer.

FIGURA 31- Efeitos da administração intraperitoneal de MDMA 5,0 e 10 mg/kg de MDMA, sobre os níveis hipotalâmicos, estriatais e corticais de 5HIAA. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 10 camundongos por grupo. ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e ⁽²⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo E1 (MDMA 5,0 mg/kg). Teste de Tukey-Kramer.

FIGURA 32 - Efeitos da administração intraperitoneal de MDMA 5,0 e 10 mg/kg sobre o “turnover” hipotalâmico, estriatal e cortical de serotonina. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 10 camundongos por grupo. ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ em relação ao controle. Teste de Tukey-Kramer.

6.6 Experimento 6: Caracterização dos efeitos do MDMA 5,0 e 10,0 mg/kg sobre os níveis séricos de corticosterona.

Setenta camundongos foram distribuídos ao acaso em 7 grupos iguais: um grupo controle (C) e seis grupos experimentais (E1, E2, E3, E4, E5 e E6). Os animais dos grupos experimentais foram tratados com doses de 5,0 e 10,0 mg/kg de MDMA. Os animais do grupo E1, E2 e E3 receberam 5,0 mg/kg de MDMA 30, 60 e 120 minutos respectivamente antes da colheita. Os animais do grupo E4, E5 e E6 foram tratados conforme o protocolo descrito acima mas com 10,0 mg/kg de MDMA. Os animais do grupo controle receberam idêntico volume (0,1 ml/10g) de solução controle (NaCl 0,9%) 30 minutos antes da colheita. Após estes tratamentos o sangue foi colhido para dosagem de corticosterona conforme descrito nos itens 4.7, 4.7.1 e 4.7.2.

A tabela 17 apresenta e a figura 33 ilustra os níveis de corticosterona medidos 30, 60 e 120 minutos após a administração de 5,0 e 10,0 mg/kg de MDMA, em camundongos. Analisando-se os dados podemos observar que a administração de 5,0 e 10,0 mg/kg de MDMA, administrada 30 e 60 min. antes da colheita do soro, aumentou os níveis de corticosterona plasmática em relação aos valores medidos no grupo controle (KW = 38,890; $p \leq 0,001$). Análise adicional mostrou que os dados obtidos 120 min. após a administração de 10,0 mg/kg de MDMA permaneceram aumentados em relação aos animais do grupo controle (KW = 38,890; $p \leq 0,001$);

nenhuma diferença, no entanto, foi observada entre os grupos C e MDMA 5,0 mg/kg 120 minutos após a administração.

TABELA 17 – Efeitos da administração de 5,0 e 10,0 mg/kg de MDMA sobre os níveis de corticosterona sérica medidos trinta, sessenta e cento e vinte minutos após os tratamentos.

Corticosterona	C	E1	E2	E3	E4	E5	E6
	111,0	592,3	621,5	368,0	501,4	609,4	601,1
Ng/ml	±	±	±	±	±	±	±
	48,0	49,0 ⁽¹⁾	99,4 ⁽¹⁾	197,3	142,4 ⁽¹⁾	73,3 ⁽¹⁾	149,2 ⁽¹⁾

Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão.

C = controle; E1 – 5,0 mg/kg (30 minutos); E2 - 5,0 mg/kg (60 minutos), E3 -5,0 mg/kg (120 minutos), E4 – 10,0 mg/kg (30 minutos); E5 - 10,0 mg/kg (60 minutos) e E6 -10,0 mg/kg (120 minutos).

⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo controle. Teste de Kruskal Wallis.

FIGURA 33 - Efeitos da administração intraperitoneal de MDMA 5,0 e 10 mg/kg sobre os níveis séricos de corticosterona de camundongos medidos 30, 60 e 120 min após os tratamentos. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 10 camundongos por grupo ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ em relação ao controle. Teste de Kruskal Wallis.

6.7 Experimento 7: Caracterização dos efeitos do MDMA 10,0 mg/kg sobre os níveis séricos de corticosterona medidos 6 e 12 horas após a administração.

Trinta camundongos foram distribuídos ao acaso em 3 grupos iguais: um grupo controle (C) e dois grupos experimentais (E1 e E2). Os animais dos grupos experimentais foram tratados com MDMA 10,0 mg/kg, 6 (E1) e 12 (E2) horas antes da colheita. Os animais do grupo controle receberam idêntico volume (0,1 ml/10g) de solução controle (NaCl 0,9%) 6 h. antes da colheita. Após estes tratamentos o sangue foi colhido para dosagem de corticosterona conforme descrito nos itens 4.7, 4.7.1 e 4.7.2.

A tabela 18 apresenta e a figura 34 ilustra os níveis de corticosterona medidos 6 e 12 horas após a administração de MDMA 10,0 mg/kg, em camundongos. Analisando-se os dados obtidos, observamos que os níveis de corticosterona sérica permaneceram elevados 6 horas após o tratamento com MDMA, em relação aos valores medidos nos animais do grupo controle ($KW = 20,612$; $p \leq 0,05$). Observamos, também, o retorno dos níveis de corticosterona sérica aos valores basais 12 h. após a administração de MDMA (10,0 mg/kg).

TABELA 18 – Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA seis e doze horas antes da colheita do sangue para medida dos níveis de corticosterona sérica.

Corticosterona	C	E1	E2
Ng/ml	152,3 ± 37,2	333,8 ± 109,7 ⁽¹⁾	120,3 ± 27,6 ⁽²⁾

Os dados representam as médias ± desvio padrão.

C = controle; E1 – 10,0 mg/kg (6 horas); E2 - 10,0 mg/kg (12 horas).

⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo controle e ⁽²⁾ - $p < 0,001$ representa diferença quando comparado com o grupo E1. Teste de Kruskal Wallis.

FIGURA 34 - Efeitos da administração intraperitoneal, de 10 mg/kg de MDMA, sobre os níveis séricos de corticosterona de camundongos medidos 6 e 12 h após o tratamento. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 10 camundongos por grupo ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ em relação ao controle e ⁽²⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo MDMA 6 horas. Teste de Kruskal Wallis.

6.8 Experimento 8: Caracterização dos efeitos da administração de MDMA (5,0 e 10,0 mg/kg) sobre o número de leucócitos, eritrócitos e hematócrito de camundongos.

Vinte sete camundongos foram distribuídos ao acaso em 3 grupos iguais: um grupo controle (C) e dois grupos experimentais (E1 e E2). Os animais dos grupos experimentais E1 e E2 foram tratados pela via intraperitoneal com 5,0 e 10,0 mg/kg de MDMA, respectivamente. Os animais do grupo controle receberam idêntico volume (0,1 ml/10g) de solução controle de NaCl 0,9%. Trinta minutos após as administrações, os animais tiveram seus sangues coletados e analisados por meio de um contador automático de células conforme o item 4.8.

A tabela 19 apresenta e a figura 35 ilustra os efeitos da administração de MDMA sobre o número total de glóbulos brancos, glóbulos vermelhos, hematócrito e plaquetas de camundongos. Ao analisarmos os dados verificamos que tratamentos com MDMA (5,0 e 10,0 mg/kg) aumentou o número total de leucócitos no sangue periférico, em relação ao observado nos animais do grupo controle ($F_{(2,24)} = 17.279$; $p \leq 0,05$). Ao analisarmos o número de glóbulos vermelhos, observamos que a administração de 10,0 mg/kg de MDMA aumentou este parâmetro em relação aos camundongos do grupo controle ($F_{(2,24)} = 8,503$; $p \leq 0,01$). Após idênticos tratamentos

observamos ainda um aumento nos valores de hematócrito em relação ao dos animais do grupo controle ($F_{(2,24)} = 12,667$; $p \leq 0,05$). Não foram observadas diferenças significantes no número total de plaquetas.

TABELA 19 – Efeitos da administração, de 5,0 e 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número total de glóbulos brancos, glóbulos vermelhos, hematócrito e plaquetas de camundongos.

Sangue	C	E1	E2
Leucócitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	$6,7 \pm 1,3$	$6,9 \pm 1,1$	$8,6 \pm 1,0^{(1)}$
Eritrócitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	$7,9 \pm 0,9$	$8,5 \pm 1,0$	$9,8 \pm 1,1^{(1)}$
Hematócrito (%)	$36,4 \pm 4,2$	$40,8 \pm 3,3^{(1)}$	$44,1 \pm 1,6^{(1)}$
Plaquetas (ml)	$662,4 \pm 63,8$	$589,2 \pm 235,8$	$616,6 \pm 110,2$

Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão.

C = controle; E1 = 5,0 mg/kg de MDMA e E2 = 10,0 mg/kg de MDMA.

⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo controle. Teste Tukey-Kramer.

FIGURA 35- Efeitos da administração de 5,0 e 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número total de glóbulos brancos, glóbulos vermelhos, hematócrito e plaquetas de camundongos avaliados no contador de automático de células. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 9 camundongos por grupo. - ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Teste de Tukey-Kramer.

6.9 Experimento 9: Caracterização dos efeitos do MDMA 10,0 mg/kg sobre o número total de leucócitos no lavado broncoalveolar (LBA), na medula óssea e no sangue periférico de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados.

Quarenta camundongos foram distribuídos ao acaso em 4 grupos: um grupo basal (B), um grupo alérgico tratado com salina (AS), um grupo tratado com MDMA (M) e um grupo alérgico tratado com MDMA (AM). Os animais dos grupos AS e AM foram sensibilizados e desafiados conforme o item 4.9.1. Os animais do grupo B não receberam qualquer manipulação ou tratamento. Os animais do grupo AM foram tratados por via intraperitoneal com 10,0 mg/kg de MDMA, 30 minutos antes do desafio antigênico. Os animais do grupo M receberam a mesma dose de MDMA utilizada para aqueles do grupo AM, porém não foram imunizados nem desafiados. Os animais do grupo salina (AS) foram tratados do mesmo modo que os do grupo

AM, porém com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g). As células do lavado broncoalveolar, do sangue periférico e da medula óssea femoral foram coletadas 24 horas após desafio antigênico conforme descrito nos itens 4.9.2, 4.9.3, 4.9.4 e 4.9.5. A figura 36 resume o delineamento experimental.

FIGURA 36- Ilustração do delineamento experimental para caracterização dos efeitos do MDMA- sobre o número total de leucócitos no lavado broncoalveolar, na medula óssea e no sangue periférico de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados.

A tabela 20 apresenta e a figura 37 ilustra o número total de leucócitos no lavado broncoalveolar (LBA), na medula óssea e no sangue periférico de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados, após a administração 10,0 mg/kg de MDMA. Analisando-se os dados obtidos observamos que o tratamento com MDMA 10,0 mg/kg 30 minutos antes da colheita do sangue aumentou o número total de leucócitos no sangue ($F_{(3,36)} = 17,643$; $p \leq 0,001$). Além do mais, observamos também, que a administração de MDMA (10,0 mg/kg) 30 minutos antes do desafio antigênico, aumentou o número total de leucócitos circulantes em relação aos medidos no grupo basal ($F_{(3,36)} = 17,643$; $p \leq 0,001$); na mesma direção ao compararmos ao grupo dos animais tratados com MDMA (10,0 mg/kg) administrados 30 minutos antes da colheita observamos uma diminuição do número total de leucócitos circulantes em relação aos dos grupos imunizados e desafiados com OVA administrados ou não com MDMA (10,0 mg/kg) ($F_{(3,36)} = 17,643$; $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,001$ respectivamente). Análise adicional dos dados mostrou que a sensibilização e o desafio com OVA aumentaram o número de células no lavado broncoalveolar em relação ao grupo basal e tratado com 10,0 mg/kg de MDMA. Verificamos também, uma diminuição no número total de leucócitos no lavado broncoalveolar dos camundongos sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com MDMA (10,0 mg/kg) ($KW = 33.132$ e $p \leq 0,05$) quando comparado aos animais do grupo alérgico tratado com salina. Na medula óssea femoral observamos um aumento no número total de leucócitos nos animais OVA - imunizados e desafiados e tratados com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) ($KW = 26,677$; $p \leq 0,01$); observou-se, também, um aumento no número total de leucócitos na medula óssea dos animais alérgicos tratados com MDMA 10,0 mg/kg quando comparado aos animais dos grupos controle, aos do grupo tratado com MDMA (10 mg/kg) e aos do grupo alérgico tratado com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) ($KW = 26,677$; $p \leq 0,01$; $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,05$ respectivamente).

TABELA 20 – Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número total de leucócitos no lavado broncoalveolar, na medula óssea e no sangue periférico de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados.

Número Total Leucócitos	Basal	MDMA	AS - Alérgico Salina	AM - Alérgico MDMA
Medula óssea ($10^6/\text{mm}^3$)	96,7 ± 13,1	129,2 ± 21,2	158,8 ± 31,1 ⁽¹⁾	199,4 ± 21,8 ^(1,2,3)
Sangue ($10^6/\text{mm}^3$)	6,9 ± 1,3	10,1 ± 1,3 ⁽¹⁾	8,7 ± 0,8 ^(1,2)	7,4 ± 0,9 ⁽²⁾
LBA ($10^6/\text{mm}^3$)	5,2 ± 2,3	4,5 ± 1,0	97,3 ± 10,3 ^(1,2)	48,5 ± 11,7 ^(1,2,3)

Os dados representam as médias ± desvio padrão.

B - basal; M – MDMA - 10,0 mg/kg, AS – alérgico tratado com salina NaCl 0,9% (0,1 ml/10g), AM – alérgico tratado com MDMA - 10,0 mg/kg. ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo basal, ⁽²⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo tratado com MDMA e ⁽³⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo alérgico tratado com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g). Teste de Tukey-Kramer e de Kruskal Wallis.

FIGURA 37- Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número total de leucócitos no lavado broncoalveolar, na medula óssea e no sangue periférico de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 10 camundongos por grupo. ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo basal (B), ⁽²⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo tratado com MDMA 10,0 mg/kg (M) e ⁽³⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo alérgico tratado com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) - (AS). Teste de Tukey-Kramer e de Kruskal Wallis.

A tabela 21 apresenta e a figura 38 ilustra o número total de leucócitos e o peso relativo do baço de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados, após a administração 10,0 mg/kg de MDMA. Analisando-se os dados observamos um aumento do número total de leucócitos no baço dos animais tratados com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) (KW = 30,880; $p \leq 0,001$) e tratados com MDMA 10,0 mg/kg 30 minutos antes do desafio antigênico (KW = 30,880; $p \leq 0,001$) observamos também, aumento do peso relativo do baço nos animais dos grupos alérgicos tratados com salina e MDMA (KW = 29,493; $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,001$ respectivamente) em relação aos dos animais do grupo basal. Análise adicional dos dados revelou um aumento do peso relativo do baço nos animais alérgicos tratado com MDMA (10,0 mg/kg) em relação aos animais não alérgicos tratado com MDMA 10,0 mg/kg (KW = 29,493; $p \leq 0,01$).

TABELA 21 – Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número de leucócitos totais e o peso relativo do baço de camundongos.

Baço	B	M	AS	AM
Nº total de células (10^6)	108,8 ± 6,4	136,3 ± 9,5	164,2 ± 31,0 ⁽¹⁾	192,9 ± 19,1 ^(1,2)
Peso relativo	0,36 ± 0,11	0,46 ± 0,04	0,56 ± 0,11 ⁽¹⁾	0,71 ± 0,09 ^(1,2)

Os dados representam as médias ± desvio padrão.

B - basal; M – MDMA - 10,0 mg/kg, AS – alérgico tratado com salina, AM – alérgico tratado com MDMA - 10,0 mg/kg. ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo basal (B) e ⁽²⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo tratado com MDMA 10,0 mg/kg (M). Teste de Kruskal Wallis.

FIGURA 38- Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número de leucócitos totais e o peso relativo do baço de camundongos. Os dados representam as médias ± desvio padrão de 10 camundongos por grupo. ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo basal (B) e ⁽²⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo tratado com MDMA 10,0 mg/kg (M). Teste de Tukey-Kramer.

A tabela 22 apresenta e a figura 39 ilustra a contagem diferencial de leucócitos sanguíneos em camundongos após tratamento com MDMA 10,0 mg/kg. Podemos observar que a administração de MDMA diminuiu o número de linfócitos circulantes nos animais sensibilizados e desafiados com OVA em relação aos dos animais do grupo basal (KW = 30,064, $p \leq 0,01$) e aos do grupo alérgico tratado com salina (KW = 30,064, $p \leq 0,01$). Uma redução dos linfócitos circulantes dos animais do grupo tratado com MDMA 10 mg/kg, também foi observada, em

relação aos do grupo basal (KW = 30,064, $p \leq 0,01$). Análise adicional, mostrou diminuição na porcentagem de neutrófilos dos animais sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g), em relação aos dos animais do grupo basal (KW = 19,201, $p \leq 0,001$), bem como um aumento de neutrófilos nos animais do grupo tratado com MDMA 10 mg/kg em relação aos do grupo basal (KW = 19,201, $p \leq 0,01$). Ao analisarmos os monócitos, observamos diminuição destas células no sangue circulante dos animais sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com MDMA 10,0 mg/kg, em relação aos dos animais do grupo basal (KW = 21,328, $p \leq 0,01$), aos animais do grupo tratado com MDMA 10,0 mg/kg (KW = 21,328, $p \leq 0,001$) e, ainda, aos animais sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) (KW = 21,328, $p \leq 0,05$).

TABELA 22 – Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre contagem diferencial de leucócitos sangüíneos em camundongos sensibilizados e desafiados.

Parâmetros	B	M	AS	AM
Linfócito (%)	60,4 ± 4,9	38,8 ± 4,9 ⁽¹⁾	60,8 ± 9,1 ⁽²⁾	41,6 ± 3,0 ^(1,3)
Monócito (%)	2,2 ± 0,3	2,5 ± 1,3	2,1 ± 1,1	1,1 ± 0,4 ^(1,2,3)
Neutrófilo (%)	21,0 ± 3,0	36,0 ± 8,4 ⁽¹⁾	18,2 ± 8,0 ⁽²⁾	25,0 ± 3,3

Os dados representam as médias ± desvio padrão.

B - basal; M – MDMA - 10,0 mg/kg, AS – alérgico tratado com salina NaCl 0,9% (0,1 ml/10g), AM – alérgico tratado com MDMA - 10,0 mg/kg. ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo basal, ⁽²⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo tratado com MDMA 10,0 mg/kg e ⁽³⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo alérgico tratado com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) (AS). Teste de Kruskal Wallis.

FIGURA 39- Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre contagem diferencial de leucócitos sangüíneos em camundongos sensibilizados e desafiados. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 10 camundongos por grupo. ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo basal (B), ⁽²⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo tratado com MDMA 10,0 mg/kg (M) e ⁽³⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo alérgico tratado com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) (AS). Teste de Kruskal Wallis.

A tabela 23 apresenta e a figura 40 ilustra os efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos no lavado broncoalveolar de camundongos Balb/C sensibilizados e desafiados com OVA, trinta minutos antes do desafio antigênico. Ao analisarmos os eosinófilos, os resultados obtidos mostraram um aumento destas células no pulmão dos animais sensibilizados e desafiados com OVA tratados com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) ou com MDMA 10,0 mg/kg ($F_{(3,36)} = 219,51$; $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,001$ respectivamente) quando comparados aos do grupo basal e aos do grupo não sensibilizados tratado com MDMA 10,0 mg/kg ($F_{(3,36)} = 219,51$; $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,001$ respectivamente). Ao

analisarmos o número de eosinófilos no grupo dos animais sensibilizados e tratados com MDMA 10,0 mg/kg observamos uma diminuição destas células em relação às daquelas dos animais alérgicos tratados com salina ($F_{(3,36)} = 219,51$; $p \leq 0,001$). Podemos observar que a administração de MDMA diminuiu o número total de macrófagos no pulmão dos animais sensibilizados e desafiados com OVA tratados com MDMA 10,0 mg/kg em relação aos dos animais do grupo alérgico tratado com salina ($KW = 8,278$, $p \leq 0,05$). Por fim, observamos um aumento do número total de neutrófilos nos animais sensibilizados e desafiados com OVA em relação aos dos grupos basal e tratado com MDMA 10,0 mg/kg ($KW = 33,447$, $p \leq 0,01$). Análise adicional, mostrou diminuição no número total de neutrófilos nos animais sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com MDMA 10,0 mg/kg ($KW = 33,447$, $p \leq 0,01$), em relação às daquelas dos animais do grupo não sensibilizados e tratado com MDMA 10,0 mg/kg ($KW = 33,447$, $p \leq 0,01$), e aos do grupo alérgico tratado com salina ($KW = 33,447$, $p \leq 0,05$).

TABELA 23 – Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a porcentagem de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos no lavado broncoalveolar de camundongos Balb/C sensibilizados e desafiados com OVA, trinta minutos antes do desafio antigênico.

Parâmetros	B	M	AS	AM
Eosinófilos ($\times 10^5$)	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	2,2 $\pm$ 0,3 ^(1,2)	1,1 $\pm$ 0,3 ^(1,2,3)
Macrófago ($\times 10^5$)	4,1 $\pm$ 0,5	4,2 $\pm$ 0,7	5,1 $\pm$ 1,3	3,6 $\pm$ 0,6 ⁽³⁾
Neutrófilo ($\times 10^5$)	10,0 $\pm$ 0,9	8,5 $\pm$ 2,1	40,0 $\pm$ 7,0 ^(1,2)	28,0 $\pm$ 4,0 ^(2,3)

Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão.

B - basal; M – MDMA - 10,0 mg/kg, AS – alérgico tratado com salina NaCl 0,9% (0,1 ml/10g), AM – alérgico tratado com MDMA - 10,0 mg/kg. ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo basal, ⁽²⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo tratado com MDMA 10,0 mg/kg e ⁽³⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo alérgico tratado com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) (AS). Teste de Tukey-Kramer e de Kruskal Wallis.

FIGURA 40 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número de eosinófilos **(A)**, macrófagos **(B)** e neutrófilos **(C)** no lavado broncoalveolar de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA, trinta minutos antes do desafio antigênico. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 10 camundongos por grupo. ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo basal (B), ⁽²⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo tratado com MDMA 10,0 mg/kg e ⁽³⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo alérgico tratado com salina NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) (AS). Teste de Tukey-Kramer e de Kruskal Wallis.

6.10 Experimento 10: Caracterização dos efeitos do MDMA 10mg/kg após o tratamento com Mifepristona (RU-486) sobre o número total de leucócitos no lavado broncoalveolar, na medula óssea e no sangue periférico de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados.

Quarenta camundongos foram distribuídos ao acaso em 4 grupos: um grupo alérgico tratado com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) (AS), um grupo alérgico tratado com MDMA 10,0 mg/kg (AM), um grupo alérgico tratado com Mifepristona – RU 486 (30,0 mg/kg) e NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) (ASMif), e um grupo alérgico tratado com Metirapona – RU 486 (30 mg/kg) e MDMA (10,0 mg/kg) (AMMif). Todos os animais foram sensibilizados e desafiados conforme o item 4.9.1. Os animais do grupo AM e AMMif foram tratados por via intraperitoneal com 10,0 mg/kg de MDMA, 30 minutos antes do desafio antigênico. Os animais dos grupos ASMif e AMMif foram tratados por via intraperitoneal com 30,0 mg/kg de RU-486 1 hora antes do tratamento com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) e MDMA 10,0 mg/kg. Os animais dos grupos tratados com salina (AS e ASMif) recebeu NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) 30 minutos antes do desafio antigênico. As células do lavado broncoalveolar, do sangue periférico e da medula óssea femoral foram coletadas 24 horas após desafio antigênico conforme descrito nos itens 4.9.2, 4.9.3, 4.9.4 e 4.9.5. A figura 41 resume este procedimento.

FIGURA 41 – Ilustração do delineamento experimental para caracterização dos efeitos do MDMA-10mg/kg após o tratamento com Mifepristona (RU-486) 30mg/kg sobre o número total de leucócitos no lavado broncoalveolar, na medula óssea e no sangue periférico de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados.

A tabela 24 apresenta e a figura 42 ilustra o número total de leucócitos no lavado broncoalveolar, na medula óssea e no sangue periférico de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados tratados ou não com RU-486 30,0 mg/kg e MDMA 10,0 mg/kg. Analisando-se os dados podemos observar que o tratamento com RU 486 não alterou o número de leucócitos circulantes do sangue periférico dos animais tratados com salina (ASMif) e MDMA (AMMif) 30 minutos antes do desafio antigênico. Por outro lado, observamos um aumento deste parâmetro nos animais alérgicos tratados com MDMA quando comparado aos do grupo alérgico tratado com NaCl 0,9% ($F_{(3,36)} = 4,662$; $p \leq 0,01$). Os dados obtidos do LBA mostraram que o tratamento com RU-486 reverteu os efeitos do tratamento com MDMA. Especificamente, foi encontrado uma diminuição significativa do número de leucócitos no LBA dos animais alérgicos tratados com MDMA em relação aos animais alérgicos tratados com NaCl 0,9% ($KW = 29,832$ e $p \leq 0,001$), sendo a observação revertida nos animais tratados com RU-486 e MDMA. Na medula óssea femoral observamos uma diminuição no número total de leucócitos dos animais alérgicos tratados com RU – 486 e NaCl 0,9% ou MDMA ($KW = 25,650$ e $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,001$) quando comparado aos animais do grupo alérgico tratado com MDMA.

TABELA 24 – Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número total de leucócitos no lavado broncoalveolar, na medula óssea e no sangue periférico de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados após o tratamento com Mifepristona (RU-486) 30,0 mg/kg.

Número Total Leucócitos	AS	AM	ASMif	AMMif
Medula óssea ($10^5/\text{mm}^3$)	147,1 $\pm$ 35,5	189,4 $\pm$ 19,9 ⁽¹⁾	93,3 $\pm$ 10,6 ⁽²⁾	96,0 $\pm$ 15,4 ⁽²⁾
Sangue ($10^6/\text{mm}^3$)	7,3 $\pm$ 1,0	8,9 $\pm$ 0,8 ⁽¹⁾	8,5 $\pm$ 1,0	8,3 $\pm$ 1,2
Pulmão ($10^5/\text{mm}^3$)	84,0 $\pm$ 8,8	40,5 $\pm$ 7,8 ⁽¹⁾	85,7 $\pm$ 16,9 ⁽²⁾	63,0 $\pm$ 7,4

Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão.

AS - alérgico tratado com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g), AM – alérgico tratado com MDMA - 10,0 mg/kg, ASMif – alérgico tratado com RU-486 30,0 mg/kg + NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) e AMMif – alérgico tratado com RU-486 30,0 mg/kg + MDMA - 10,0 mg/kg. ⁽¹⁾ - p < 0,05 representa diferença quando comparado com o grupo AS e ⁽²⁾ - p < 0,05 representa diferença quando comparado com o grupo tratado com AM. Teste de Tukey-Kramer de Kruskal Wallis.

FIGURA 42 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número total de leucócitos na medula óssea (A), no sangue periférico (B), e no lavado broncoalveolar (C) de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados após o tratamento com Mifepristona (RU-486). Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 10 camundongos por grupo. ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo alérgico tratado com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) (AS) e ⁽²⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo alérgico tratado com MDMA 10,0 mg/kg (AM). Teste de Tukey-Kramer e de Kruskal Wallis.

A **TABELA 25** apresenta e a **FIGURA 43** ilustra a contagem diferencial de leucócitos sanguíneos em camundongos OVA - sensibilizados e desafiados tratados ou não com RU-486 (30,0 mg/kg) antes da administração de MDMA (10,0 mg/kg). Observamos que o pré-tratamento com RU-486 aumentou o número de linfócitos circulantes nos animais alérgicos tratados com NaCl 0,9% e apenas tratados com MDMA quando comparados aos do grupo alérgico tratado com MDMA 10,0 mg/kg ($KW = 30,064$, $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,01$ respectivamente). Análise adicional mostrou que o pré-tratamento com RU-486 não alterou a porcentagem de neutrófilos dos animais sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com NaCl 0,9% e com MDMA em relação aos animais dos grupos alérgicos tratados apenas com salina e MDMA. Ao analisarmos os monócitos, podemos observar um aumento na porcentagem destas células nos animais alérgicos tratados com RU-486 + MDMA e RU-486 + com NaCl 0,9% em relação aos animais alérgicos tratados com MDMA 10,0 mg/kg ($KW = 30,064$, $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,01$ respectivamente).

TABELA 25 – Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a contagem diferencial de leucócitos sanguíneos em camundongos OVA- sensibilizados e desafiados após o tratamento com Mifepristona (RU-486) 30,0 mg/kg.

Parâmetros	AS	AM	ASMif	AMMif
Linfócito (%)	61,5 ± 10,3	42,2 ± 3,7 ⁽¹⁾	70,1 ± 10,0 ⁽²⁾	63,4 ± 7,3 ⁽²⁾
Monócito (%)	2,2 ± 0,8	1,2 ± 0,3 ⁽¹⁾	2,6 ± 0,4 ⁽²⁾	2,1 ± 0,6 ⁽²⁾
Neutrófilo (%)	23,2 ± 9,2	26,1 ± 4,7	25,0 ± 4,1	23,0 ± 8,3

Os dados representam as médias ± desvio padrão.

AS - alérgico tratado com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g), AM – alérgico tratado com MDMA - 10,0 mg/kg, ASMif – alérgico tratado com RU-486 30,0 mg/kg + NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) e AMMif – alérgico tratado com RU-486 30,0 mg/kg + MDMA - 10,0 mg/kg. ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo AS e ⁽²⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo tratado com AM. Teste de Tukey-Kramer de Kruskal Wallis.

FIGURA 43 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a contagem diferencial de linfócitos (A), monócito (B) e neutrófilos (C) sanguíneos de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados após o tratamento com Mifepristona (RU-486) 30,0 mg/kg. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 10 camundongos por grupo. ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo alérgico tratado com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) (AS) e ⁽²⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo alérgico tratado com MDMA 10,0 mg/kg (AM). Teste de Tukey-Kramer e de Kruskal Wallis

A tabela 26 apresenta e a figura 44 ilustra os efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos no lavado broncoalveolar de camundongos sensibilizados e desafiados tratados ou não com RU-486 30,0 mg/kg antes da administração de MDMA 10,0 mg/kg. Ao analisarmos o número de eosinófilos no grupo dos animais sensibilizados e tratados com MDMA observamos uma diminuição destas células em relação à dos animais alérgicos tratados com salina ($F_{(3,36)} = 219,51$; $p \leq 0,001$). Observamos também, que o pré-tratamento com RU-486 nos animais alérgicos tratados com NaCl 0,9% ou apenas com MDMA aumentou o número total dos eosinófilos ($F_{(3,36)} = 17,083$; $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,01$ respectivamente) quando comparado aos dos animais do grupo alérgico tratado com MDMA. Análise adicional, mostrou uma diminuição no número de eosinófilos dos animais alérgicos tratados com RU-486 + MDMA em relação aos animais tratados com RU-486 + NaCl 0,9%. Os dados obtidos para os macrófagos mostram uma redução do número de macrófagos no pulmão dos animais sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com MDMA em relação aos dos animais do grupo alérgico tratado com NaCl 0,9% ($F_{(3,36)} = 6,358$; $p \leq 0,01$). Ao analisarmos o pré-tratamento com RU-486 30,0 mg/kg observamos um aumento no número destas células nos animais tratados com MDMA ($F_{(3,36)} = 6,358$; $p \leq 0,01$) quando comparado aos animais alérgicos tratados com MDMA que não foram pré-tratados com RU-486. Por fim, ao analisarmos o número de neutrófilos no grupo dos animais sensibilizados e tratados com MDMA observamos um aumento destas células em relação aos animais alérgicos tratados com salina ($F_{(3,36)} = 12,127$; $p \leq 0,001$); observamos também, que o pré-tratamento com RU-486 + NaCl 0,9% e RU-486 + MDMA reverteu em parte os efeitos observados nos animais não tratados. Especificamente observamos um aumento no número total de neutrófilos ($F_{(3,36)} = 17,083$; $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,05$ respectivamente) quando comparado aos dos animais do grupo alérgico tratado com MDMA 10,0 mg/kg. Análise adicional, mostrou uma diminuição no número de neutrófilos dos animais alérgicos tratados com RU-486 + MDMA em relação aos animais tratados com RU-486 + NaCl 0,9% ($F_{(3,36)} = 17,083$; $p \leq 0,01$).

TABELA 26 – Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a porcentagem de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos no lavado broncoalveolar de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados após o tratamento com Mifepristona (RU-486) 30,0 mg/kg.

Parâmetros	AS	AM	ASMif	AMMif
Eosinófilos (x10 ⁵)	2,1 ± 0,3	1,4 ± 0,2 ⁽¹⁾	2,4 ± 0,3 ⁽²⁾	1,9 ± 0,4 ^(2,3)
Macrófago (x10 ⁵)	5,4 ± 1,2	3,7 ± 0,5 ⁽¹⁾	5,3 ± 1,2 ⁽²⁾	4,8 ± 0,9
Neutrófilo (x10 ⁵)	39,6 ± 6,7	28,1 ± 3,7 ⁽¹⁾	41,8 ± 6,6 ⁽²⁾	34,9 ± 4,3 ^(2,3)

Os dados representam as médias ± desvio padrão.

AS - alérgico tratado com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g), AM – alérgico tratado com MDMA - 10,0 mg/kg, ASMif – alérgico tratado com RU-486 30,0 mg/kg + NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) e AMMif – alérgico tratado com RU-486 30,0 mg/kg + MDMA - 10,0 mg/kg. ⁽¹⁾ - p < 0,05 representa diferença quando comparado com o grupo AS, ⁽²⁾ - p < 0,05 representa diferença quando comparado com o grupo tratado com AM e ⁽³⁾ - p < 0,05 representa diferença quando comparado com o grupo tratado com RU-486 – 30,0 mg/kg + NaCl 0,9% (0,1 ml/10g). Teste de Tukey-Kramer de Kruskal Wallis.

FIGURA 44- Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a contagem de eosinófilo (A), macrófago (B) e neutrófilo (C) do LBA de camundongos OVA- sensibilizados e desafiados após o tratamento com Mifepristona (RU-486) 30,0 mg/kg. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 10 camundongos por grupo. ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo alérgico tratado com NaCl 0,9% (AS), ⁽²⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado ao grupo alérgico tratado com MDMA 10,0 mg/kg (AM) e ⁽³⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo tratado com RU-486 + NaCl 0,9% (ASMif). Teste de Tukey-Kramer e de Kruskal Wallis

6.11 Experimento 11: Caracterização dos efeitos do MDMA-*ecstasy* 10mg/kg na quantificação da produção de interleucinas IL-4, IL5 e IL-10 em explante pulmonar de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados.

Vinte quatro camundongos foram distribuídos ao acaso em 3 grupos: um basal (B), um grupo alérgico tratado com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) (AS) e um grupo alérgico tratado com MDMA 10,0 mg/kg (AM). Todos os animais foram sensibilizados e desafiados conforme o item 4.7.1. Os animais do grupo AM foram tratados por via intraperitoneal com 10,0 mg/kg de MDMA, 30 minutos antes do desafio antigênico. Os animais do grupo tratado com salina (AS), receberam NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) 30 minutos antes do desafio antigênico e os animais do grupo basal não receberam qualquer manipulação. Fragmentos de igual peso de lóbulo pulmonar foram estimulados ou não com 1µg/ml de lipopolissacarídeo (LPS, *Escherichia coli*) e incubados por 24 horas em meio DMEM para análises de IL-4, IL-5 e IL-10 conforme descritos nos itens 4.10 e 4.11.

A tabela 27 apresenta e a figura 45 ilustra a quantificação da produção de interleucinas IL-4, IL-5 e IL-10 em explante pulmonar de camundongos Balb/C OVA- sensibilizados e desafiados, após a administração 10,0 mg/kg de MDMA. Os dados obtidos mostraram que as culturas pulmonares dos animais alérgicos tratados com MDMA 30 minutos antes do desafio antigênico apresentaram menor valor de liberação de IL-4 estimulada ou não com LPS quando comparados às culturas pulmonares dos animais do grupo alérgico tratado com salina estimulados ou não ($F_{(5,24)} = 12,322$; $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$, $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,01$ respectivamente). Na mesma direção observamos uma diminuição da liberação de IL-5 nas culturas pulmonares não estimuladas com LPS de animais alérgicos tratados com MDMA 10,0 mg/kg 30 minutos antes do desafio antigênico quando comparados aos animais do grupo alérgico tratado com NaCl 0,9% (KW = 26,074; $p \leq 0,01$) e, também, em culturas pulmonares estimuladas com LPS e provenientes de animais alérgicos tratados com salina (KW = 19,636; $p \leq 0,001$). Observou-se ainda, diminuição da liberação de IL-10 nas culturas pulmonares não estimuladas com LPS de animais alérgicos tratados com MDMA 30 minutos antes do desafio antigênico, quando comparados aos animais do grupo alérgico tratado com NaCl 0,9% (KW = 19,636; $p \leq 0,01$) e as culturas estimuladas com LPS dos animais alérgicos tratados com salina (KW = 19,636; $p \leq 0,05$). Análise adicional mostrou um aumento na liberação estimulada ou não por LPS de interleucina IL-4 nos animais alérgicos tratados com NaCl 0,9% quando comparados aos do

grupo basal ($F_{(5,24)} = 12,322$; $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,01$). Observamos também, um aumento de IL-5 das culturas estimuladas por LPS dos animais alérgicos tratados com NaCl 0,9% em relação aos animais do grupo do grupo basal ($KW = 26,074$; $p \leq 0,01$).

TABELA 27 – Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a quantificação da produção de interleucinas IL-4, IL5 e IL-10 em explante pulmonar de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados.

Parâmetros	B	BLPS	AS	ASLPS	AM	AMLPS
IL-4 (pg/ml)	3350 ± 1431,0	4600 ± 1104,5 ⁽¹⁾	7280 ± 2218,6 ⁽¹⁾	7920 ± 1995,5 ^(1,2)	2100 ± 604,2 ^(3,4)	2900 ± 1231,0 ^(3,4)
IL-5 (pg/ml)	3020 ± 725,9	4360 ± 320,9	9340 ± 2366,0	11580 ± 1992,0 ⁽¹⁾	2328 ± 256,7 ^(3,4)	3400 ± 441,6
IL-10 (pg/ml)	2140 ± 811,2	2120 ± 925,7	3100 ± 1084,0	2400 ± 316,2	820 ± 258,8 ^(3,4)	1380 ± 238,8

Os dados representam as médias ± desvio padrão.

B - basal; BLPS – basal induzido com LPS, AS – alérgico tratado com salina, ASLPS – alérgico tratado com salina induzido com LPS, AM – alérgico tratado com MDMA - 10,0 mg/kg e AMLPS – alérgico tratado com MDMA - 10,0 mg/kg induzido com LPS. ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo basal; ⁽²⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo basal induzido com LPS; ⁽³⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo alérgico tratado com salina; ⁽⁴⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo alérgico tratado com salina induzido com LPS. Teste de Tukey-Kramer e de Kruskal Wallis.

FIGURA 45 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a quantificação da produção de interleucinas IL-4, IL5 e IL-10 em explante pulmonar de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados trinta minutos antes do desafio antigênico. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 8 camundongos por grupo; ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo basal, ⁽²⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo basal estimulado com LPS, ⁽³⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo alérgico tratado com salina, ⁽⁴⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo alérgico tratado com salina estimulado com LPS, ⁽⁵⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo alérgico tratado com MDMA 10,0 mg/kg. Teste de Tukey-Kramer e de Kruskal Wallis.

6.12 Experimento 12: Caracterização dos efeitos do MDMA-*ecstasy* 10mg/kg sobre a expressão de molécula de adesão – L -selectina em leucócitos presentes no sangue e lavado broncoalveolar de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados.

Trinta camundongos foram distribuídos ao acaso em 3 grupos: um basal (B), um grupo alérgico tratado com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) (AS) e um grupo alérgico tratado com MDMA 10,0 mg/kg (AM). Todos os animais foram sensibilizados e desafiados conforme o item 4.7.1. Os animais do grupo AM foram tratados por via intraperitoneal com 10,0 mg/kg de MDMA, 30 minutos antes do desafio antigênico. Os animais dos grupos tratados com salina (AS) foram tratados com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) e os animais do grupo basal não receberam qualquer manipulação e tratamento. As células do lavado broncoalveolar e do sangue periférico foram coletadas 24 horas após desafio antigênico conforme descrito nos itens 4.9.2 e 4.9.3 para a quantificação da intensidade de fluorescência por meio de citometria de fluxo conforme descrito nos itens 4.12 e 4.13. Os citogramas que ilustram os dados relativos ao SSC vs FSC de leucócitos do sangue e leucócitos de pulmão são apresentados a seguir na figura 43. Citogramas e histogramas semelhantes foram utilizados para análise individual das populações celulares do sangue periférico e do LBA dos animais controles e experimentais. Estas populações foram identificadas ao microscópio óptico após uma separação mecânica realizada pelo FACSCALIBUR e a devida coloração pelo Giemsa. 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).

As populações de leucócitos sanguíneos observados no citômetro de fluxo foram padronizadas da seguinte maneira: R1 → linfócitos, R2 → monócitos e R3 → neutrófilos e as populações de leucócitos do LBA observados foram padronizadas da seguinte maneira, a saber: R1 → linfócitos e R2 → neutrófilos (Figura 46).

Importante ressaltar que os histogramas e citogramas apresentados têm por objetivo ilustrar o que foi visto por meio do citômetro de fluxo durante as análises, ou seja, as populações celulares distintas e suas diferentes intensidades de fluorescência emitidas pelas células dos animais controles e experimentais.

FIGURA 46 – Citograma dos leucócitos do sangue circulantes A e do lavado broncoalveolar de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. R1 → linfócitos, R2 → monócitos e R3 → neutrófilos.

RESULTADOS:

FIGURA 47 – Citograma dos leucócitos do sangue circulantes A e Histograma dos monócitos após marcação com Anti-CD62 dos animais sensibilizados e desafiados com OVA tratados com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) (AS) e MDMA 10,0 mg/kg (AM). R2 → monócitos.

FIGURA 48 – **A** - Citograma dos leucócitos do lavado Broncoalveolar (LBA) dos animais não manipulados, **B** - citograma dos leucócitos do lavado Broncoalveolar (LBA) dos animais alérgicos e **C**- Histograma dos Neutrófilos após marcação com Anti-CD62 dos animais sensibilizados e desafiados com OVA tratados com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) (AS) e MDMA 10,0 mg/kg (AM). R3 → neutrófilos.

A tabela 28 apresenta e a figura 49 ilustra os efeitos do MDMA-*ecstasy* 10mg/kg sobre a expressão de molécula de adesão - L-selectina em leucócitos presentes no sangue de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados. Os resultados obtidos mostram que o tratamento de animais alérgicos com MDMA (10,0 mg/kg) ou NaCl 0,9% 30 minutos antes do desafio antigênico diminuiu a expressão de L-selectina dos neutrófilos em relação aos dados do grupo basal (KW = 9,974, $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,01$ respectivamente). No mesmo sentido, observamos uma

redução da expressão de L-selectina nos monócitos dos animais alérgicos tratados com MDMA 10,0 mg/kg quando comparado aos monócitos dos grupos basal e alérgico tratado com salina ($F_{(2,27)} = 8,665$, $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,05$ respectivamente). Não foram observadas diferenças na expressão de L-selectina dos linfócitos sanguíneos.

TABELA 28 – Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a expressão de molécula de adesão - L-selectina em leucócitos presentes no sangue de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados medidos por citometria de fluxo.

Leucócitos	Intensidade de Fluorescência		
	B	AS	AM
Linfócitos	68,7 ± 9,6	65,3 ± 6,5	63,6 ± 3,8
Monócitos	170,8 ± 14,8	163,9 ± 11,4	145,5 ± 16,8 ^(1,2)
Neutrófilos	70,4 ± 15,5	38,9 ± 4,6 ⁽¹⁾	43,1 ± 12,7 ⁽¹⁾

Os dados representam as médias ± desvio padrão.

B – basal, AS – alérgico tratado com salina, AM – alérgico tratado com MDMA - 10,0 mg/kg. ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo basal. ⁽²⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo o grupo alérgico tratado com salina. Teste de Tukey-Kramer e de Kruskal Wallis.

FIGURA 49- Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a expressão de molécula de adesão – L - selectina em leucócitos presentes no sangue de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 10 camundongos por grupo; ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo basal, ⁽²⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo alérgico tratado com salina. Teste de Tukey-Kramer e de Kruskal Wallis.

A tabela 29 apresenta e a figura 50 ilustra os efeitos do MDMA-ecstasy 10mg/kg sobre a expressão de molécula de adesão - L-selectina em leucócitos presentes no lavado broncoalveolar de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados. Podemos observar um aumento na expressão de L-selectina no neutrófilos do lavado broncoalveolar dos animais alérgicos tratados com NaCl 0,9% 30 minutos antes do desafio antigênico em relação aos do grupo basal (KW = 14,720, $p \leq 0,01$). Também foi observado, embora de forma não significativa, uma tendência de redução de mais de 100% na expressão de L-selectina nos neutrófilos dos animais alérgicos tratados com MDMA 10,0 mg/kg quando comparados aos do grupo alérgico tratado com salina. Não foram

observadas diferenças na expressão de L-selectina nos linfócitos presentes no lavado broncoalveolar.

TABELA 29 – Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a expressão de molécula de adesão - L-selectina em leucócitos presentes no lavado broncoalveolar de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados medidos por citometria de fluxo.

Intensidade de Fluorescência			
Leucócitos LBA	B	AS	AM
Linfócitos	21,0 ± 1,6	19,3 ± 4,0	21,1 ± 1,6
Neutrófilos	13,4 ± 12,6	124,6 ± 77,8 ⁽¹⁾	54,6 ± 33,6

Os dados representam as médias ± desvio padrão.

B – basal, AS – alérgico tratado com salina, AM – alérgico tratado com MDMA - 10,0 mg/kg. ⁽¹⁾ - p < 0,05 representa diferença quando comparado com o grupo basal. Teste de Kruskal Wallis.

FIGURA 50- Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a expressão de molécula de adesão - L-selectina em leucócitos presentes no lavado broncoalveolar de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados. Os dados representam as médias ± desvio padrão de 10 camundongos por grupo; ⁽¹⁾ - p < 0,05 representa diferença quando comparado com o grupo basal. Teste de Kruskal Wallis.

6.13 Experimento 13: Caracterização dos efeitos do MDMA-*ecstasy* 10mg/kg sobre a reatividade das vias aéreas *in vitro* de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados.

Foram realizados dois protocolos experimentais: um para avaliar os efeitos do MDMA na reatividade das vias aéreas *in vitro* de animais OVA – sensibilizados e desafiados e outro para avaliar a reatividade das vias aéreas *in vitro* de animais não sensibilizados e tratados com MDMA. Em ambos empregou-se o metisergide, um antagonista dos receptores de serotonina 5HT_{2A}, para avaliar a influencia da serotonina na contração da musculatura lisa das vias aéreas.

Protocolo A: vinte quatro camundongos foram distribuídos ao acaso em 4 grupos: um basal (B), um grupo alérgico tratado com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) (A/S), um grupo alérgico tratado com MDMA 10,0 mg/kg (A/M) e um grupo alérgico tratado com Metisergide (5,0 mg/kg) e MDMA (10,0 mg/kg) (A/M/M). Os animais dos grupos AS, AM e AMM foram sensibilizados e desafiados conforme o item 4.7.1. Os animais do grupo AM foram tratados por via intraperitoneal com 10,0 mg/kg de MDMA, 30 minutos antes do desafio antigênico. Os animais do grupo AMM foram tratados por via intraperitoneal com 5,0 mg/kg de Metisergide 120 minutos antes da administração de 10,0 mg/kg de MDMA; 30 minutos após a último tratamento os animais foram desafiados com OVA. Os animais do grupo AS foram tratados com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) e os animais do grupo basal não receberam qualquer manipulação e tratamento. As traquéias dos camundongos foram isoladas e o tecido conjuntivo adjacente removido 24 horas após o desafio antigênico conforme descrito nos itens 4.7.2 e 4.7.4 para registro isométrico de contrações em cubas para órgão isolado contendo solução de Krebs-Henseleit aerada, conforme descrito no item 4.14.

Protocolo B: vinte quatro camundongos foram distribuídos ao acaso em 4 grupos: um basal (B), um grupo tratado com MDMA 10,0 mg/kg (M), um grupo tratado com Metisergide (5,0 mg/kg) e MDMA (10,0 mg/kg) (Met/M) e um grupo tratado com Metisergide (5,0 mg/kg) e NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) (Met). Os animais do grupo M foram tratados por via intraperitoneal com 10,0 mg/kg de MDMA, 30 minutos antes das colheitas das traquéias. Os animais do grupo Met/M foram tratados por via intraperitoneal com 5,0 mg/kg de Metisergide 120 minutos antes do tratamento com 10,0 mg/kg de MDMA e os animais do grupo Met foram tratados com 5,0 mg/kg de Metisergide 120 minutos antes do tratamento com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g). Por fim, os animais do grupo basal não receberam qualquer manipulação e tratamento. As traquéias dos camundongos foram isoladas e o tecido conjuntivo adjacente removido 30 minutos após o

término do último tratamento para registro isométrico de contrações em cubas para órgão isolado contendo solução de Krebs-Henseleit aerada, conforme descrito no item 4.14.

A tabela 30 apresenta e a figura 51 ilustra os efeitos do MDMA 10mg/kg sobre a reatividade *in vitro* à metacolina de vias aéreas de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados – protocolo A. Analisando-se os dados de reatividade à metacolina podemos observar um aumento de contração da traquéia isolada dos camundongos alérgicos tratados com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) 30 minutos antes do desafio antigênico, em relação aos do grupo basal ($F_{(3,12)} = 11,751$, $p \leq 0,05$). Análise adicional, mostrou uma redução na contração da traquéia dos animais alérgicos tratados com MDMA 10,0 mg/kg e dos animais alérgicos tratados com Metisergide 5mg/kg e MDMA (10,0 mg/kg) quando comparado aos animais do grupo alérgico tratado com salina ($F_{(3,12)} = 11,751$, $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,05$ respectivamente).

TABELA 30 – Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a reatividade à metacolina das vias aéreas *in vitro* de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados.

Parâmetro	B	A/S	A/M	A/Met/M
% KCL	216,9 ± 12,2	304,8 ± 31,4 ⁽¹⁾	150,1 ± 15,9 ⁽²⁾	206,1 ± 13,4 ⁽²⁾

Os dados representam as médias ± desvio padrão.

B – basal, A/S – alérgico tratado com salina, A/M – alérgico tratado com MDMA - 10,0 mg/kg e A/Met/M – alérgico tratado com metsergide (5,0 mg/kg) e MDMA - 10,0 mg/kg. ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo basal e ⁽²⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo alérgico tratado com salina. Teste de Kruskal Wallis.

FIGURA 51- Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a reatividade a metacolina das vias aéreas *in vitro* de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados – protocolo A. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 6 camundongos por grupo; ⁽¹⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo basal e ⁽²⁾ - $p < 0,05$ representa diferença quando comparado com o grupo alérgico tratado com salina. Teste de Kruskal Wallis.

A tabela 31 apresenta e a figura 52 ilustra os efeitos do MDMA 10mg/kg sobre a reatividade *in vitro* à metacolina das vias aéreas de camundongos (protocolo B). Os resultados obtidos mostram um aumento na contração da traquéia isolada dos camundongos tratados com MDMA (10,0 mg/kg) 30 minutos antes do procedimento, quando comparados aos dados do grupo basal ($F_{(3,18)} = 6,969$, $p \leq 0,05$). Por outro lado, observamos uma redução deste parâmetro nos animais tratados com metisergida 5,0 mg/kg e nos animais tratados com Metisergida 5mg/kg e MDMA 10,0 mg/kg quando comparado aos animais do grupo tratado apenas com MDMA 10,0 mg/kg ($F_{(3,18)} = 6,969$, $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,01$ respectivamente).

TABELA 31 – Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a reatividade à metacolina das vias aéreas *in vitro* de camundongos.

Parâmetro	B	M	Met	Met/M
% KCL	233,2 ± 35,6	308,9 ± 22,9 ⁽¹⁾	197,6 ± 42,3 ⁽²⁾	202,7 ± 37,8 ⁽²⁾

Os dados representam as médias ± desvio padrão.

B – basal, M –tratado com MDMA 10,0 mg/kg, Met –tratado com metsergide - 5,0 mg/kg e Met/M – tratado com metsergide 5,0 mg/kg e MDMA 10,0 mg/kg. ⁽¹⁾ - p < 0,05 representa diferença quando comparado com o grupo basal e ⁽²⁾ - p < 0,05 representa diferença quando comparado com o grupo alérgico tratado MDMA 10,0 mg/kg. Teste de Kruskal Wallis.

FIGURA 52- Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a reatividade a metacolina das vias aéreas *in vitro* de camundongos tratados com MDMA – protocolo B. Os dados representam as médias ± desvio padrão de 6 camundongos por grupo; ⁽¹⁾ - p < 0,05 representa diferença quando comparado com o grupo basal e ⁽²⁾ - p < 0,05 representa diferença quando comparado com o grupo tratado com MDMA 10,0 mg/kg. Teste de Kruskal Wallis.

6.14 Experimento 14: Caracterização dos efeitos do MDMA-*ecstasy* 10mg/kg sobre a desgranulação de mastócitos em brônquio intrapulmonar de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados.

Trinta camundongos foram distribuídos ao acaso em 3 grupos: um basal (B), um grupo alérgico tratado com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g) (AS) e um grupo alérgico tratado com MDMA 10,0 mg/kg (AM). Os animais dos grupos AS e AM foram sensibilizados e desafiados conforme o item 4.7.1. Os animais do grupo AM foram tratados por via intraperitoneal com 10,0 mg/kg de MDMA, 30 minutos antes do desafio antigênico e os animais do grupo AS foram tratados com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g). Os animais do grupo basal não receberam qualquer manipulação e tratamento. 24 horas após o desafio antigênico os animais tiveram seus pulmões coletados e fixados em paraformaldeído e glutaraldeído conforme descrito no item 4.15.

A tabela 32 apresenta e as figura 53 e 54 ilustram os efeitos do MDMA-*ecstasy* 10mg/kg sobre a desgranulação de mastócitos em brônquio intrapulmonar de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados. De sua leitura defende-se que as análises dos cortes histológicos indicaram que os animais do grupo basal apresentavam mastócitos intactos no parênquima pulmonar (Fig 54-A), próximos aos vasos sanguíneos. No grupo AM os mastócitos apresentavam alta porcentagem de células intactas (Fig 54-; porém, no grupo AS os mastócitos apresentavam-se desgranulados (Fig 54-C), com seus grânulos citoplasmáticos metacromáticos dispersos no parênquima pulmonar. Análise adicional, mostrou uma diminuição do número de mastócitos intactos dos animais alérgicos tratados com salina ($F_{(2,20)} = 28,29$, $p \leq 0,001$) e um aumento do número de mastócitos desgranulados quando comparado aos grupo basal ($F_{(2,20)} = 28,29$, $p \leq 0,001$). Verificamos, ainda, redução significativa do número de mastócitos desgranulados ($F_{(2,20)} = 28,29$, $p \leq 0,01$) e um aumento do número destas células intactas ($F_{(2,20)} = 28,29$, $p \leq 0,001$) nos animais alérgicos tratados com MDMA quando comparados aos dos animais do grupo alérgico tratado com salina. A figura 55 mostrou uma redução do número de células no parênquima pulmonar de camundongos tratados com MDMA em relação ao dos animais do grupo alérgico tratado com NaCl 0,9%.

TABELA 32 – Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a quantificação e desgranulação de mastócitos em brônquio intrapulmonar de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados.

Mastócitos (células/mm ²)				
Grupos	Total	Intacto	Desgranulados	% Desgranulação
Basal	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0
AS	1,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0 ⁽¹⁾	1,2 ± 0,1 ⁽¹⁾	100
AM	1,5 ± 0,2	1,2 ± 0,1 ⁽²⁾	0,3 ± 0,1 ⁽²⁾	20

Os dados representam as médias ± desvio padrão por mm².

B – basal, AS – alérgico tratado com salina, AM – alérgico tratado com MDMA - 10,0 mg/kg. ⁽¹⁾ - p < 0,05 representa diferença quando comparado com o grupo basal e ⁽²⁾ - p < 0,05 representa diferença quando comparado com o grupo alérgico tratado com salina. Teste de Kruskal Wallis.

FIGURA 53- Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a quantificação e desgranulação de mastócitos em brônquio intrapulmonar de camundongos OVA-sensibilizados e desafiados. Os dados representam as médias ± desvio padrão de 6 camundongos por grupo; ⁽¹⁾ - p < 0,05 representa diferença quando comparado com o grupo basal e ⁽²⁾ - p < 0,05 representa diferença quando comparado com o grupo alérgico salina. Teste de Kruskal Wallis.

FIGURA 54- Análise dos mastócitos no tecido pulmonar. **(A)** Mastócitos no tecido pulmonar evidenciando grânulos metacromáticos no citoplasma. **(B)** No grupo AS, observamos mastócitos desgranulados, evidenciando grânulos metacromáticos dispersos na matriz extracelular. **(C)** Animais do grupo AM evidenciando mastócitos intactos. Coloração: azul de toluidina. Barra: 10 μ m.

FIGURA 55- Fotomicrografia do parênquima pulmonar de camundongos Balb/C; lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Os grupos consistiram de camundongos não manipulados (B), OVA - sensibilizados e desafiados tratados com salina (AS) e OVA – sensibilizados e desafiados tratados com MDMA 10,0 mg/kg (AM). Observa-se diminuição do infiltrado celular no parênquima pulmonar dos animais tratados com MDMA 10,0 mg/kg quando comparado aos dos animais do grupo Alérgico tratado com NaCl 0,9% (0,1 ml/10g).

7 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostraram que a administração de MDMA por via intraperitoneal produziu alterações comportamentais, neuroquímicas, modificações em parâmetros hematológicos e imunológicos da inflamação alérgica pulmonar de camundongos.

Diversos autores têm relatado a influência do 3,4-metilenodioximentanfetamina – MDMA - *ecstasy* sobre parâmetros fisiológicos e comportamentais de animais de laboratório. Neste sentido, há relatos na literatura mostrando que o MDMA, dependendo da dose administrada, induz uma variedade de efeitos incluindo-se aqui hipertermia, hiperatividade locomotora (FLETCHER et al., 2002, PALENICEK et al., 2005; THOMPSON et al., 2009), preferência por lugares condicionados (DOLY et al., 2009; MARONA-LEWICKA et al., 1996; MCGREGOR et al., 2003) e diminuição da atividade exploratória (MALDONADO; NAVARRO, 2000).

Os resultados comportamentais agora obtidos para o MDMA corroboram com estes e com outros da literatura. De fato, no presente trabalho observamos que as três doses maiores de MDMA (5,0, 10,0 e 20,0 mg/kg) produziram um aumento da locomoção total dos camundongos no campo aberto, em relação aos animais dos grupos controle. Observou-se, ainda, que os animais tratados com 5,0, 10,0 e 20,0 mg/kg de MDMA apresentaram menor exploração vertical e iniciaram menos movimentos do que os animais que receberam solução salina. Estas doses aumentaram, ainda, o tempo gasto pelos camundongos em movimentação.

É relevante ressaltar que os resultados dos estudos que examinaram os efeitos agudos do MDMA sobre o comportamento de animais de laboratório, em especial sobre os níveis de ansiedade, são contraditórios; ou seja, embora se tenha descrito uma ação ansiogênica para o MDMA em diferentes modelos animais de ansiedade (LIN et al., 1999; MORLEY; MCGREGOR, 2000; PAWLAK; SCHWARTING, 2005), existem evidências substanciais que suportam efeitos ansiolíticos para este fármaco (GURTMAN et al., 2002; NAVARRO; MALDONADO, 2002). Entretanto, metodologias farmacológicas diferentes usadas para analisar os efeitos ansiogênicos e ansiolíticos do MDMA sugerem que as diferenças relatadas na literatura tenham por base a natureza dose dependente dos efeitos medidos (COLE; SUMNALL, 2003a). De fato, Navarro e Maldonado (2002) observaram que o tratamento prolongado com MDMA na dose de 8,0 mg/kg evidenciou propriedades ansiogênicas para o mesmo, enquanto

que o mesmo tratamento feito com dose de 15,0 mg/kg de MDMA revelou propriedades ansiolíticas. Palenicek et al. (2005), nesse sentido, observaram que o MDMA produziu um aumento de atividade locomotora em camundongos machos e fêmeas, de maneira dose dependente.

Jähkel et al. (2000) mostraram que são três os fatores que refletem o comportamento de camundongos no campo aberto: 1- atividade (parâmetros relacionados à quantidade de locomoção); 2 – exploração (componentes espaciais de locomoção); e 3 – estado emocional. Assim, o campo aberto pode ser usado para medir a atividade locomotora, o comportamento exploratório ou os níveis de ansiedade. Sabe-se que drogas ansiogênicas causam, uma diminuição dose dependente das frequências de locomoção e de levantar com aumento paralelo da duração de imobilidade de animais observados no campo aberto (BHATTACHARYA; MITRA, 1992). Embora tenha-se observado neste experimento um aumento da atividade locomotora e do tempo gasto em movimento - parâmetros comuns observados após a administração de fármacos ansiolíticos no campo aberto - é mais provável que nossos achados reflitam efeitos diretos da droga nos sistemas neurais ligados à atividade motora. De qualquer forma, é relevante notar que a diminuição da frequência de levantar observada no presente experimento pode ser indício de um efeito ansiogênico para estas doses de MDMA (5,0, 10,0 e 20,0 mg/kg). Análises adicionais dos dados obtidos poderão trazer esclarecimentos.

Segundo Barnett (1966), os roedores têm preferências por locais próximos a superfícies verticais, provavelmente por ficarem menos expostos aos predadores. Tem-se sugerido que este comportamento chamado de tigmotático positivo – andar encostado a superfícies verticais – faz parte do repertório defensivo natural dos roedores (GROSSEN, HELLEY, 1973). Desta forma, pode-se refinar as avaliações sobre os níveis de ansiedade de roedores no campo aberto, analisando-se a locomoção realizada nas áreas central, periférica e tigmotáxica do aparelho. Segundo a teoria da tigmotaxia positiva, animais menos ansiosos apresentam maior atividade na zona central do aparelho. No presente experimento o MDMA (5,0, 10,0 e 20,0 mg/kg) aumentou a locomoção dos animais nas zonas periférica e tigmotáxica mas não na zona central do campo aberto. Estes dados sugerem que o nível de ansiedade dos animais após o fármaco difere nas zonas do aparelho, muito provavelmente devido ao nível de aversão diferenciado criado pelo ambiente. Estes resultados sugerem, que possíveis efeitos ansiogênicos do MDMA tenham – se somados a outros estímulos ansiogênicos provenientes do ambiente levando os animais a permanecer mais tempo nas zonas periféricas do campo aberto. De fato, uma diminuição de

interesse pela zona central associado ao aumento daquele pela zona tigmotóxica do campo aberto pode ser compreendido como um aumento de ansiedade (BOGUSZEWSKI; ZAGRODZKA, 2002). Nossos dados corroboram assim, com a observação de Palenicek et al., (2005) de que ratas tratadas com MDMA (10,0 mg/kg) movimentaram-se mais na zona periférica do campo aberto.

O estado de ansiedade tem sido descrito como sendo um componente essencial da resposta de defesa de homens e de animais (DEAKIN; GRAEFF, 1991; RODGERS et al., 1997, ROGERS et al., 2009). Infere-se ansiedade como sendo a apreensão experimentada por um indivíduo ou animal em resposta a um perigo indefinido, que desencadeia uma série de alterações neurobiológicas, tais como: náuseas, sudorese, tensão muscular, tonturas, hipervigilância e alterações no sistema imunológico (DONOVAN et al., 2010). Estresse, por outro lado, é um processo complexo pelo qual um organismo reage a eventos ambientais, físicos ou psicológicos que representam um desafio (GATCHELL; BAUM, 1983). No caso do presente experimento, o possível estado de ansiedade/estresse teria sido desencadeado pelo ambiente e por um efeito do MDMA sobre o SNC dos animais. De fato, diversos autores têm mostrado que o MDMA produz alterações fisiológicas, neuroquímicas e comportamentais semelhantes às aquelas observadas em situações de ansiedade e estresse (CONNOR et al., 2004; GURTMAN et al., 2002; MCGREGOR et al., 2003).

Pellow et al., (1985) propuseram um modelo para inferir níveis de ansiedade através da análise comportamental de animais no labirinto em cruz elevado (LCE); neste aparelho, os animais respondem a uma situação na qual o comportamento é influenciado por duas forças motivacionais opostas – a curiosidade pela exploração de ambientes novos e a aversão aos braços abertos. Os resultados que estes autores obtiveram corroboram com a conclusão de Montgomery (1995) de que a exposição aos braços abertos de um aparelho é aversiva, em relação aos braços fechados. Especificamente, o grupo de Pellow (1985) com a utilização do LCE - uma variação do aparelho utilizado pelo Montgomery (1958) e primeiramente descrito por Handley e Mithani (1984) - demonstrou que ratos tratados com fármacos ansiolíticos clássicos como, por exemplo, benzodiazepínicos apresentavam um aumento na porcentagem de tempo e no número de entradas nos braços abertos do LCE, enquanto que drogas que provocavam ansiedade reduziam este percentual de uma maneira significativa.

Deste modo, utilizamos o LCE para avaliar os efeitos do MDMA sobre os níveis de ansiedade dos animais. Nossos achados mostraram um aumento no percentual de entradas nos

braços abertos do labirinto em cruz elevado, nos animais tratados com 10,0 e 20,0 mg/kg de MDMA quando comparados aos animais do grupo controle e aos dos grupos tratados com 0,2, 1,0 e 5,0 mg/kg; mostrou-se, também, um aumento na taxa de permanência nos braços abertos em relação àquela registrada pelos animais dos grupos controle e tratado com 0,2 e 1,0 mg/kg de MDMA. Na evidência destes novos achados, parece, possível inferir que o MDMA tenha produzido após doses de 10,0 e 20,0 mg/kg efeitos semelhantes àqueles de fármacos ansiolíticos. No entanto, estes achados vão contra aqueles já discutidos por nós no campo aberto que sugerem propriedades ansiogênicas, para o MDMA, como também, com dados de diversos autores que relatam ser o MDMA ansiogênico quando avaliado no labirinto em cruz elevado (LIN et al., 1999; NAVARRO; MALDONADO, 2002). Quer nos parecer que estes efeitos contraditórios possam estar relacionados com: 1- dose e/ou frequência de administração da droga. De fato, Navarro e Maldonado (2002) mostraram que o MDMA, em baixas doses, apresenta propriedades ansiogênicas. Especificamente, os autores mostraram que a administração de 8,0 mg/kg de MDMA reduziu significativamente a taxa de permanência nos braços abertos e o número de entradas nos braços abertos quando comparado aos animais do grupo controle. Neste mesmo trabalho os autores mostraram que o tratamento com altas doses de MDMA (15,0 mg/kg) aumentou significativamente a taxa de permanência nos braços abertos e reduziu o número de entrada nos braços fechados sugerindo um efeito ansiolítico para esta dose. No mesmo sentido, Lin et al. (1999) avaliaram os efeitos de várias doses de MDMA no labirinto em cruz elevado. Os autores mostraram que a administração de 1,0 mg/kg não produziu efeitos e que a dose de 4,0 mg/kg diminuiu o número de entradas nos braços abertos enquanto que a administração de 20,0 mg/kg MDMA aumentou no número de entrada nos braços abertos; e 2- aos efeitos estimulantes do MDMA no Sistema Nervoso Central. De fato, Dawson et al. (1995) ao comparar os efeitos de drogas ansiolíticas e psicoestimulantes no LCE verificaram que ambas aumentavam a taxa de permanência nos braços abertos indicando um efeito ansiolítico. Deste modo, os autores mostraram que os efeitos ansiolíticos e ansiogênicos de drogas no LCE são confundidos por mudanças por elas induzidas na atividade locomotora, sugerindo que: o número de entrada nos braços seja uma medida incorreta de mudanças nos níveis de ansiedade para fármacos que afetam a atividade locomotora. Neste sentido, nossos resultados mostraram um aumento de locomoção no LCE.

A hipótese de que o LCE não seja adequado para medir níveis de ansiedade para fármacos psicoestimulantes é apoiada pelos dados por nós obtidos no teste de *Hole-Board*, um modelo utilizado para medida da atividade exploratória (Lister, 1990). Um dos parâmetros

primordialmente utilizados no teste do *hole-board* é o número de mergulho de cabeça e tempo gasto neste parâmetro. A análise dos dados agora obtidos no *hole-board* mostraram um aumento da locomoção total no aparelho em animais que receberam 5,0 e 10,0 mg/kg de MDMA em relação aos animais do grupo controle. Análise adicional mostrou um aumento na velocidade média dos animais tratados com 5,0 e 10,0 mg/kg em relação àquela registrada nos animais do grupo controle. Nossos dados mostram também, que a administração de 5,0 e 10,0 mg/kg reduziu o número de mergulhos de cabeça dos animais em relação ao medido no grupo controle (diminuição da atividade exploratória). Finalmente, evidenciaram uma redução no tempo gasto na execução deste parâmetro exploratório. Estes dados concordam com o perfil de fármacos ansiogênicos neste aparelho. Stankevicius et al. (2008) mostraram que a administração de 1,0 mg/kg de picrotoxina (fármaco ansiogênico) diminuiu: 1- a atividade locomotora; 2 – o tempo gasto em mergulho de cabeça; 3 – número de mergulho de cabeça avaliados no *hole board*. Neste sentido, o uso do diazepam (fármaco ansiolítico) aumentou os parâmetros medidos neste aparelho.

Neste contexto e com o intuito de reforçar a existência de efeitos ansiogênicos para a dose de 10,0 mg/kg de MDMA, avaliamos os efeitos desta droga sobre a exposição à presença e/ou odor de um predador. Para tanto utilizamos um modelo proposto por Yang et al. (2004).

Yang et al. (2004) utilizaram um modelo para avaliar o comportamento defensivo através da análise comportamental de animais em uma caixa de exposição a um predador; neste aparelho os animais respondem a uma situação na qual o comportamento é influenciado pela presença e/ou odor do predador. Especificamente, o grupo de Yang et al. (2004) verificou que camundongos expostos a um predador ou ao odor do mesmo apresentavam um aumento no tempo gasto com comportamentos de estiramento das patas e do corpo, de estiramento de aproximação, de *freezing* e de tempo de permanência na caixa de saída.

Nossos achados mostraram que a administração de 10,0 mg/kg de MDMA reduziu o tempo gasto com autolimpeza, o comportamento de estiramento de patas e do corpo, reduziu a exploração das regiões interna e periférica da arena de exposição, aumentou a permanência na caixa de saída e, por fim, aumentou o tempo de permanência no túnel de acesso à arena de exposição em ambas situações: presença do predador ou odor do mesmo.

Tendo em vista que, Delgado, Olsson e Phelps (2006) propuseram ser o medo caracterizado pela expectativa de um perigo eminente, parece-nos possível inferir que os animais que receberam 10,0 mg/kg de MDMA apresentavam comportamentos defensivos que poderiam ser entendidos como níveis aumentados de ansiedade e/ou medo. Neste sentido, Blanchard, Flannelly e Blanchard (1998) elaboraram um conceito através dos níveis de defesa de ratos selvagens frente a diferentes tipos de ameaça predatória. Neste contexto, o primeiro nível de defesa seria induzido por uma ameaça potencial, ou seja, o animal depara-se com a novidade que contém tanto possíveis fontes de satisfação de necessidades biológicas como possíveis perigos, ou, ainda, uma situação em que uma ameaça já tenha ocorrido no passado e que, embora não se ache, continua determinando um padrão de exploração cautelosa. O segundo nível, seria caracterizado por uma ameaça presente, porém distante; o animal já identificou o predador, porém este se encontra a uma distância maior que um determinado limite tido como crítico, para emissão de inibição comportamental. Por fim, o terceiro nível seria caracterizado por uma ameaça muito próxima, ou seja, o predador se encontra a uma distância inferior ao limite crítico ou já estabeleceu contato com a presa, sendo caracterizado por uma reação de fuga ou a luta (GRAEFF, 2004).

Quer nos parecer, que os efeitos comportamentais do MDMA verificados neste trabalho, possam ter sido fruto de várias respostas neuroendócrinas ligadas ao estresse/ansiedade. Além do mais, sabe-se, ser ele um potente liberador de neurotransmissores como serotonina e dopamina (CALLAWAY, WING; GEYER, 1990; KOCH; GALLOWAY, 1997), que resultam em propriedades psicoestimulantes para este fármaco em animais e seres humanos (LIECHTI; VOLLENWEIDER, 2001; COLE; SUMNALL, 2003). Neste sentido, McGregor et al. (2003), mostraram que ratos tratados com altas doses de MDMA exibiram aumento nos índices de ansiedade associados à perda significativa de 5-hidroxitriptamina (5-HT) e 5-HIAA na amígdala, hipocampo, estriado e córtex, e também, um aumento na densidade de receptores 5HT_{1B} em várias regiões cerebrais.

Nossos achados mostraram que o MDMA nas doses de 5,0 mg/kg e 10,0 mg/kg aumentou os níveis de noradrenalina no estriado e no córtex frontal dos animais tratados em relação aos animais do grupo controle; mostraram, também nestes animais, um aumento nos níveis estriatais de dopamina e de DOPAC o que sugere um aumento de atividade dos sistemas catecolaminérgicos no SNC dos animais tratados. Por outro lado, nossos achados indicaram que doses de 5,0 e 10,0 mg/kg o MDMA diminuíram o “*turnover*” de DA no estriado e córtex

frontal, como também, os níveis de DOPAC cortical. Análise dos dados obtidos com a 5HT mostraram que a administração de MDMA (10,0 mg/kg) aumentou os níveis estriatais de 5HT e de seu metabólito 5HIAA. A administração de 5,0 e 10,0 mg/kg de MDMA reduziu os níveis de 5HIAA e o “*turnover*” de serotonina no hipotálamo.

É relevante ressaltar, que o mecanismo de ação proposto para o MDMA envolve participação da serotonina, da noradrenalina e da dopamina (GREEN et al., 2003, RENEMAN, 2001). Especificamente, sugeriu-se que o MDMA provoque um aumento na liberação desses neurotransmissores na fenda sináptica e um bloqueio da captação dos mesmos pelos transportadores de serotonina e ou de dopamina pré-sinápticos; como resultado, observa-se uma diminuição nos estoques vesiculares dos neurotransmissores e, conseqüentemente, uma diminuição dos níveis de seus metabólitos (COLE e SUMNALL, 2003^a). Nossos achados concordam com os da literatura, visto termos observado que a administração de MDMA promoveu um aumento significativo nos níveis de noradrenalina, serotonina e dopamina no estriado, nos níveis de noradrenalina no córtex frontal e diminuição nos níveis de DOPAC cortical e 5HIAA hipotalâmico. Curiosamente, observamos também, um aumento nos níveis de DOPAC e de 5HIAA no estriado. Uma hipótese explicativa para a presente discrepância destes resultados estaria relacionada ao tempo de coleta do tecido cerebral, ou seja, no momento da coleta do estriado os níveis de DOPAC e 5HIAA estariam significativamente aumentados, ou seja, neste período o tempo transcorrido do tratamento teria sido insuficiente para permitir concentrações tissulares do fármaco que bloqueassem os transportadores de serotonina e dopamina.

Na evidência destes novos achados, parece possível sugerir que o aumento da atividade geral dos animais sob efeito da administração de 5,0 e 10,0 mg/kg de MDMA esteja relacionado à liberação dos neurotransmissores envolvidos com a atividade motora em particular, com as catecolaminas. Nossos achados evidenciam claramente um aumento dos níveis de dopamina e do seu substrato DOPAC no estriado, como também, um aumento dos níveis de noradrenalina no estriado e córtex frontal. Neste contexto, a literatura nos mostra que a dopamina representa um papel chave na atividade geral de camundongos, tratados com drogas psicoestimulantes como a anfetamina e cocaína (JACKSON et al., 1994; O’NEILL, SHAW, 1999; VENTURA et al., 2004); mostra, também, e que a administração de antagonistas de receptores D₁ e D₂ bloqueia de forma eficiente a estimulação locomotora induzida pelo MDMA em ratos (BALL, BUDREAU e REBEC, 2003; BUBAR et al., 2004). Camarero et al. (2002), mostraram que a administração

repetitiva de diferentes doses de MDMA promove um aumento dose dependente na liberação de dopamina no estriado e, ainda, que a liberação desta catecolamina induz um aumento na locomoção total de roedores (DAFTERS, 1995; CALLAWAY; GEYER, 1992). Sabe-se que a noradrenalina presente no SNC também está ligada à atividade motora (FLORIO; SAKATE; PALERMO-NETO, 1993) e que este neurotransmissor é um dos responsáveis pelos efeitos observados após administração de MDMA (GREEN et al., 2004). Deste modo, podemos sugerir que o aumento de noradrenalina no córtex frontal tenha de alguma forma, contribuído para os resultados obtidos com o MDMA na atividade geral dos animais.

A atividade dos sistemas monoaminérgicos centrais está ligada tanto à atividade exploratória como a transtornos comportamentais, como ansiedade/estresse e depressão (GROSSMAN, POTTER, 1999, HALLER, 2004). Neste sentido, já se relatou como agora sugerido, que a exposição de animais ao MDMA represente uma situação estressante (CONNOR; HARKIN; KELLY, 2004). Além do mais, tem sido proposto um papel importante da dopamina na mediação de respostas orgânicas aos diferentes estressores (CHARMANDARI et al., 2005; PARE; GLAVIN, 1993). Parece que dos sistemas dopaminérgicos, o mesolímbico e o mesocortical sejam aqueles que são ativados preferencialmente na vigência de ansiedade ou de estressores moderados (CARLSON et al., 1987). Neste contexto, uma ativação mais global, de toda a atividade dopaminérgica central ocorreria apenas após um estresse muito severo (ABERCROMBIE et al., 1989). De modo geral, relata-se que um estresse agudo produza um aumento do “*turnover*” de dopamina e uma redução dos seus níveis no SNC (PARE; GLAVIN, 1993). Do mesmo modo, os sistemas noradrenérgicos centrais estão ativados em situações indutoras de estresse como representado por um aumento do “*turnover*” de noradrenalina medido através da análise dos níveis deste neurotransmissor e de seu principal metabólito no SNC (ALVES et al., 2006; PARE; GLAVIN, 1993). Especificamente, áreas da região límbica como o hipotálamo, a amígdala e o hipocampo apresentam aumentos rápidos e de significativa magnitude no “*turnover*” de noradrenalina em resposta aos estressores como, por exemplo, contenção e choque nas patas (TANAKA et al, 1982) e comunicação emocional (ALVES et al., 2006; IIMORI et al, 1982).

Neste sentido, nossos achados são contraditórios aos da literatura; verificamos um aumento nos níveis de dopamina e de noradrenalina e uma diminuição do “*turnover*” de dopamina no estriado e córtex frontal. Esta discrepância de resultados poderia ser explicado pelo fato de que: 1- o efeito do estresse sobre a atividade dopaminérgica central dependeria não

apenas da intensidade do estímulo, mas também da situação indutora do estresse; 2- o MDMA agiria diretamente nos terminais pré-sinápticos no SNC. De fato, a administração de MDMA resulta em uma inibição da monoaminoxidase (MAO) e na liberação de neurotransmissores endógenos, produzindo em conjunto elevadas concentrações sinápticas de neurotransmissores e diminuição do “*turnover*” (MCCANN; RICAURTE 1993).

Picazo, Rubalcava e Guasti (1995), mostraram que a facilitação social induzida em ratos pelo MDMA estava relacionada com o aumento na liberação de 5HT e, conseqüentemente, com ativação dos receptores 5-HT_{1A} ou 5-HT_{2B}. Neste sentido, os efeitos ansiogênico do MDMA no LCE no teste de emergência em animais de laboratório, poderiam ser reflexo do aumento de 5-HT sináptico ativando os receptores 5-HT_{2A} ou 5-HT_{2C}. Nossos achados mostraram um aumento nos níveis de serotonina e de 5HIAA no estriado. Estes resultados permitem a sugestão de que o aumento de ansiedade ou de medo no campo aberto, no *hole-board* e na caixa de exposição ao predador poderia ser decorrência da liberação desse neurotransmissor nos terminais nervosos. Por outro lado, observamos uma diminuição dos níveis e “*turnover*” de 5-HT no hipotálamo. Uma possível explicação deste fato estaria, mais uma vez, na capacidade do MDMA em bloquear a recaptação de 5-HT e de seu metabólito (5-HIAA) e de depletar os níveis de 5-HT por inibição da enzima triptofano hidroxilase. Neste sentido, Connor, et al. (1998) observaram depleção de 5-HT no córtex de ratos 30 minutos após a administração de MDMA; relataram ainda, níveis aumentados de corticosterona plasmática nos animais.

Avaliações através de diversos testes comportamentais, bem como análises bioquímicas dos níveis séricos de corticosterona têm sido considerados bons indicadores da resposta orgânica ao estresse e à ansiedade (FONSECA et al., 2005; JACKSON; MOGHADDAM, 2004; LIGEIRO de OLIVEIRA et al., 2004; LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2008; COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010; PALERMO-NETO et al., 2003). Ou seja, fármacos ansiogênicos, são capazes, também de ativar o eixo hipotálamo – hipófise – adrenal (HHA), sendo o produto final desta cascata o cortisol em humanos e hamsters e a corticosterona em outros roedores (PALERMO-NETO; MASSOCO; SOUZA, 2003; PALERMO-NETO et al., 2008; STANKEVICIUS et al., 2008). Estes glicocorticóides sabidamente regulam os processos inflamatórios/ imunológicos (MCEWEN et al., 1997).

Neste momento é relevante comentar, que o funcionamento do eixo HHA é regulado por um sistema de *feedback* responsável pela manutenção da homeostasia do organismo. O núcleo

paraventricular do hipotálamo (PVN) contém células ricas em CRH. Em resposta aos diferentes tipos de estressores, o CRH é secretado dentro do sistema porta hipofisário e, ligando-se a receptores presentes na hipófise, libera ACTH. O ACTH, por sua vez, chega até a adrenal, liga-se a receptores específicos aí localizados, e promove a liberação dos glicocorticóides. Este hormônio, por sua vez, liga-se a receptores localizados na hipófise e no hipotálamo, inibindo a liberação de ACTH e CRH controlando, assim, sua própria liberação. Assim fecha-se a porção do *loop* negativo de controle do eixo HHA.

Nossos resultados para corticosterona mostraram que a administração de 5,0 e 10,0 mg/kg de MDMA ativou o eixo HHA aumentando significativamente os níveis séricos de corticosterona 30 e 60 minutos após a administração. Em experimento adicional, mostramos que este aumento se mantém elevado até 6 horas após a administração. Nossos dados concordam com os de Nash, Meltzer e Gudelsky (1988); estes autores mostraram que a administração de 10 mg/kg de MDMA produz, após 30 minutos, um aumento dos níveis séricos de corticosterona, que se mantém elevados durante 4 horas, possivelmente devido à ativação de receptores 5-HT₂ ou 5-HT_{1A}. Evidências têm demonstrado a participação de glicocorticóides na modulação das respostas observadas após administração de anfetamina. Swerdlow et al. (1993) mostraram que a administração aguda de anfetamina, por via subcutânea, nas doses de 1,0 e 5,0 mg/Kg aumentou os níveis plasmáticos de ACTH (hormônio adrenocortitrópico) e de corticosterona, o que configurava ocorrência de uma ativação do eixo HHA.

Diversos fármacos com ação no SNC são capazes de atuar como estressores químicos e, conseqüentemente, de interferir com a imunidade de animais de laboratório por alterar principalmente as atividades do eixo HHA e/ou a atividade do SNAS (De PAULA et al., 2009; LAZZARINI et al., 2006; LAZZARINI et al., 2003; RIGHI; PALERMO-NETO, 2003; SAKAI et al., 2006; STANKEVICIUS et al., 2008), como também, por agir diretamente em células imunes (LAZZARINI et al., 2006; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2003; RIBEIRO et al., 2010; SILVA et al., 2003). A exposição de animais ao MDMA e seus análogos pode ativar o eixo HHA (CONNOR, 2004) e, conseqüentemente alterar por via indireta a atividade imunológica (CONNOR et al., 2004; CONNOR et al., 1998; De PAULA et al., 2009; LIGEIRO de OLIVEIRA et al., 2004; LIGEIRO de OLIVEIRA, 2008; PACIFICI et al., 2002).

De fato, existe uma associação íntima entre os sistemas nervoso central e imune. Estudos ligados à neuroimunomodulação têm apresentado inúmeras evidências das relações de

reciprocidade entre estes sistemas (COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010). Uma meta – análise de estudos conduzidos em seres humanos procurou avaliar as relações entre estresse/ansiedade e parâmetros imunológicos. Mostrou-se que o estresse e a ansiedade estavam associados significativamente com (1) leucocitose, (2) redução do número de células NK e de linfócitos T, (3) aumento das relações CD4/CD8 e (4) moderada diminuição na atividade de células T e NK (ZORRILLA et al., 2001). Do mesmo modo, já se relatou a capacidade que apresentam os estressores de modificar a resposta imune de animais de laboratório. De fato, uma grande variedade de agentes estressores físicos ou psicológicos tem sido apontada como capaz de alterar a resposta imune de animais analisados em diferentes modelos experimentais (ALVES et al., 2006; ALVES et al., 2007; QUEIROZ et al., 2008).

O organismo dos seres humanos e dos animais reage ao estresse ativando um repertório complexo de respostas fisiológicas e comportamentais que podem prejudicar o sistema imunológico; desta forma, e tomados em seu conjunto, nossos resultados demonstram ser o MDMA capaz de produzir alterações comportamentais, neuroquímicas e endócrinas semelhantes às produzidas por estressores físicos; assim, pareceu-nos relevante entender, dentro de uma perspectiva neuroimune, possíveis efeitos do MDMA sobre a inflamação alérgica pulmonar de camundongos.

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas caracterizadas por broncoconstrição, aumento do número de células inflamatórias (linfócitos T, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e células dendríticas), perda de epitélio brônquico e reatividade da musculatura lisa dos brônquios (PEACHELL, 2005; SPAHAN; COVAR, 2008). O recrutamento e a ativação de células inflamatórias na patogenia da asma são modulados por mediadores inflamatórios tais como a histamina, leucotrienos, prostaglandinas, IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α , endotelina-1, óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio e fator de crescimento de colônia granulocítica macrofágica (GM-CSF) (AKDIS; AKIDS, 2009; HAWORT; LEVI, 2007).

O estado de ativação do sistema imune e o padrão de distribuição de células imunológicas no corpo são caracterizados pelo número e proporção de leucócitos circulantes sanguíneos. Deste modo, avaliamos os efeitos do MDMA sobre o número de leucócitos, eritrócitos, hematócrito e plaquetas de camundongos. Nossos resultados mostraram que o MDMA (10,0 mg/kg) aumentou o número de leucócitos, de eritrócitos e do hematócrito em relação aos animais do grupo controle. Nossos dados são de alguma forma, contraditórios aos de Connor et al. (1998), que relataram uma rápida redução na proliferação de linfócitos e uma redução do número total de

leucócitos circulantes em ratos tratados com MDMA e inoculados com concanavalina A; de fato, essas alterações foram acompanhadas por um aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona que persistiram durante 6 horas (CONNOR et. al., 2000). Sugere-se que o efeito contraditório do MDMA sobre o número de leucócitos possa estar relacionado com a concentração administrada e/ou com a contração dos linfonodos frente ao desafio fisiológico causado pelo fármaco, e conseqüentemente, com a ativação do SNAS. Neste sentido, e como já comentado, os efeitos medidos pelo MDMA são dependentes da dose administrada e do tempo de avaliação (COLE; SUMNALL, 2003). Assim, esta ausência de concordância pode ser explicada pela dose de MDMA por nós utilizada. De fato, De Paula et al. (2009) observaram um aumento no número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito dos animais tratados com MDMA (10,0 mg/kg); ainda, neste estudo, os autores não observaram alterações no número de leucócitos circulantes.

Neste sentido, sabe-se que as alterações entre o sistema nervoso e o sistema imune são extensas e podem incluir vários hormônios, neuropeptídeos, opióides e as catecolaminas. Deste modo, sabe-se ser as catecolaminas produtoras de vários efeitos imunomoduladores que podem ser tanto imunoestimulante como imunossupressores (MADDEN, 2003). Assim, outra hipótese explicativa para os efeitos do MDMA (10,0 mg/kg) envolveria a ativação do Sistema Nervoso Autônomo Simpático e, desta forma, uma modificação indireta da migração celular, via aumento dos níveis periféricos de adrenalina e de outras catecolaminas. Nesse sentido, sabe-se que algumas fibras do SNAS inervam órgãos linfóides (MADENN, FELTEN, 1995) entre eles o baço e os linfonodos. Estudos realizados com modelos animais mostraram que a administração local ou sistêmica de agonistas de receptor α_1 induz constrição do baço com concomitante aumento dos níveis de hemoglobina, hematócrito e de eritrócitos no sangue (OJIRI et al., 1993). Madden et al. (2004) mostraram um aumento na migração de linfócitos pré-incubados para os linfonodos em camundongos depletados de catecolaminas. Esses dados, tomados em seu conjunto, concordam com nossos resultados; observamos aumento no número de eritrócitos, e do hematócrito; e, ainda, aumento do número de leucócitos após tratamento com MDMA.

Estudos que registraram alterações de comportamento e/ou alterações endócrinas concomitantes com alterações de parâmetros relacionados à atividade do sistema imune após o tratamento *in vivo* com anfetamina, fortalecem essa visão. Assim, por exemplo, já foi observado que o tratamento agudo ou prolongado com anfetamina, além de aumentar a locomoção de ratos no campo aberto, diminuiu a proliferação de células T induzidas por concanavalina A (KUBERA et al., 2002).

Nossos dados agora obtidos permitem sugerir que o tratamento com MDMA em animais OVA - sensibilizados e desafiados tenha sido capaz de alterar a distribuição de células do sistema imune. Neste sentido, nosso experimento mostrou que a administração de 10,0 mg/kg de MDMA produziu um aumento no número total de leucócitos na medula óssea, aumento no número de células e peso relativo do baço, aumento no número de leucócitos e diminuição no número dos leucócitos do lavado broncoalveolar. Observamos, também, uma diminuição na porcentagem de monócitos e linfócitos sanguíneos e no número total de eosinófilos, macrófagos e neutrófilos no lavado broncoalveolar de animais alérgicos tratados com MDMA. Ligeiro de Oliveira et al. (2004) observaram que ratos OVA-sensibilizados tratados com anfetamina apresentaram uma diminuição na população de leucócitos no sangue periférico, no pulmão e um aumento no número de células na medula óssea; ainda neste trabalho os autores observaram uma diminuição na população de neutrófilos, monócitos e linfócitos no sangue periférico e uma diminuição no número de eosinófilos, macrófagos e neutrófilos no LBA. Nossos achados concordam com aqueles obtidos por Ligeiro de Oliveira (2004) e com outros da literatura. Do mesmo modo, diversos estudos em animais de laboratório e com seres humanos, tem revelado que o uso de MDMA interfere com a imunidade (CONNOR et al., 2004; CONNOR et al., 1998; PACIFICI et al., 1999; PACIFICI et al., 2002). Connor et al. 2004 mostraram que administração de 10 mg/kg de MDMA diminuiu o burst oxidativo de neutrófilos em resposta à fagocitose do zimozan opsonizado.

Sugere-se, assim, que fatores neuroendócrinos desencadeados após a administração de MDMA possam ter modulado o tráfego de leucócitos resultando numa redistribuição desses entre o sangue e outros compartimentos imunes. Neste sentido, a literatura tem mostrado que o estresse agudo induz grande, rápida e reversível mudança na distribuição de subpopulações de leucócitos do sangue periférico de ratos, e que a corticosterona é o maior mediador dessas mudanças agindo principalmente através de receptores de esteróides do tipo II nas adrenais (DHABHAR et al. 1996; LIGIEIRO de OLIVEIRA, 2008; SUQIN et al., 2009). Assim, uma das hipóteses explicativas para nossos achados é a de que a corticosterona esteja modulando a resposta imunológica, após a administração do MDMA.

Nossos dados obtidos após o pré-tratamento com mefipristona – (RU-486) confirmam a hipótese da participação da corticosterona na modulação da distribuição dos leucócitos. Observamos que o pré-tratamento com RU-486, um antagonista dos receptores de

glicocorticóide tipo II, alterou o padrão da resposta do tratamento com MDMA. Especificamente, a mifepristona reverteu os efeitos do MDMA no número de leucócitos totais do sangue e do pulmão, na porcentagem de linfócitos e monócitos sanguíneos. No LBA observamos que o tratamento com RU-486 reverteu em parte o número total de eosinófilos, neutrófilos e leucócitos da medula óssea. Nossos achados concordam com outros da literatura, que mostram a participação dos glicocorticóides na modulação da resposta inflamatória (CHIDA, et al., 2007; FORSYTHE et al., 2004). Neste sentido, Zhang et al. (2009) mostraram que o tratamento com RU-486 aumentou o número de eosinófilos no sangue periférico e na medula óssea dos ratos sensibilizados. Além do mais, os autores observaram um aumento nos níveis de interferon, diminuição de IL-4 e IL-5 e do balanço Th_2/Th_1 com predomínio da resposta Th_1 . É de amplo conhecimento que os glicocorticóides liberados em consequência de um estímulo estressor são potentes imunomoduladores, sendo capazes de direcionar o balanço Th_1/Th_2 para uma resposta do tipo Th_2 . Georen et al. (2005), também mostraram, que o tratamento com RU-486 e metirapona aumentou o número de eosinófilos na medula óssea e no lavado broncoalveolar. Ligeiro de Oliveira et al. (2004) observaram que o pré-tratamento com metirapona preveniu, em parte, a inibição da migração de células inflamatórias induzidas pela anfetamina em um modelo de inflamação alérgica pulmonar.

Por outro lado, já se descreveu uma supressão da proliferação de linfócitos sanguíneos independente da atividade do eixo HHA, tendo sido este estado atribuído a ações desencadeadas pelos sistemas catecolaminérgicos centrais e periféricos (ALVES, 2006; KELLER et al., 1988). Os leucócitos possuem em sua superfície diferentes subtipos de adrenorreceptores cuja expressão parece ser alterada pelo estado de ativação imunológica (CAZAUX et al., 1995). Aparentemente todos os leucócitos expressam receptores β - adrenérgicos em sua superfície com exceção dos clones Th_2 (MADDEN, 2003). Neste sentido, a quantidade de receptores β presentes na superfície das células imunes parece variar conforme o desenvolvimento do sistema imunológico e o grau de maturação das mesmas. A presença de α -adrenorreceptores em leucócitos não é facilmente detectada em condições normais. Alguns autores sugerem seja sua expressão observada apenas em células mononucleares (linfócitos, monócitos e macrófagos) de certos compartimentos (espaço peritoneal) ou ainda, na presença de certas condições patológicas. (ELLENKOV et al., 2000). Animais estressados apresentam níveis elevados de corticosterona no plasma, acompanhados por uma significativa diminuição no número e porcentagem de linfócitos (DHABHAR et al., 1995) e por um aumento no número e porcentagem de neutrófilos; sendo

estes efeitos reduzidos em animais adrenalectomizados (DHABHAR et al., 1995). Assim, já se observou que o MDMA exerce ação direta sobre vários tipos de receptores, incluindo-se aqui receptores 5-HT₂, M₁, α_2 e β e receptores H₁ (COLE; SUMNALL, 2003; GREEN et al., 2003; CONNOR, 2004). Deste modo, não podemos descartar a possibilidade de que o MDMA possa ter interagido com as células imunológicas via ativação destes receptores promovendo seus efeitos por ação direta nestas células.

Neste sentido, House e colaboradores (1995) verificaram o impacto “*in vitro*” do MDMA sobre os macrófagos peritoneais e esplenócitos de camundongos. Especificamente, os autores observaram que os efeitos da incubação (*in vitro*) com MDMA, dependem da dose empregada e do parâmetro imunológico estudado. De fato, os autores observaram que a incubação com 0,0001 μ M de MDMA aumentou a produção de citocinas Th1, IL-2, sendo ela suprimida pela exposição a 100 μ M da droga. Ainda e no mesmo trabalho, os autores observaram que a produção de citocinas Th2, IL-4, IL-6 e TNF não foi alterada após uso de todas as concentrações por eles estudadas. Do mesmo modo, Connor et al., (2000) observaram que a administração “*in vitro*” de MDMA não suprimiu a proliferação de citocinas pró-inflamatória IL-1 β e TNF- α , mostrando que os efeitos imunossupressores causados pelo MDMA, nestes parâmetros, não são mediados por ações diretas em células mononucleares do sangue periférico após desafio com LPS (CONNOR, 2004; CONNOR ET AL., 2000). A exposição “*in vivo*” e “*in vitro*” ao MDMA suprimiu de modo similar o *burst* oxidativo induzido pela fagocitose de neutrófilos de ratos (CONNOR; HARKIN; KELLY, 2004; DE PAULA, 2009).

A técnica de explante pulmonar permite a análise da geração continuada de mediadores no pulmão analisando o estado funcional das células estruturais e/ou recrutadas para o pulmão sem influência de mecanismos reguladores da inflamação *in vivo*. Desta forma, avaliamos a liberação espontânea e induzida por LPS de interleucinas IL-4, IL-5 e IL-10 em células pulmonares de animais OVA - sensibilizados e tratados com MDMA. Nossos achados mostraram uma diminuição da produção espontânea destas citocinas nos explantes provenientes de animais tratados com MDMA. Nossos dados mostraram uma diminuição na liberação de mediadores inflamatórios que associados aos resultados de diminuição do influxo celular para o espaço broncoalveolar dos animais tratados com MDMA sugerem que as células presentes estejam menos ativadas e liberem menos mediadores inflamatórios. Observamos também, que culturas de células incubadas com LPS não alteraram a liberação de mediadores inflamatórios

após um segundo estímulo, ou seja, não geraram mais mediadores. Assim, poderíamos então sugerir, que MDMA estaria alterando o estado funcional destas células de modo que após um segundo estímulo às mesmas responderiam com igual intensidade; porém, as análises do explante foram feitas 24 horas após o estímulo. Desta forma, pode ser que este espaço de tempo justifique a ausência de produção das interleucinas após o estímulo com LPS e não, a influência da droga no estado funcional das células frente ao segundo estímulo.

Os macrófagos são de extrema importância para a manutenção da homeostasia pulmonar. A ativação dos mesmos tem como consequência à liberação de eicosanóides, fator de agregação plaquetária (PAF), citocina, óxido nítrico e outros produtos (KOBAYASHI et al., 2006; MASSOCO; PALERMO-NETO, 1999). Tais mediadores estão implicados na contração da musculatura lisa, bem como a migração de células para o local da inflamação (WEERSINK et al., 1994; VISSERS et al., 2005).

A proliferação de eosinófilos é estimulada pelo fator estimulante de colônia granulocítica-macrofágica (GM-CSF), IL-3 e IL5. Uma vez migradas para o pulmão estas células têm capacidade de liberar agentes tóxicos, como: proteína básica principal (MBP), eosinófilo peroxidase (EPO) e proteína catiônica eosinofílica (ECP), os quais contribuem para a lesão epitelial e, conseqüentemente, para o desenvolvimento da hiperreatividade das vias aéreas (AHN et al., 2007; LAMPINEM et al., 2004; THOMAS; WARNER, 1996). Sob estimulação, estas células produzem fator ativador de plaquetas (PAF), leucotrieno B₄ (LTB₄), fator estimulador de colônia macrofágica-granulocítica (GM-CSF), fator de necrose tumoral (TNF) e, entre outros, proteína inflamatória do macrófago 1 α (MIP-1 α), IL-3, IL-4 e IL-5 (COYLE et al., 1995; HAMID; TULIC, 2009; MOQBEL, 2000).

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 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 (MONTESEIRIN et al., 2005; STITES, TERR, 1991). Sabe-se que estas células também estão envolvidas na síntese e liberação de citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α) que modulam os efeitos de linfócitos T e B (LLOYD; OPPENHEIN, 1992; MONTESEIRIN et al., 2005). Portanto, é possível concluir que os neutrófilos tenham 2 funções relacionadas à resposta imune-

inflamatória. Uma função eferente, que seria a fagocitose e a desgranulação e outra que seria aferente, relacionada com a liberação de citocinas imunomodulatórias.

Estes dados tomados em seu conjunto, levantaram a hipótese de que a diminuição do número de células no LBA de animais tratados MDMA, poderia estar relacionada com a diminuição da ativação das células no pulmão e, conseqüentemente, diminuição da liberação de mediadores inflamatórios, em especial, das citocinas. Neste contexto, sabe-se que as citocinas regulam eventos locais e sistêmicos, como também, que participam de diversos processos fisiológicos e patológicos (HAMID; TULIC, 2009). Das citocinas envolvidas no desenvolvimento da inflamação alérgica pulmonar, a IL-4 produzida por linfócitos Th₂, eosinófilos, basófilos e mastócitos, está relacionada com a síntese de imunoglobulina (Ig) pelos linfócitos B e com a expressão de VCAM-1 no endotélio vascular possibilitando o recrutamento dos eosinófilos e outras células inflamatórias (células T, monócitos e basófilos) para os locais da inflamação e, ainda, com o “switch” de Ig nos linfócitos B ativados para a síntese de IgE (DENORRY; YODOI; BANCHEREAU, 1990; TANGYE et al., 2002). A IL-5, por sua vez, é produzida por subpopulações Th₂ de células T CD₄⁺ e por mastócitos ativados atuando no crescimento, diferenciação e ativação dos eosinófilos (LARCHE; ROBINSON; KAY, 2003). Por fim, a IL-10, é uma citocina antiinflamatória, que é produzida pelos linfócitos Th₁ e Th₂, monócitos e macrófagos atuando na inibição da produção de citocinas por fagócitos mononucleares, células natural *killer* e linfócitos Th₂. (DEL PRETE et al., 1993). Na evidência desses dados, parece, possível sugerir que a diminuição do número de eosinófilos e neutrófilos no LBA de animais tratados com MDMA, esteja relacionada com a diminuição das citocinas IL-4 e IL-5 nos explantes de células pulmonares. Observamos, também, uma diminuição de IL-10 na cultura de células pulmonares dos camundongos. Uma possível explicação para estes achados é que estas reduções estariam relacionadas com a baixa produção e/ou diminuição do número de macrófagos no LBA após administração de MDMA. Calhoun et al. (1996) sugeriram que a baixa produção de IL-10 pelos macrófagos em asmáticos, via GM-CSF, permitia uma maior liberação de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo, desta forma, para a inflamação das vias aéreas (ROCHE et al., 1989).

O MDMA além de alterar parâmetros relacionados à resposta imune inata, também modifica aqueles ligados à resposta imune adaptativa. Assim, sabe-se ser o MDMA capaz de promover diminuição do número de células T CD₄⁺ circulantes, inibir a proliferação de linfócitos T induzida por mitógenos e suprimir a produção de citocinas do padrão Th₁

(CONNOR, 2004). Em ratos imunizados com *Keyhole limpet hemocyanin* (KLH), o tratamento *in vivo* com 10 mg/Kg de MDMA, apesar de não alterar a produção de IgM específica para o antígeno, modificou a capacidade das células produtoras de anticorpos de realizarem o *switch* para a produção de IgG_{2a} (padrão Th₁), o que resultou em redução dos níveis deste anticorpo (CONNOR et al., 2001).

O aumento da expressão dos genes codificadores de citocinas, moléculas de adesão, enzimas inflamatórias e receptores, na inflamação alérgica pulmonar, é regulado por fatores de transcrição como o fator nuclear-kappa B (NF- κ B) e o ativador protéico-1 (AP-1); estes, ligam-se às moléculas co-ativadoras, acetilam o núcleo das histonas e ativam os genes (VIKSMAN et al., 1997). Por outro lado, sabe-se que os corticóides atuam suprimindo múltiplos genes na inflamação alérgica pulmonar pela reversão da acetilação da histona. Especificamente, o mecanismo de ação, deste hormônio em nível celular, ocorreria através de sua ligação aos receptores de alta afinidade no citoplasma; o complexo esteróide-receptor possui capacidade de translocação nuclear, ligando-se ao DNA cromossômico. Esta ligação desencadeia ou inibe a transcrição do gene, num processo conhecido como transativação ou transrepressão (PUJOLS et al., 2004). Neste sentido, os glicocorticóides também, suprimem a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , quimiocinas (RANTES, eotaxina e MCP) e moléculas de adesão (ICAM-1 e E-selectina) (FERNANDES; VALERAI; ANSELMO-LIMA, 2008; TRIFILIEFF; EL-HASHIM; BERTRAND, 2000). Lamas, Leon e Schleimer (1994) mostraram que os glicocorticóides reduziram a transcrição gênica para expressão de IL-3, IL-5 e GM-CSF, interferindo com a diferenciação, ativação, quimiotaxia e capacidade de auto-regulação dos eosinófilos. Por tudo quanto exposto, parece-nos possível sugerir, que a corticosterona por entrar diretamente nas células do explante, tenha suprimido a transcrição de genes para mediadores inflamatórios e, conseqüentemente, diminuído a sua produção. De fato, mostramos anteriormente, um aumento nos níveis de corticosterona por até 6 horas após a administração do MDMA e, neste sentido, as células do SI e do SNC compartilham de receptores para citocinas, neurotransmissores, hormônios e neuropeptídeos (BLALOCK, 1984; GOULDING et al., 1998).

Como já mencionado, verificamos uma diminuição do número de leucócitos no LBA dos camundongos tratados com MDMA; desta forma, considerando-se a participação das moléculas de adesão na interação entre leucócito e endotélio, avaliamos se o tratamento com MDMA dos animais OVA – sensibilizados e desafiados, poderia resultar em alterações na expressão de

moléculas de adesão. Sabe-se ser o processo de adesão celular essencial para eventos biológicos como morfogênese, organização e estabilidade teciduais, resposta às infecções, cicatrização e inflamação (ULBRICH et al., 2003). Na asma, estas glicoproteínas atuam como moléculas sinalizadoras na regulação da inflamação e da resposta imune, sendo responsáveis pela adesão intercelular, adesão celular ao epitélio, adesão celular ao endotélio, recrutamento e migração seletiva de células inflamatórias dos vasos sanguíneos para o local da inflamação (KELLY et al., 2007). As CAMs estão agrupadas em quatro grupos: imunoglobulinas, caderinas, integrinas e, de relevância para este trabalho, as selectinas.

O grupo das selectinas é composto por receptores encontrados em células vasculares, que medeiam interações iniciais de adesão entre os leucócitos intravasculares e o endotélio vascular promovendo o rolamento destas células para as áreas de inflamação (MCEVER; MOORE; CUMMINGS, 1995; ROMANO, 2005). A família das selectinas é composta de três proteínas: E-selectina, também denominada ELAM-1 (*endothelial leukocyte adhesion molecule -1*), presentes nas células endoteliais e sintetizadas após estimulação pelas citocinas e liposacarídeos (LPS); a P-selectina, também denominada GMP-140 (*granule membrane protein - 140*) é encontrada nos grânulos- α das plaquetas e nos corpos de Weibel-Palade das células endoteliais e a L-selectina ou LECAM presente na superfície de linfócitos, monócitos e neutrófilos (KUMAR et al., 2005; ROMANO, 2005).

Os dados agora obtidos permitem sugerir que o tratamento de animais OVA - sensibilizados e desafiados com MDMA foi capaz de alterar a expressão de L -selectinas. Nosso experimento mostrou que a administração de 10,0 mg/kg de MDMA produziu uma diminuição da expressão de L – selectinas nos monócitos e neutrófilos do sangue periférico, como também, uma diminuição da expressão da mesma nos neutrófilos do lavado broncoalveolar. Neste contexto, sabe-se que a redução da transcrição induzida por corticóides inibe a expressão de moléculas de adesão do endotélio e dos leucócitos, tais como a E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 por ação direta ou por inibição da produção das citocinas IL-1 e TNF- β (CRONSTEIN et al., 1992) resultando numa diminuição da migração de células inflamatórias para os tecidos (SIMPSON et al., 2006). Deste modo, podemos sugerir que a diminuição da expressão de L-selectina dos leucócitos do sangue periférico e dos neutrófilos do LBA esteja relacionada com o aumento da liberação de corticosterona após tratamento com MDMA fato que, talvez, tenha contribuído para a redução que observamos do número de leucócitos no lavado broncoalveolar dos animais tratados com MDMA. De fato, diversos modelos experimentais de inflamação

alérgica das vias aéreas imputam aos neutrófilos relevante participação no desenvolvimento da inflamação (LACOSTE et al., 1993). Sugeriu-se que a expressão de L-selectina esteja aumentada na resposta alérgica na asma (MONTESEIRIN et al., 2005).

A inflamação alérgica pulmonar envolve alterações na reatividade das vias aéreas e ativação de células residentes (células epiteliais, macrófagos e mastócitos), que secretam mediadores químicos responsáveis, entre outras funções, pela constrição das vias aéreas e pelo influxo de leucócitos para o foco da lesão (MARTIN, FREVERT, 2005). Desta forma, e como já discutido anteriormente, observamos os efeitos do tratamento com MDMA no influxo de leucócitos para o pulmão, na ativação de células inflamatórias e na expressão de L-selectina; assim, pareceu-nos relevante avaliar os efeitos deste fármaco sobre a reatividade das vias aéreas *in vitro* de camundongos Ova-sensibilizados ou não. Nossos dados mostraram que o tratamento com MDMA alterou a contratilidade do músculo liso das traquéias de camundongos. Especificamente, observamos uma diminuição da contração da traquéia isolada dos animais alérgicos tratados com MDMA (10,0 mg/kg) após o desafio com a metacolina. Por outro lado, observamos que nos animais não sensibilizados o tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) aumentou a contração da traquéia após a administração da metacolina. Os agonistas muscarínicos, como grupo, são freqüentemente denominados parassimpaticomiméticos, em virtude de seus efeitos produzidos nos animais, que se assemelham aos da estimulação parassimpática. Neste sentido, a metacolina é utilizada como instrumento experimental nos estudos de reatividade das vias aéreas, por ligar-se aos receptores muscarínicos; estes quando estimulados, ativam fosfolipase do tipo C liberando o diacilglicerol (DAG) e o inositol-trifosfato (IP₃) resultando em um aumento das concentrações intracelulares de cálcio, intensificando a contração da musculatura lisa (DEKKER; PARKER, 1996). Do mesmo modo, sabe-se que os receptores de serotonina, em especial, o 5HT_{2A} estão ligados a fosfolipase C e, portanto, promovem a formação do IP₃/DAG intensificando a contração do músculo liso (ALLEN; YADAV; ROTH, 2008; JANSSEN, SIMS; 1993; ROTH et al., 1998^a). Diante do exposto, sugerimos duas hipóteses explicativas para nossos achados. 1- ter o MDMA - um potente liberador de neurotransmissores como serotonina e dopamina (BAUMANN et al., 2008) - levado a um aumento da concentração plasmática destes neurotransmissores e 2- ter o MDMA atuado diretamente nos mastócitos inibindo sua ativação e liberação de mediadores.

A hipótese do aumento da contração do músculo liso pela serotonina liberada, após tratamento com MDMA, é apoiada pela publicação de Zolkowska, Rothman e Baumann (2006)

que observaram que análogos da anfetamina, entre eles o MDMA, aumentaram a concentração plasmática de serotonina levando a complicações de doenças cardíacas e pulmonares. Desta forma, podemos sugerir que a serotonina liberada após administração do MDMA tenha facilitado a resposta contrátil à metacolina no músculo liso, levando a uma exacerbação do efeito. Nossos dados obtidos após o pré-tratamento com metisergide – um antagonista dos receptores 5HT_{2A} - confirmaram a hipótese da participação da serotonina na facilitação dos efeitos contráteis observados. Especificamente, observamos nos animais tratados com metisergide, antes da administração do MDMA, uma redução da contratilidade do músculo liso, retornando-a aos valores basais.

Sabe-se que na fase precoce da asma (também conhecida como fase aguda), destacam-se pelo seu importante papel, os mastócitos, considerados as principais células envolvidas nas reações de hipersensibilidade imediata. A liberação de mediadores de mastócitos está relacionada à existência de receptores para imunoglobulinas, existentes na membrana destas células. Estes receptores possuem alta afinidade pela porção Fc da imunoglobulina E (IgE) (GALLI et al., 2005; PEACHELL, 2005). A ligação antígeno~IgE nos receptores promove a ativação da célula. Os mastócitos sensibilizados secretam mediadores inflamatórios que incluem: aminas vasoativas (histamina e serotonina), eicosanóides, PAF, citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13), óxido nítrico e outros produtos (LINDSTEDT; KOVANEN, 2006; MAESTRELLI, 2004;). Dentre os principais efeitos decorrentes da liberação destes mediadores destacam-se a vasodilatação, o aumento do fluxo sanguíneo, da permeabilidade vascular, da produção e secreção de muco e da contração da musculatura lisa das vias aéreas (SIRACUSA et al., 2004).

Deste modo, observamos um aumento da contração do músculo liso da traquéia dos animais alérgicos tratados com salina. Provavelmente, e como discutido acima, este aumento de reatividade poderia estar, também, relacionado com a secreção de mediadores inflamatórios pelos mastócitos. Neste sentido, sabe-se que a serotonina e a histamina contribuem com a contração da musculatura lisa das vias aéreas; a histamina é liberada por mastócitos ativados que ao atuar nos receptores H₁, provoca contração do músculo liso das vias aéreas, constituindo um dos principais mediadores que causam redução do fluxo de ar na primeira fase da asma brônquica (LINDSTEDT; KOVANEN, 2006). Por outro lado, observamos nos animais alérgicos tratados com MDMA uma menor contratilidade do músculo liso da traquéia, em relação ao observado em animais alérgicos tratados com salina. Desta forma, e como sugerido acima, pode ser que o MDMA ao agir diretamente nos mastócitos tenha modificado sua ativação e alterado a habilidade desgranulação. De fato, mastócitos sensibilizados secretam em poucos minutos

mediadores inflamatórios que incluem a histamina, citocinas, proteases, eicosanóides e interleucinas e serotonina (RIVERA; GILFILLAN, 2006). Como já comentado, avaliamos o pré-tratamento com metisergide nos animais alérgicos tratados com MDMA e observamos que o antagonista reverteu em parte os efeitos do MDMA; este achado mostra que não apenas a serotonina, mas os demais mediadores reduzidos e/ou não liberados após a administração do MDMA caracterizaram a redução da contratilidade do músculo liso traqueal.

Por fim, buscamos avaliar os efeitos do tratamento com o MDMA no número e na atividade de mastócitos pulmonares. Adicionalmente os mastócitos contribuem para o desenvolvimento da resposta alérgica por ativação de células residentes e células vasculares para secretar mediadores adicionais e induzir o recrutamento celular para o foco inflamatório (LINO DOS SANTOS FRANCO, 2006). Nossos dados agora obtidos, mostraram que não foram encontradas diferenças no número de mastócitos entre os grupos. Por outro lado, observamos que nos animais alérgicos tratados com salina os mastócitos apresentavam-se desgranulados com seus grânulos citoplasmáticos metacromáticos dispersos no parênquima pulmonar, enquanto que nos animais alérgicos tratados com MDMA, os mastócitos apresentavam alta porcentagem de células intactas. Tomados em seu conjunto, podemos sugerir que este fármaco alterou os mecanismos de desgranulação destas células, diminuindo a liberação de mediadores inflamatórios e desta forma, contribuindo com redução a reatividade das vias aéreas e com os mecanismos da inflamação. De fato, observamos uma redução da inflamação e do número de leucócitos no parênquima pulmonar de animais tratados com MDMA. Uma possível explicação para estes achados, é que o MDMA tenha alterado a desgranulação do mastócito via liberação de corticosterona. Por outro lado, e como comentado acima, não podemos descartar uma ação direta do fármaco.

Diante desses achados, pode se dizer que o MDMA (*ecstasy*) tenha sido capaz de alterar diferentes parâmetros comportamentais, neuroquímicos e neuroendócrinos (aumento dos níveis de corticosterona), que em seu conjunto, culminaram em uma alteração na migração de leucócitos de camundongos alérgicos, com mobilização periférica de leucócitos na medula, redistribuição celular sanguínea, alteração do *homing* dos leucócitos, na expressão de citocinas em cultura pulmonar, diminuição da reatividade das vias aéreas e diminuição da desgranulação de mastócitos. Assim é possível sugerir que os efeitos comportamentais do MDMA verificados neste trabalho, possam ter sido fruto de várias respostas neuroendócrinas ligadas ao estresse/ansiedade induzidos pela droga e que as alterações da atividade do sistema imunológico

possam estar relacionadas com a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e/ou do sistema nervoso autonômico simpático. Quer nos parecer, por fim, que os efeitos do MDMA, na inflamação alérgica pulmonar possam representar importante ferramenta para o entendimento de como as drogas de abuso atuam nos processos neuroimunológicos que envolve os leucócitos em sua resolução.

8 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos, é possível afirmar que diferentes doses de MDMA (5,0, 10,0 e 20,0 mg/kg) produzem 30 minutos após a administração:

- ✓ - Aumento a atividade locomotora, diminuição da exploração vertical e diminuição do número de movimentos iniciados no campo aberto;
- ✓ Aumento da porcentagem de entradas nos braços abertos (%EA), aumento da taxa de permanência nos braços abertos (%TA), diminuição da porcentagem de entradas nos braços fechados (%EF) e diminuição da taxa de permanência nos braços fechados (%TF) no labirinto em cruz elevado;
- ✓ Aumento da locomoção total e diminuição da atividade exploratória no *hole-board*;
- ✓ Aumento no tempo gasto na caixa de saída, diminuição do tempo gasto no túnel de acesso, diminuição no número de entradas na zona interna, diminuição do número de entradas na zona periférica, diminuição do tempo gasto com autolimpeza e diminuição do número de acessos de risco na caixa de exposição ao predador;
- ✓ Aumento os níveis de noradrenalina no estriado e no córtex frontal, aumento nos níveis de dopamina e de DOPAC no estriado, diminuição dos níveis de DOPAC corticais, aumento dos níveis de 5-HT e de 5-HIAA no estriado, diminuição dos níveis de 5- HIAA e “*turnover*” de serotonina no hipotálamo e diminuição do “*turnover*” de dopamina no estriado e córtex frontal;
- ✓ Aumento nos níveis de corticosterona plasmática não apenas aos 30, mas também, aos 60, 120 e 360 minutos;
- ✓ Aumento no número de eritrócitos, aumento na porcentagem de células observadas no hematócrito e aumento no número de leucócitos circulantes;

- ✓ Diminuição da porcentagem de linfócitos e monócitos nos animais sensibilizados e desafiados com OVA;
- ✓ Aumento no número de leucócitos na medula óssea dos animais OVA-sensibilizados;
- ✓ Diminuição do número de leucócitos totais dos animais OVA-sensibilizados e diminuição do número de eosinófilos, macrófagos e neutrófilos dos animais OVA-sensibilizados no LBA;
- ✓ Aumento do número de células e peso relativo do baço dos animais OVA-sensibilizados;
- ✓ O uso do RU-486 – antagonista dos receptores de glicocorticóide tipo II - alterou o padrão da resposta do tratamento com MDMA. Após seu uso observou-se um aumento no número de linfócitos e de monócitos; na medula - diminuição do número total de leucócitos; no pulmão – aumento do número de eosinófilos e neutrófilos dos animais pré-tratados com RU-486;
- ✓ Diminuição da produção de IL-4, IL-5 e IL-10 espontânea e diminuiu a produção espontânea IL-4 em cultura estimulada com LPS no explante pulmonar;
- ✓ Redução da expressão de L-selectinas dos monócitos dos animais alérgicos tratados com MDMA e uma tendência de redução da expressão de L -selectinas dos neutrófilos dos animais alérgicos tratados com MDMA no LBA;
- ✓ Redução da contração da traquéia isolada dos animais alérgicos e aumento da contração daquela dos animais não sensibilizados e desafiados;
- ✓ O uso do metisergide – um antagonista dos receptores 5HT_{2A} – reverteu os efeitos do MDMA na contratilidade do músculo liso traqueal dos animais, retornando-a aos valores basais.
- ✓ Por fim, observou-se uma redução da desgranulação dos mastócitos nos brônquios intrapulmonares.

Em seu conjunto, estes resultados sugerem ser os efeitos do MDMA agora relatados fruto de respostas neuroendócrinas ligadas ao estresse/ansiedade induzido pela droga, via ativação do eixo HHA e/ou do sistema nervoso autonômico simpático dos camundongos, com consequente alteração dos parâmetros ligados à resposta imune na inflamação alérgica pulmonar.

REFERÊNCIAS

- ABBUD, R. D.; PALERMO-NETO, J. Effects of type II pyrethroid-cyhalothrin in rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 191, n.2, p. 167-176, 2003.
- ABERCROMBIE, E.D.; KEEFE, K.A.; DIFRISCHIA, D.S.; ZIGMOND, M.J. Differential effect of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex. **J Neurochem.**, v. 52(5), p.1655-8, 1989.
- AHN, J. H.; KIM, C. H.; KIM, Y. H.; KIM, S. J.; LEE, S. Y.; KIM, Y. K.; KIM, K. H.; MOON, H. S.; SONG, J. S.; PARK, S. H.; KWON, S. S. Inflammatory and remodeling events in asthma with chronic exposure to house dust mites: a murine model. **J. Korean Med. Sci.**, v. 22, n. 6, p. 1026-1033, 2007.
- AKDIS, C. A.; AKDIS, M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 123, n. 4, p. 735-746, 2009.
- ALLEN, J. A.; YADAV, P. N.; ROTH, B. L. Insights into the regulation of 5-HT_{2A} serotonin receptors by scaffolding proteins and kinases. **Neuropharmacology**, v. 55, p. 6, p. 961-968, 2008.
- ALVES, G. J.; VISMARI, L.; FLORIO, J. C.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a sick cage mate: Effects on noradrenaline turnover and neutrophil activity. **Neurosci. Res.**, v. 56, n. 2, p. 172-179, 2006.
- ALVES, G. J.; VISMARI, L.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a sick cage mate: effects on ascitic form of Ehrlich tumor growth and macrophage activity. **Neuroimmunomodulation**, V. 14, n. 6, p. 297-303, 2007.
- American thoracic society committee on diagnostic standards for nontuberculous disease, definitions and clarification of chronic bronchitis, asthma, and pulmonary emphysema. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 85, p. 762-68, 1962.
- AMMIT, A. J. The role of mRNA stability in airway remodelling. **Pulm. Pharmacol. Ther.**, v. 18, n. 6, p. 405-415, 2005.
- ARBES, S. J. JR.; GERGEN, P. J.; VAUGHN, B.; ZELDIN, D. C. Asthma cases attributable to atopy: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 120, n. 5, p. 1139-1145, 2007.
- AZPIROZ, A.; DE MIGUEL, Z.; FANO, E.; VEGAS, O. Relations between different coping strategies for social stress, tumor development and neuroendocrine and immune activity in male mice. **Brain Behav. Immun.**, v. 22, n. 5, p. 690-698, 2008.
- BADON, L. A.; HICKS, A.; LORD, K.; OGDEN, B. A.; MELEG-SMITH, S.; E VARNER, K. J. Changes in cardiovascular responsiveness and cardiotoxicity elicited during binge administration of Ecstasy. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 302, n. 3, p. 898-907, 2002.
- BAHADORI, K.; DOYLE-WATERS, M. M.; MARRA, C.; LYND, L.; ALASALY, K.; SWISTON, J.; FITZGERALD, J. M. Economic burden of asthma: a systematic review. **BMC Pulm. Med.**, v. 19, n. 1, p. 9-24, 2009.
- BALL, K. T.; BUDREAU, D.; REBEC, G. V. Acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on striatal single-unit activity and behavior in freely moving rats: differential involvement of dopamine D(1) and D(2) receptors. **Brain Res.**, v. 994, n. 2, p. 203-15, 2003.
- BARNES, P. J. New aspects of asthma. **J. Intern. Med.**, v. 231, n. 5, p. 453-461, 1992.

- BARNET, S. A. The rat: a study in behaviour. Chicago, IL: Aldie; 1966.
- BARNETT, S. A. (Ed) The rat: a study in behavior. Chicago: **University Chicago Press**, 1975. p. 318.
- BARTROP, R. W.; LUCKHURST, E.; LAZARUS, L.; KILOH, G.; PENNY, R. Depressed lymphocyte function after bereavement. **Lancet.**, v. 1, n. 8016, p. 834-836, 1977.
- BASSO, A. S.; PINTO, F. A.; RUSSO, M.; BRITTO, L. R.; DE SA-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **J. Neuroimmunol.**, v. 140, n. 1-2, p. 69-77, 2003.
- BASSO, S. A.; COSTA-PINTO, A. F.; GIORGETTI, B. L. R.; DE SA-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Neural pathways involved in food allergy signaling in the mouse brain: role of capsaicin-sensitive afferents. **Brain Res.**, v. 1009, n. 1-2, p. 181-188, 2004.
- BATEMAN, E. D.; HURD, S. S.; BARNES, P. J.; BOUSQUET, J.; DRAZEN, J. M.; FITZGERALD, M.; GIBSON, P.; OHTA, K.; O'BYRNE, P.; PEDERSEN, S.E.; PIZZICHINI, E.; SULLIVAN, S. D.; WENZEL, S.E.; ZAR, H. J. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. **Eur. Respir. J.**, v. 31, n. 1, p. 143-178, 2008.
- BATEMAN, E.; NELSON, H.; BOUSQUET, J.; KRAL, K.; SUTTON, L.; ORTEGA, H.; YANCEY, S. Meta-analysis: effects of adding salmeterol to inhaled corticosteroids on serious asthma-related events. **Ann. Intern. Med.**, v. 149, n. 1, p. 33-42, 2008.
- BAUMANN, M. H.; CLARK, R. D.; ROTHMAN, R. B. Locomotor stimulation produced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) is correlated with dialysate levels of serotonin and dopamine in rat brain. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 90, n. 2, p. 208-217, 2008.
- 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, n. 4826, p. 524-526, 1987.
- BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocr. Rev.**, v. 17, n. 1, p. 64-102, 1996.
- BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A.; SORKIN, E. Lymphokine-containing supernatants from con A-stimulated cells increase corticosterone blood levels. **J. Immunol.**, v. 126, n.1, p. 385-387, 1981.
- BESEDOVSKY, H. O.; DELREY, A. The cytokine-HPA axis feed-back circuit. **Z Rheumatol.**, v. 59 (Suppl 2:II), p. 26-30, 2000.
- BESEDOVSKY, H. O.; SORKIN, E.; FELIX, D.; HASS, H. Hypothalamic changes during immune response. **Eur. J. Immunol.**, v. 7, n. 5, p. 323-325, 1977.
- BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; DINARELLO, C. A. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. **Science.**, v. 233, n.4764, p. 652-654, 1986.
- BEXIS, S.; DOCHERTY, J. R. Effects of MDMA, MDA and MDEA on blood pressure, heart rate, locomotor activity and body temperature in the rat involve alpha-adrenoceptors. **Br. J. Pharmacol.**, v. 147, n. 8, p. 926-934, 2006.
- BHATTACHARYA, H. A.; MITRA, S. K. Anxiogenic activity of quinine: an experimental study in rodents. **Indian Exp. Biol.**, v. 30, n. 2, p. 33 - 37, 1992.
- BLALOCK, J. E. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. **Physiol. Rev.**, v. 69, n.1, p. 1-32, 1989.

- BLALOCK, J. E. Shared ligands and receptors as a molecular mechanism for communication between the immune and neuroendocrine systems. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 25, n. 741, p. 292-298, 1994.
- BLALOCK, J. E. The immune system as a sensory organ. **J. Immunol.**, v. 132, n. 17, p. 1067-1070, 1984.
- BLALOCK, J. E. The immune system as the sixth sense. **J. Intern. Med.**, v. 257, n.2, p.126-138, 2005.
- BLANCHARD, R. J.; FLANNELLY K. J.; BLANCHARD, D. C. Defensive reactions of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v.100, n. 2, p. 101-107, 1986.
- BLANCHET, M. R.; MCNAGNY, K. M. Stem cells, inflammation and allergy. **Allergy Asthma Clin. Immunol.**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2009.
- BLESSING, W. W.; SEAMAN, B. 5-hydroxytryptamine(2A) receptors regulate sympathetic nerves constricting the cutaneous vascular bed in rabbits and rats. **Neuroscience.**, v. 117, n. 4, p. 939-948, 2003.
- BOCHNER, B. S.; BUSSE, W. W. Allergy and asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 115, n. 5, p. 953-959, 2005.
- BOGUSZEWSKI, P.; ZAGRODZKA, J. Emotional changes related to age in rats - a behavioral analysis. **Behav. Brain Res.**, v. 119, n. 2, p. 323-332, 2002.
- BOTTASSO, O.; BAY, M. L.; BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A. Immunoendocrine alterations during human tuberculosis as an integrated view of disease pathology. **Neuroimmunomodulation.**, v. 16, n. 2, p. 68-77, 2009.
- BOTTASSO, O.; MORALES-MONTOR, J. Neuroimmunomodulation during infectious diseases: mechanisms, causes and consequences for the host. **Neuroimmunomodulation.**, v.16, n. 2, p. 65-67, 2009.
- BOUSO, J. C.; DOBLIN, R.; FARRÉ, M.; ALCÁZAR, M. A.; GÓMEZ-JARABO, G. MDMA-assisted psychotherapy using low doses in a small sample of women with chronic posttraumatic stress disorder. **J. Psychoactive Drugs.**, v. 40, n. 3, p. 225-236, 2008.
- BOUSQUET, J.; ANSOTEGUI, I. J.; VAN REE, R.; BURNEY, P. G.; ZUBERBIER, T.; VAN CAUWENBERGE, P.; European Union meets the challenge of the growing importance of allergy and asthma in Europe. **Allergy.**, v. 59, n. 1, p. 1-4, 2004.
- BRAIDA, D.; POZZI, M.; CAVALLINI, R. E.; SALA, M. 3,4 methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) impairs eight-arm radial maze performance and arm entry pattern in rats. **Behav. Neurosci.**, v. 116, n. 2, p. 298-304, 2002.
- BRENNAN, K. A.; SCHENK, S. Initial deficit and recovery of function after MDMA preexposure in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 184, n. 2, p. 239-246, 2006.
- British Thoracic Society Scottish Intercollegiate Guidelines Network. British Guideline on the Management of Asthma. **Thorax.**, v. 63 (Suppl 4), p. 1-121, 2008.
- BUBAR, M. J.; PACK, K. M. ; FRANKEL, P. S. ; CUNNINGHAM, K. A. Effects of dopamine D1- or D2-like receptor antagonists on the hypermotive and discriminative stimulus effects of (+)-MDMA. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 173, n. 3-4, p. 326-36, 2004.

- BUCKLEY, R. H. Certification in diagnostic laboratory immunology. **Ann. Intern. Med.**, v. 108, n. 3, p. 458-459, 1988.
- BUSSE, W. W. Anti-immunoglobulin E (omalizumab) therapy in allergic asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 8, pt. 2 p. S12-S17, 2001.
- BUSSE, W. W.; WANNER, A.; ADAMS, K.; REYNOLDS, H. Y.; CASTRO, M.; CHOWDHURY, B.; KRAFT, M.; LEVINE, R. J.; PETERS, S. P.; SULLIVAN, E. J. Investigative bronchoprovocation and bronchoscopy in airway diseases. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 1, n. 172-7, p. 807-816, 2005.
- CALHOUN, W. J.; JARJOUR, N. N.; GLEICH, G. J.; SCHWARTZ, L. B.; BUSSE, W. W. Effect of nedocromil sodium pretreatment on the immediate and late responses of the airway to segmental antigen challenge. **J. Allergy. Clin. Immunol.**, v. 98, n. 5, pt 2, p. (S46-S50), 1996.
- CALLAWAY, C. W.; GEYER, M. A. Stimulant effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in the nucleus accumbens of rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 214, n. 1, p. 45-51, 1992.
- CALLAWAY, C. W.; WING, L. L.; GEYER, M. A. Serotonin release contributes to the locomotor stimulant effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, V. 254, n. 2, p. 456-464; 1990.
- CAMARERO, J.; SANCHEZ, V.; O'SHEA, E.; GREEN, A. R.; COLADO, M. I. Studies, using in vivo microdialysis, on the effect of the dopamine uptake inhibitor GBR 12909 on 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy')-induced dopamine release and free radical formation in the mouse striatum. **J. Neurochem.**, v. 81, n. 5, p. 961-72, 2002.
- CAMPOS, H. DA S.; LEMOS, A. C. Asthma and COPD according to the pulmonologist. **J. Brás. Pneumol.**, v. 35, n. 4, p. 301-309, 2009.
- CAPELA, J. P.; CARMO, H.; REMIÃO, F.; BASTOS, M. L.; MEISEL, A.; CARVALHO, F. Molecular and cellular mechanisms of ecstasy-induced neurotoxicity: an overview. **Mol. Neurobiol.**, v. 39, n.3, p. 210-271, 2009.
- CARLSEN, K. H. Exercise induced asthma in children and adolescents and the relationship to sports. **Pediatr. Allergy Immunol.**, v. 9, n. 4, p.173-180, 1998.
- CARLSON, J.N.; HERRICK, K.F.; BAIRD, J.L.; GLICK, S.D. Stimulation of both D1 and D2 dopamine receptors appears necessary for full expression of postsynaptic effects of dopamine agonists: a neurophysiological study. **Brain Res.**, v. 6, p. 205-18, 1987.
- CAZAUX, C. A.; STERIN-BORDA, L.; GORELIK, G.; CREMASCHI, G. A. down-regulation of beta-adrenergic receptors induced by mitogen activation of intracellular signaling events in lymphocytes. **FEBS Lett.** v.364, n. 2, p.120-124, 1995.
- CHAN, E. D.; IRVIN, C. G. The detection of collapsible airways contributing to airflow limitation. **Chest.**, v. 107, n. 3, p. 856-859, 1995.
- CHARMANDARI, E.; CHROUSOS, G. P.; ICHIJO, T.; BHATTACHARYYA, N.; VOTTERO, A.; SOUVATZOGLOU, E.; KINO, T. The human glucocorticoid receptor (hGR) beta isoform suppresses the transcriptional activity of hGRalpha by interfering with formation of active coactivator complexes. **Mol. Endocrinol.**, v. 19, n. 1, p. 52-64, 2005.
- CHECK, E. Psychedelic drugs: the ups and downs of ecstasy. **Nature.**, v. 13 n. 429 (6988), p. 126-128, 2004.

- CHEN, E.; MILLER, G. E. Stress and inflammation in exacerbations of asthma. **Brain Behav. Immun.**, v. 21, n. 8, p. 993-999, 2007.
- CHEN, E.; STRUNK, R. C.; BACHARIER, L. B.; CHAN, M.; MILLER, G. E. Socioeconomic status associated with exhaled nitric oxide responses to acute stress in children with asthma. **Brain Behav. Immun.**, v. 24, n. 3, p. 444-450, 2010.
- CHIDA, Y.; SUDO, N.; SONODA, J.; HIRAMOTO, T.; KUBO, C. Early-life psychological stress exacerbates adult mouse asthma via the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 175, n. 4, p. 316-322, 2007.
- COHN, D. W.; DE SA-ROCHA, L. C. Differential effects of lipopolysaccharide in the social behavior of dominant and submissive mice. **Physiol. Behav.**, v. 87, n.5, p. 932-937, 2006.
- COLADO, M. I.; O'SHEA, E.; GRANADOS, R.; MURRAY, T. K.; GREEN, A. R. In vivo evidence for free radical involvement in the degeneration of rat brain 5-HT following administration of MDMA ('ecstasy') and p-chloroamphetamine but not the degeneration following fenfluramine. **Br. J. Pharmacol.**, v. 121, n.5, p. 889-900, 1997.
- COLE, J. C.; SUMNALL, H. R. The pre-clinical behavioural pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). **Neurosc. Biobehav. Rev.**, v.27, p.199-217, 2003.
- COLE, J. C.; SUMNALL, H. R. The pre-clinical behavioural pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). **Neurosc. Biobehav. Rev.**, v.27, p.199-217, 2003a.
- COLEMAN, J. W.; LAYTON, G. T.; STANWORTH, D. R. The kinetics of in vivo sensitization of rat peritoneal and lung mast cells: temporal dissociation from circulating levels of IgE. **Eur. J. Immunol.**, v. 13, n. 12, p. 994-998, 1983.
- CONNOR, T. J. Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'Ecstasy'): a stressor on the immune system. **Immunology.**, v. 111, n. 4, p. 357-367, 2004.
- CONNOR, T. J.; CONNELLY, D. B. E.; KELLY, J. P. Methylenedioxymethamphetamine (MDMA; 'Ecstasy') suppresses antigen specific IgG2a and IFN-gamma production. **Immunol. Lett.**, v. 78, n. 2, p. 67-73, 2001.
- CONNOR, T. J.; HARKIN, A.; KELLY, J. P. Methylenedioxymethamphetamine suppresses production of the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha independent of a beta-adrenoceptor-mediated increase in interleukin-10. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 312, n. 1, p. 134-143, 2004.
- CONNOR, T. J.; KELLY, J. P.; MCGEE, M. E.; LEONARD, B. E. Methylenedioxymethamphetamine (MDMA; Ecstasy) suppresses IL-1beta and TNF-alpha secretion following an in vivo lipopolysaccharide challenge. **Life Sci.**, v. 67, n. 13, p. 1601-1612, 2000.
- CONNOR, T. J.; MCNAMARA, M. G.; FINN, D.; CURRID, A.; O'MALLEY, M.; REDMOND, A. M.; KELLY, J. P. E.; LEONARD, B. E. Acute 3,4-methylenedioxymethamphetamine(MDMA) administration produces a rapid and sustained suppression of immune function in the rat. **Immunopharmacology.**, v. 38, n. 3, p. 253-260, 1998.
- CORRY, D. B.; KHERADMAND, F. Toward a comprehensive understanding of allergic lung disease. **Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.**, v. 120, n.1, p. 33-48, 2009.
- COSTA, F. G.; FRUSSA-FILHO, R.; FELICIO, L. F. The neurotensin receptor antagonist, SR48692, attenuates the expression of amphetamine-induced behavioural sensitisation in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 428, n. 1, p. 97-103, 2001.

- COSTA-PINTO, F. A.; BASSO, A. S.; BRITTO, L. R.; MALUCELLI, B. E.; RUSSO, M. Avoidance behavior and neural correlates of allergen exposure in a murine model of asthma. **Brain Behav. Immun.**, v.19, n.1, p.52-60, 2005.
- COSTA-PINTO, F. A.; PALERMO-NETO, J. Neuroimmune interactions in stress. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 3, p. 196-199, 2010.
- COUTO-MORAES, R.; PALERMO-NETO, J.; MARKUS, R. P. - The immune-pineal axis: stress as a modulator of pineal gland function. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 153, p. 193-202, 2009.
- COYLE, A.; LE-GROS, G.; BERTRAND, C.; TSUIYUKI, S.; HEUSSER, C. H.; KOPF, M.; ANDERSON, G. P. Interleukin-4 is required for the induction of lung TH2 mucosal immunity. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 13, n. 1, p. 54-59, 1995.
- A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1.
- CRONSTEIN, B. N.; KIMMEL, S. C.; LEVIN, R. I.; MARTINIUK, F.; WEISSMANN, G. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 89, N. 21, P. 9991-9995, 1992.
- CURRAN, T. E.; MORGAN, J. I. Superinduction of c-fos by nerve growth factor in the presence of peripherally active benzodiazepines. **Science**, v. 229, n. 4719, p. 1265-1268, 1985.
- DAFTERS, R. I. Hyperthermia following MDMA administration in rats: effects of ambient temperature, water consumption, and chronic dosing. **Physiol Behav.**, v. 58, n. 5, p. 877-82, 1995.
- DAZA-LOSADA, M.; RODRÍGUEZ-ARIAS, M.; AGUILAR, M. A.; MIÑARRO, J. Acquisition and reinstatement of MDMA-induced conditioned place preference in mice pre-treated with MDMA or cocaine during adolescence. **Addict. Biol.**, v. 14, n. 4, p. 447-456, 2009.
- DAWSON, R.G.; CRAWFORD, P. S.; COLLINSON, N.; IVERSEN, D.S.; TRICKLEBANK, D.M. Evidence that the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze are confounded by increases in locomotor activity. **Psychopharmacology**, v.118, n. 1, p. 316-323, 1995.
- DE ALMEIDA, S. P.; SILVA, M. T. Characteristics of ecstasy users in São Paulo, Brazil. **Subst. Use Misuse**, v. 40, n.3, p. 395-404, 2005.
- DE ALMEIDA, S. P.; SILVA, M. T. Ecstasy (MDMA): effects and patterns of use reported by users in São Paulo. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 25, n.1, p. 11-17, 2003.
- DE LA TORRE, R.; FARRÉ, M. Neurotoxicity of MDMA (ecstasy): the limitations of scaling from animals to humans. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 25, n. 10, p. 505-508, 2004.
- DE PAULA, V. F.; RIBEIRO, A.; PINHEIRO, M. L.; SAKAI, M.; LACAVA, M. C.; LAPACHINSKE, S. F.; MOREAU, R. L.; PALERMO-NETO, J. Methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy) decreases neutrophil activity and alters leukocyte distribution in bone marrow, spleen and blood. **Neuroimmunomodulation**, v. 16 n. 3, p. 191-200, 2009.
- DEAKIN, J. F.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defense. **J. Psychopharmacol.**, v. 5 n. 4, p. 305 - 315, 1991.
- Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production.

- DEKKER, L. V.; PARKER, P. J. Regulated binding of the protein kinase C substrate GAP-43 to the V0/C2 region of protein kinase C-delta. **J. Biol. Chem.**, v. 272 n. 19, p. 12747-12753, 1997.
- DEL PRETE, G. D. E.; CARLI, M.; ALMERIGOGNA, F.; GIUDIZI, M. G.; BIAGIOTTI, R.; ROMAGNANI, S. **J. Immunol.**, v. 150, n. 2, p. 353-360, 1993.
- DEL REY, A.; BESEDOVSKY, H. O. The cytokine-HPA axis circuit contributes to prevent or moderate autoimmune processes. **Z Rheumatol.**, v. 59 (Suppl 2:II), p. 31-35, 2000.
- DELGADO, R. M.; OLSSON, A.; PHELPS, A. E. Extending animal models of fear conditioning to humans. **Biological Psychology.**, v. 73, n. 1, p. 39-48, 2006.
- DENOROY, M. C.; YODOI, J.; BANCHEREAU, J. Interleukin 4 and interferons alpha and gamma regulate Fc epsilon R2/CD23 mRNA expression on normal human B cells. **Mol. Immunol.**, v. 27, n. 2, p. 129-134, 1990.
- DHABHAR, F. S.; MILLER, A. H.; MCEWEN, B. S.; SPENCER, R. L. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. **Journal of Immunology**, v. 157, n. 4, p. 1638-1644, 1996.
- DHABHAR, F. S.; MILLER, A. H.; MCEWEN, B. S.; SPENCER, R. L. Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. **Journal of Immunology**, v. 157, p. 1638-1644, 1995.
- DOLY, S.; BERTRAN-GONZALEZ, J.; CALLEBERT, J.; BRUNEAU, A.; BANAS, S. M.; BELMER, A.; BOUTOURLINSKY, K.; HERVÉ, D.; LAUNAY, J. M.; MAROTEAUX, L. Role of serotonin via 5-HT2B receptors in the reinforcing effects of MDMA in mice. **PLoS One.**, v. 4, n. 11, p. e7952, 2009.
- DUNN, A. J. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. **Clin. Neurosci. Res.**, v. 6, n. 1-2, p. 52-68, 2006.
- DUNN, A. J. Interactions between the nervous system and the immune system. In: BLOOM, F. E.; KUPFRE, D. J. (Ed). **Psychopharmacology: The fourth generation of progress**. New York: Raven Press, 1995. p. 719-731.
- DURCAN, N. COSTELLO, R. W.; MCLEAN, W. G.; BLUSZTAJN, J.; MADZIAR, B.; FENECH, A. G.; HALL, I. P.; GLEICH, G. J.; MCGARVEY, L.; WALSH, M. T. Eosinophil-mediated Cholinergic Nerve Remodeling. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 34, n. 6, p. 775-786, 2006.
- EASTON, N.; FRY, J.; O'SHEA, E.; WATKINS, A.; KINGSTON, S.; MARSDEN, C. A. Synthesis, in vitro formation, and behavioural effects of glutathione regioisomers of alpha-methyldopamine with relevance to MDA and MDMA (ecstasy). **Brain Res.**, v. 17, n. 987 (2), p. 144-154, 2003.
- ELK, C. MDMA (Ecstasy): useful information for health professionals involved in drug education programs. **J. Drug Educ.**, v. 26, n. 4, p. 349-356, 1996.
- EL-MALLAKH, R. S.; ABRAHAM, H. D. MDMA (Ecstasy). **Ann. Clin. Psychiatry.**, v. 19, n. 1, p. 45-52, 2007.
- ELENKOV, I. J.; WILDER, R. L.; CHROUSOS, G. P.; VIZI, E. S. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 595-638, 2000.

- ENGLER, H.; DAWILS, L.; HOVES, S.; KURTH, S.; STEVENSON, J. R.; SCHAUENSTEIN, K.; STEFANSKI, V. Effects of social stress on blood leukocyte distribution: the role of alpha- and beta-adrenergic mechanisms. **J. Neuroimmunol.**, v. 156, n. 1-2, p. 153-162, 2004.
- ESTEBAN, B.; O'SHEA, E.; CAMARERO, J.; SANCHEZ, V.; GREEN, A. R.; COLADO, M. I. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine induces monoamine release, but not toxicity, when administered centrally at a concentration occurring following a peripherally injected neurotoxic dose. **Psychopharmacology (Berl)**., v. 154, n. 3, p. 251-260, 2001.
- FANTEGROSSI, W.E.; ULLRICH, T.; RICE, K.C.; WOODS, J.H.; WINGER, G. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") and its stereoisomers as reinforcers in rhesus monkeys: serotonergic involvement. **Psychopharmacology (Berl)**., v. 161, n. 4, p. 356-364, 2002.
- FARIA, R.; MAGALHAES, A.; MONTEIRO, P. R.; GOMES-DA-SILVA, J.; AMELIA TAVARES, M.; SUMMAVIELLE, T. MDMA in adolescent male rats: decreased serotonin in the amygdala and behavioral effects in the elevated plus-maze test. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1074, n. 2, p.643-649, 2006.
- FERNANDES, A. M.; VALERA, F. C.; ANSELMO-LIMA, W. T. Mechanism of action of glucocorticoids in nasal polyposis. **Braz. J. Otorhinolaryngol.**; v. 74, n. 2, p. 279-283, 2008.
- FESSEL, W. J.; SOLOMON, G. F. Psychosis and systemic lupus erythematosus: a review of the literature and case reports. **Calif. Med.**, v. 92, p. 266 –270, 1960.
- FISH, J. E.; PETERS, S. P. Asthma severity: histopathologic correlations. **Drugs Today (Barc)**., v. 35, n. 8, p.585-594, 1999.
- FLETCHER, P. J.; KORTH, K. M.; ROBINSON, S. R.; BAKER, G. B. Multiple 5-HT receptors are involved in the effects of acute MDMA treatment: studies on locomotor activity and responding for conditioned reinforcement. **Psychopharmacology (Berl)**., v. 162, n. 3, p. 282-291, 2002.
- FLÓRIO, J. C.; SAKATE, M.; PALERMO-NETO, J. Effects of amitraz on motor function. **Pharmacol Toxicol.**, v. 73, n. 2, p. 109-14, 1993.
- FONE, K. C.; BECKETT, S. R.; TOPHAM, I. A.; SWETTENHAM, J.; BALL, M.; MADDOCKS, L. Long-term changes in social interaction and reward following repeated MDMA administration to adolescent rats without accompanying serotonergic neurotoxicity. **Psychopharmacology (Berl)**., v. 159, n. 4, p. 437-444, 2002.
- FONSECA, E. S. M.; MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J. Effects of Prenatal Stress on Stress – induced behavioral and immunological responses in mice. **Phisiol. Behav.**, v. 43, n. 2-3, p. 429 - 435, 2002.
- FONSECA, E. S.; SAKAI, M.; CARVALHO-FREITAS, M. I.; PALERMO-NETO, J. Naloxone treatment prevents prenatal stress effects on peritoneal macrophage activity in mice offspring. **Neuroendocrinology**., v. 81, n. 5, p. 322-328, 2005.
- Forensic science service (FSS) reported on 3,4-methylenedioxymethylamphetamine (MDMA) – precursors, synthetic routes and seizure data for the ACMD review of ecstasy. Written evidence submitted to the ACMD, 2008a.
- FORSYTHE, P.; EBELING, C.; GORDON, J. R.; BEFUS, A. D.; VLIAGOFTIS, H. Opposing effects of short- and long-term stress on airway inflammation. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 169, n. 2, p. 220-226, 2004.
- GAFFIN, J. M.; PHIPATANAKUL, W. The role of indoor allergens in the development of asthma. **Curr. Opin. Allergy. Clin. Immunol.** v. 9, n. 2, p. 128-135, 2009.

- GALLI, S. J.; KALESNIKOFF, J.; GRIMBALDESTON, M. A.; PILIPONSKY, A. M.; WILLIAMS, C. M.; TSAI, M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. **Annu. Rev. Immunol.** v. 23, n.1, p. 749-786, 2005.
- GATCHELL, R. J.; BAUUM, A. An introduction to health psychology reading. **Maryland: Addison-Wesley Publishing**, 112p. 1983.
- GEORÉN, S.; AHNBLAD, P.; STJÄRNE, P.; WIKSTRÖM, A. C.; STIERNA, P. Significance of endogenous glucocorticoid sensitivity for airway eosinophilia in a murine model of allergy. **Acta Otolaryngol.**, v. 125, n. 4, p. 378-385, 2005.
- GLEICH, G. J.; KITA, H. Bronchial asthma: lessons from murine models. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 94, n. 6, p. 2101-2102, 1997.
- GODBOUT, J. P.; MOREAU, M.; LESTAGE, J.; CHEN, J.; SPARKMAN, N. L.; O' CONNOR, J.; CASTANON, N.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R.; JOHNSON, R. W. Aging exacerbates depressive-like behavior in mice in response to activation of the peripheral innate immune system. **Neuropsychopharmacology.**, v. 33, n.10, p. 2341-2351, 2008.
- GORDON, J.; BARNES, N. M. Lymphocytes transport serotonin and dopamine: agony or ecstasy? **Trends Immunol.**, v. 24, n. 8, p. 438-443, 2003.
- GOULDING, N. J.; EUZGER, H. S.; BUTT, S. K.; PERRETTI, M. Novel pathways for glucocorticoid effects on neutrophils in chronic inflammation. **Inflamm. Res.**, v. 47 n. 3 p. Suppl (S158-S165), 1998.
- GRAEFF, F. G. Drogas psicotrópicas e seu modo de ação. In: **GRAEFF, F.G (Ed.)**. São Paulo: Editora Pedagógica, 1989. p. 61-83.
- GRAEFF, F. G. Serotonina, matéria cinzenta Periaquedutal e transtorno do pânico. **Rev. Bras. Psiquiatria.**, v. 25 n. 1 (Supl II), p. 42-45, 2004.
- GREEN, A. R.; MCGREGOR, I. S. On the anxiogenic and anxiolytic nature of long-term cerebral 5-HT depletion following MDMA. **Psychopharmacology (Berl)**., v. 162, n. 4, p. 448-450, 2002.
- GREEN, A. R.; MECHAN, A. O.; ELLIOTT, J. M.; O'SHEA, E.; COLADO, M. I. The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). **Pharmacol. Rev.**, v. 55, n. 3, p. 463-508, 2003.
- GREEN, A. R. ; SANCHEZ, V.; O'SHEA, E.; SAADAT, K. S.; ELLIOTT, J. M.; COLADO, M. I. Effect of ambient temperature and a prior neurotoxic dose of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on the hyperthermic response of rats to a single or repeated ('binge' ingestion) low dose of MDMA. **Psychopharmacology (Berl)**., v. 173, n. 3-4, p. 264-9, 2004.
- GREER, G.; TOLBERT, R. Subjective reports of the effects of MDMA in a clinical setting. **J. Psychoactive Drugs.**, v. 18, n. 4, p. 319-327, 1986.
- GROSSEN, N. E.; KELLEY, M. J. Species-specific behavior and acquisition of avoidance behavior in rats. **J. Comp. Psychol.**, v. 81, n. 1, p. 307- 10, 1973.
- GROSSMAN, F.; POTTER, W. Z. Catecholamines in depression: a cumulative study of urinary norepinephrine and its major metabolites in unipolar and bipolar depressed patients versus healthy volunteers at the NIMH. **Psychiatry Res.**, v. 87, n. 1, p. 21-7, 1999.

- GRUCHALLA, R. S.; PONGRACIC, J.; PLAUT, M.; EVANS, R. 3rd.; VISNESS, C. M.; WALTER, M.; CRAIN, E. F.; KATTAN, M.; MORGAN, W. J.; STEINBACH, S.; STOUT, J.; MALINDZAK, G.; SMARTT, E.; MITCHELL, H. Inner City Asthma Study: relationships among sensitivity, allergen exposure, and asthma morbidity. **J. Allergy. Clin. Immunol.**, v. 115, n 3, p. 478-485, 2005.
- GUPTA, A.; CHEETHAM, T.; JAFFRA, Y. C.; ULLMAN, D.; GIBB, I.; SPENCER, D. A. Repeatability of the low-dose ACTH test in asthmatic children on inhaled corticosteroids. *Acta Paediatr.* v. 98, n. 12, p. 1945-1949, 2009.
- GURTMAN, C. G.; MORLEY, K. C.; LI, K. M.; HUNT, G. E.; MCGREGOR, I. S. Increased anxiety in rats after 3,4-methylenedioxymethamphetamine: association with serotonin depletion. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 446, n. 1-3, p. 89-96, 2002.
- HALLADAY, A. K.; KUSNECOV, A.; MICHNA, L.; KITA, T.; HARA, C.; WAGNER, G. C. Relationship between methamphetamine-induced dopamine release, hyperthermia, self-injurious behaviour and long term dopamine depletion in BALB/c and C57BL/6 mice. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 93, n. 1, p. 33-41, 2003.
- HALLER, C. A. St John's wort, depression, and catecholamines. **Clin Pharmacol Ther.**, v. 76, n. 5, p. 393-5, 2004.
- HAMELMANN, E. Genesis of airway inflammation and hyperreactivity: insight into the asthma mouse model. **Pneumologie**, v. 53, n. 6, p. 307-312, 1999.
- HAMELMANN, E.; SCHLEIMER, R. P. Corticosteroid treatment in bronchial asthma: for better or for worse? **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 111, n. 2, p. 248-250, 2003.
- HAMID, Q.; TULIC, M. Immunobiology of asthma. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 71, n.1, p. 489-507. 2009.
- HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoreceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behavior. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacology**, v. 327, n.1, p. 1-5, 1984.
- HARKIN, A.; SHANAHAN, E.; KELLY, J. P.; CONNOR, T. J. Methylenedioxyamphetamine produces serotonin nerve terminal loss and diminished behavioural and neurochemical responses to the antidepressant fluoxetine. **Eur. J. Neurosci.**, v. 18, n4, p. 1021-1027, 2003.
- HARLAN, R. E.; GARCIA, M. M. Drugs of abuse and immediate-early genes in the forebrain. **Mol. Neurobiol.**, v. 16, n. 3, p. 221-267, 1998.
- HAWORTH, O.; LEVY, B. D. **Endogenous lipid mediators in the resolution of airway inflammation.** **Eur. Respir. J.**, v. 30, n. 5, p. 980-992, 2007.
- HEGADOREN, K. M.; BAKER, G. B.; BOURIN, M. 3,4-Methylenedioxy analogues of amphetamine: defining the risks to humans. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 23, n. 4, p. 539-553, 1999.
- HERBERTH, G.; WEBER, A.; RÖDER, S.; ELVERS, H. D.; KRÄMER, U.; SCHINS, R. P.; DIEZ, U.; BORTE, M.; HEINRICH, J.; SCHÄFER, T.; HERBARTH, O.; LEHMANN, I. LISApplus study group. Relation between stressful life events, neuropeptides and cytokines: results from the LISA birth cohort study. **Pediatr. Allergy Immunol.**, v. 19, n. 8, p. 722-729, 2008.
- HO, Y. J.; PAWLAK, C. R.; GUO, L.; SCHWARTING, R. K. Acute and long-term consequences of single MDMA administration in relation to individual anxiety levels in the rat. **Behav. Brain Res.**, v. 149, n. 2, p. 135-144, 2004.

- HOLGATE, S. T. Cytokine and anti-cytokine therapy for the treatment of asthma and allergic disease. **Cytokine**, v. 28, n. 4-5, p. 152-157, 2004.
- HOUSE, R. V.; THOMAS, P. T.; BHARGAVA, H. N. Selective modulation of immune function resulting from in vitro exposure to methylenedioxymethamphetamine (ecstasy). **Toxicology**, v. 96, n. 1, p. 59-69, 1995.
- HROMETZ, S. L.; BROWN, A. W.; NICHOLS, D.E .; SPRAGUE, J. E. 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy)-mediated production of hydrogen peroxide in an in vitro model: the role of dopamine, the serotonin-reuptake transporter, and monoamine oxidase-B. **Neurosci. Lett.**, v. 367, n. 1, p. 56-59, 2004.
- HUBNER, C. B.; BIRD, M.; RASSNICK, S.; KORNETSKY, C. The threshold lowering effects of MDMA (ecstasy) on brain-stimulation reward. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 95, n. 1, p. 49-51, 1988.
- HUETHER, G.; ZHOU, D.; RÜTHER, E. Causes and consequences of the loss of serotonergic presynapses elicited by the consumption of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") and its congeners. **J. Neural. Transm.**, v. 104, n. 8-9, p. 771-794, 1997.
- HUETHER, G.; ZHOU, D.; RÜTHER, E. Long-term modulation of presynaptic 5-HT-output: experimentally induced changes in cortical 5-HT-transporter density, tryptophan hydroxylase content and 5-HT innervation density. **J. Neural. Transm.**, v. 104, n. 10, p. 993-1004, 1997b.
- IZAKOVIC, V.; LUKAC, J. Tetrasomy X (karyotype 48, XXXX) in a 2 and one-half year old girl. **Cesk. Pediatr.**, v. 28, n. 2, p. 77 – 79, 1973.
- IIMORI, K., TANAKA, M., KOHNO, Y.; IDA, Y.; NAKAGAWA, R.; HOAKI, Y.; TSUDA, A.; NAGASAKI, N. Psychological stress enhances noradrenaline turnover in specif brain regions in rats. **Pharmacology , Biochemistry and Behavior**, v. 16, 637-640, 1982.
- IZCO, M.; MARCHANT, I.; ESCOBEDO, I.; PERAILE, I.; DELGADO, M.; HIGUERA-MATAS, A.; OLIAS, O.; AMBROSIO, E.; O'SHEA, E.; COLADO, M. I. Mice with decreased cerebral dopamine function following a neurotoxic dose of MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine, "Ecstasy") exhibit increased ethanol consumption and preference. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 322, n. 3, p. 1003-1012, 2007.
- JACKSON, D. M.; JOHANSSON, C.; LINDGREN, L. M.; BENGTSSON, A. Dopamine receptor antagonists block amphetamine and phencyclidine-induced motor stimulation in rats. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 48, n.2, p. 465-71, 1994.
- JACKSON, M.E.; MOGHADDAM, B. Stimulus-specific plasticity of prefrontal cortex dopamine neurotransmission. **J Neurochem.**, v. 88, n. 6, p.1327-34, 2004.
- JAEHNE, E. J.; SALEM, A.; IRVINE, R. J. The effect of long-term repeated exposure to 3,4-methylenedioxymethamphetamine on cardiovascular and thermoregulatory changes. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 201, n. 2, p. 161-170, 2008.
- JAEHNE, E. J.; SALEM, A.; IRVINE, R. J. The effect of long-term repeated exposure to 3,4-methylenedioxymethamphetamine on cardiovascular and thermoregulatory changes. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 201, n. 2, p. 161-170, 2008.

- JÄHKEL, M.; RILKE, O.; KOCH, R.; OEHLER, J. Open field locomotion and neurotransmission in mice evaluated by principal component factor analysis – effect of housing condition, individual activity disposition and psychotropic drugs. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v. 24, n. 1, p. 61-83; 2000.
- JANKOVIC, B. D.; 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, n. 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, v. 10, p. 1393-1395, 1979.
- JOHANSEN, P. O.; KREBS, T. S. How could MDMA (ecstasy) help anxiety disorders? A neurobiological rationale. *J. Psychopharmacol.*, v. 23, n. 4, p. 389-391, 2009.
- JONES, D. C.; DUVAUCHELLE, C.; IKEGAMI, A.; OLSEN, C. M.; LAU, S. S.; DE LA TORRE, R.; MONKS, T. J. Serotonergic neurotoxic metabolites of ecstasy identified in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 313, n. 1, p. 422-431, 2005.
- KELLY, M.; HWANG, J. M.; KUBES, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 120, n. 1, p. 3-10, 2007.
- KELLER, S. E.; SCHLEIFER, S. J.; LIOTTA, A. S.; BOND, R. N.; FARHOODY, N.; STEIN, M. Stress-induced alterations of immunity in hipophysectomized rats. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, v.85, p. 9297-9301, 1988.
- KELLEY, K. W.; BLUTHÉ, R. M.; DANTZER, R.; ZHOU, J. H.; SHEN, W. H.; JOHNSON R. W.; BROUSSARD, S. R. Cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav. Immun.*, v. 1 (Suppl S112-S118), 2003.
- KILLCROSS, S.; ROBBINS, T. W.; EVERITT, B. J. Different types of fear-conditioned behaviour mediated by separate nuclei within amygdala. *Nature*, v. 388, n. 6640, p. 377-380, 1997.
- KINOSHITA, D.; COHN, D. W.; COSTA-PINTO, F. A.; DE SÁ-ROCHA, L. C. Behavioral effects of LPS in adult, middle-aged and aged mice. *Physiol Behav.*, v. 96, n.2, p.328-332, 2009.
- KOBAYASHI, M.; NASUHARA, Y.; KAMACHI, A.; TANINO, Y.; BETSUYAKU, T.; YAMAGUCHI, E.; NISHIHARA, J.; NISHIMURA, M. Role of macrophage migration inhibitory factor in ovalbumin-induced airway inflammation in rats. *Eur. Respir. J.* v. 27, n. 4, p. 726-734, 2006.
- KOCH, S.; GALLOWAY, M. P. MDMA induced dopamine release in vivo: role of endogenous serotonin. *J. Neural. Transm.*, v. 104, n. 2-3, p. 135-146, 1997.
- KUBERA, M.; FILIP, M.; BASTA-KAIM, A.; NOWAK, E.; BUDZISZEWSKA, B.; TETICH, M.; HOLAN, V.; KORZENIAK, B.; PRZEGALIŃSKI, E. The effect of amphetamine sensitization on mouse immunoreactivity. *J. Physiol. Pharmacol.*, v. 53, n. 2, p. 233-242, 2002.
- KUMAR, S.; ARYA, P.; MUKHERJEE, C.; SINGH, B. K.; SINGH N, PARMAR VS, PRASAD AK, GHOSH B. Novel aromatic ester from Piper longum and its analogues inhibit expression of cell adhesion molecules on endothelial cells. *Biochemistry*. v. 6, n. 44-48, p. 15944-15952, 2005.
- KUT, J.L.; YOUNG, M. R.; CRAYTON, J. W.; WRIGHT, M. A.; YOUNG, M. E. Regulation of murine T-lymphocyte function by spleen cell-derived and exogenous serotonin. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, v. 14, n. 4, p. 783-796, 1992.

Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease.

LACOSTE, J. Y.; BOUSQUET, J.; CHANEZ, P.; VAN VYVE, T.; SIMONY-LAFONTAINE, J.; LEQUEU, N.; VIC, P.; ENANDER, I.; GODARD, P.; MICHEL, F. B. **J. Allergy Clin. Immunol.** v. 92, n. 4, p. 537-548, 1993.

LAMAS, A. M.; LEON, O. G.; SCHLEIMER, R. P. Glucocorticoids inhibit eosinophil responses to granulocyte macrophage colony-stimulating factor. **J. Immunol.**, v.147, n.3, p. 254, 1994.

LAMPINEN, M.; CARLSON, M.; HÅKANSSON, L. D.; VENGE, P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. **Allergy**, v. 59, n. 8, p. 793-805, 2004.

LARCHÉ, M.; ROBINSON, D. S.; KAY, A. B. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 111, n. 3, p. 450-463, 2003.

LAZZARINI, R.; MAIORKA, P. C.; LIU, J.; PAPADOPOULOS, V.; PALERMO-NETO, J. Diazepam effects on carrageenan-induced inflammatory paw edema in rats: role of nitric oxide. **Life Sci.**, v. 78, n.26, p. 3027-3034, 2006.

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, n. 21, p.2361-2368, 2003.

LAZZARINI, R.; SAKAI, M.; COSTA-PINTO, F. A.; PALERMO-NETO, J. Diazepam decreases leukocyte-endothelium interactions in situ. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, v. 0, n. 0, p. 1-8, 2010.

LIECHTI, M. E.; VOLLENWEIDER, F. X. Which neuroreceptors mediate the subjective effects of MDMA in humans? A summary of mechanistic studies. **Hum. Psychopharmacol**, v. 16, n. 8, p. 589-598, 2001.

LIECHTI, M. E.; VOLLENWEIDER, F. X. Which neuroreceptors mediate the subjective effects of MDMA in humans? A summary of mechanistic studies. **Hum. Psychopharmacol.**, v. 16, n. 8, p. 589-598, 2001.

LIGEIRO DE OLIVEIRA, A.P.; LAZZARINI, R.; CAVRIANI, G.; QUINTEIRO-FILHO, M. W.; TAVARES DE LIMA, W.; PALERMO-NETO, J. Effects of single or repeated amphetamine treatment and withdrawal on lung allergic inflammation in rats. **Int. Immunopharmacol.**, v. 8, n. 9, p. 1164-1171, 2008.

LIGEIRO-OLIVEIRA, A. P.; FIALHO DE ARAÚJO, A. M.; LAZZARINI, R.; SILVA, Z. L.; DE NUCCI, G.; MUSCARÁ, M. N.; TAVARES DE LIMA, W.; PALERMO-NETO, J. Effects of amphetamine on immune-mediated lung inflammatory response in rats. **Neuroimmunomodulation.**, v. 11, n. 3, p. 181-190, 2004.

LIN, H. Q.; BURDEN, P. M.; CHRISTIE, M. J.; JOHNSTON, G. A. The anxiogenic-like and anxiolytic-like effects of MDMA on mice in the elevated plus-maze: a comparison with amphetamine. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 62, n. 3, p. 403-408, 1999.

LINO DOS SANTOS FRANCO, A.; DAMAZO, A. S.; BERALDO DE SOUZA, H. R.; DOMINGOS, H. V.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; OLIANI, S. M; COSTA, S. K.; TAVARES DE LIMA, W. Pulmonary neutrophil recruitment and bronchial reactivity in formaldehyde-exposed rats are

- modulated by mast cells and differentially by neuropeptides and nitric oxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* v. 214, n. 1, p. 35-42, 2006.
- LINDSTEDT, K. A.; KOVANEN, P. T. Isolation of mast cell granules. *Curr. Protoc. Cell Biol.*, Chapter 3:Unit 3. 16, 2006.
- LISTER, R. G. Ethologically – based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol. Therap.*, v. 46, n. 1, p. 321 - 340, 1990.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl.)*, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.
- 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, n. 9, p. 169-172, 1992.
- LUPARELLO, T. J.; STEIN, M.; PARK, C. D. Effect of hypothalamic lesions on rat anaphylaxis. *Am. J. Physiol.*, v. 207, p. 911 – 914, 1964.
- MCCANN, U. D.; RICAURTE, G. A. Strategies for detecting subclinical monoamine depletions in humans. *NIDA Res Monogr.*, v. 136, p. 53-60, 1993.
- MCEVER, R. P.; MOORE, K. L.; CUMMINGS, R. D. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J. Biol. Chem.*, v. 270, n. 19, p. 11025-11028, 1995.
- MADDEN, K. S.; FELTEN, D. L. Experimental basis for neural-immune interactions. *Physiol. Rev.*, v. 75, p. 77 - 106, 1995.
- MADDEN, K. S.; FELTEN, S. Y.; FELTEN, D. L.; BELLINGER, D. L. Sympathetic nervous system--immune system interactions in young and old Fischer 344 rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 29, n. 771, p. 523-534, 1995.
- MADDEN, K. S. Catecholamines, sympathetic innervation, and immunity. *Brain Behav. Immun.*, v.17, Suppl 1:S, p.5-10, 2003.
- MADDEN, K. B.; YEUNG, K. A.; ZHAO, A.; GAUSE, W. C.; FINKELMAN, F. D.; KATONA, I. M.; URBAN, J. F. JR.; SHEA-DONOHUE, T. Enteric nematodes induce stereotypic STAT6-dependent alterations in intestinal epithelial cell function. *J. Immunol.*, v. 172, n. 9, p. 5616-21, 2004.
- MAESTRELLI, P. Occupational asthma: the role of airways inflammation and remodelling in persistent respiratory symptoms and bronchial hyper-responsiveness. *Med. Lav.*, v. 95, n. 4, p. 275-81, 2004.
- MALDONADO, E.; NAVARRO, J. F. Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on anxiety in mice tested in the light-dark box. *Prog. Neurosychopharmacol. Biol. Psychiatry.*, v. 24, n.1, p. 463-472, 2000.
- MARONA-LEWICKA, D.; RHEE, G. S.; SPRAGUE, J. E.; NICHOLS, D. E. Reinforcing effects of certain serotonin-releasing amphetamine derivatives. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 53, n. 1, p. 99-105, 1996.
- MARSHALL, G. D. JR.; AGARWAL, S. K. Stress, immune regulation, and immunity: applications for asthma. *Allergy Asthma Proc.*, v. 21, n. 4, p. 241-246, 2000.
- MASOLI, M.; FABIAN, D.; HOLT, S.; BEASLEY, R. Global Initiative for Asthma (GINA) Program. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy.*, v. 59, n. 5, p. 469-478, 2004.

- MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J. Diazepam effects of peritoneal macrophage activity and corticosterone serum levels in Balb/C mice. **Life Sci**, v. 65, n. 20, p. 2157-2165, 1999.
- MASSOCO, C.; PALERMO-NETO, J. Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 95, n. 1-2, p. 11-19, 2003.
- MATUSZEWICH, L.; FILON, M. E.; FINN, D. A.; YAMAMOTO, B. K. Altered forebrain neurotransmitter responses to immobilization stress following 3,4-methylenedioxymethamphetamine. **Neuroscience**, v. 110, n. 1, p. 41-48, 2002.
- MARTIN, T. R.; FREVERT, C. W. Innate immunity in the lungs. **Proc. Am. Thorac. Soc.**, v. 2, n. 5, p. 403-411, 2005.
- MAURER, H. H.; BICKEBOELLER-FRIEDRICH, J.; KRAEMER, T.; PETERS, F. T. Toxicokinetics and analytical toxicology of amphetamine-derived designer drugs ('Ecstasy'). **Toxicol. Lett.**, v. 112, n. 113, p. 133-142, 2000.
- MAYR, S. I.; ZUBERI, R. I.; LIU, F. T. Role of immunoglobulin E and mast cells in murine models of asthma. **Braz. J. Méd. Biol. Res.**, v. 36, n. 7, p. 821-827, 2003.
- MCCLAIN, H. J. R.; SAPIENZA, F. The role of abuse liability testing in drug control procedures. **NIDA Res. Monogr.**, v. 92, n. 1, p. 21-42, 1989.
- MCEWEN, B. S.; BIRON, C. A.; BRUNSON, K. W.; BULLOCK, K.; CHAMBERS, W. H.; DHABHAR, F. S.; GOLDFARB, R. H.; KITSON, R. P.; MILLER, A. H.; SPENCER, R. L.; WEISS, J. M. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural and immune interactions. **Brain Res. Rev.**, v. 23, n. 1-2, p. 79 – 133., 1997.
- MCGREGOR, I. S.; CLEMENS, K. J.; VAN DER PLASSE, G.; LI, K. M.; HUNT, G. E.; CHEN, F.; LAWRENCE, A. J. Increased anxiety 3 months after brief exposure to MDMA ("Ecstasy") in rats: association with altered 5-HT transporter and receptor density. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 8, p. 1472-1484, 2003.
- MCGREGOR, I. S.; GURTMAN, C. G.; MORLEY, K. C.; CLEMENS, K. J.; BLOKLAND, A.; LI, K. M.; CORNISH, J. L.; HUNT, G. E. Increased anxiety and "depressive" symptoms months after MDMA ("ecstasy") in rats: drug-induced hyperthermia does not predict long-term outcomes. **Psychopharmacology (Berl.)**, v. 168, n. 4, p. 465-474, 2003.
- MCKENNA, D. J.; PEROUTKA, S. J. Neurochemistry and neurotoxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). **J. Neurochem.**, v. 54, n. 1, p. 14-22, 1990.
- METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast cells. **Physiol. Rev.**, v. 77, n. 4, p. 1033-1079, 1997.
- MIADONNA, A.; TEDESCHI, A.; BRASCA, C.; FOLCO, G.; SALA, A.; MURPHY, R. C. Mediator release after endobronchial antigen challenge in patients with respiratory allergy. **J Allergy. Clin. Immunol.**, v. 85, n. 5, p. 906-913, 1990.
- MOQBEL, R.; LACY, P. New concepts in effector functions of eosinophil cytokines. **Clin. Exp. Allergy**, v. 30, n. 12, p. 1667-1671, 2000.

- MONTSEIRIN, J.; CHACON, P.; VEGA, A.; SANCHEZ-MONTSEIRIN, H.; ASTURIAS, J. A.; MARTINEZ, A.; GUARDIA, P.; PEREZ-CANO, R.; CONDE, J. L-selectin expression on neutrophils from allergic patients. **Clin. Exp. Allergy**, v.35, n. 9, p.1204-1213, 2005.
- MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J. Comp. Physiol. Psychol.** v. 48, n. 4, p. 254 - 260, 1995.
- MONTSEIRÍN, J.; CHACÓN, P.; VEJA, A.; SÁNCHEZ-MONTSEIRÍN, H.; ASTURIAS, J. A.; MARTÍNEZ, A.; GUARDIA, P.; PÉREZ-CANO, R.; CONDE, J. L-selectin expression on neutrophils from allergic patients. **Clin. Exp. Allergy**, v. 35, n.9, p. 1204-1213, 2005.
- MORGULIS, M. S.; STANKEVICIUS, D.; SA-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a sick cage mate: consequences on behavior and on ehrlich tumor growth. **Neuroimmunomodulation**, v. 11, n. 1, p. 49 – 57, 2004.
- MORLEY, K. C.; ARNOLD, J. C.; MCGREGOR, I. S. Serotonin (1A) receptor involvement in acute 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) facilitation of social interaction in the rat. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 29, n. 5, p. 648-657, 2005.
- MORLEY, K. C.; GALLATE, J. E.; HUNT, G. E.; MALLET, P. E.; MCGREGOR, I. S. Increased anxiety and impaired memory in rats 3 months after administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). **Eur. J. Pharmacol.**, v. 433, n. 1, p. 91-99, 2001.
- MORLEY, K. C.; MCGREGOR, I. S. (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'Ecstasy') increases social interaction in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 408, n. 1, p. 41-49, 2000.
- MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 1, p. 145-173, 1989.
- MÖSSNER, R.; LESCH, K. P. Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. **Brain Behav Immun.**, v. 12, n. 4, p. 249-271, 1998.
- MUCIDA, D. S.; DE CASTRO KELLER, A.; FERNVIK, E. C.; RUSSO, M. Unconventional strategies for the suppression of allergic asthma. **Curr. Drug. Targets Inflamm. Allergy**, v. 2, n. 2, p. 187-195, 2003.
- NADEL, J. A.; BUSSE, W. W. Asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 157, n. 4 pt 2, p. (S130-S138), 1998.
- 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, n. 2, p. 121-132, 1991.
- NASH, J. F.; MELTZER, H. Y.; GUDELSKY, G. A. Antagonism of serotonin receptor mediated neuroendocrine and temperature responses by atypical neuroleptics in the rat. **Eur J Pharmacol.**, v. 151, n. 3, p. 463-9, 1988.
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. **NIH publication**, v. 97-4051, p. 1-153, 1997.
- NAVARRO, J. F.; MALDONADO, E. Acute and subchronic effects of MDMA ("ecstasy") on anxiety in male mice tested in the elevated plus-maze. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 26, n. 6, p. 1151-1154, 2002.

- NAVARRO, J. F.; RIVERA, A.; MALDONADO, E.; CAVAS, M.; DE LA CALLE, A. Anxiogenic-like activity of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine ("Ecstasy") in the social interaction test is accompanied by an increase of c-fos expression in mice amygdala. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 28, n. 2, p. 249-254, 2004.
- NICHOLS, D. E. Studies of the relationship between molecular structure and hallucinogenic activity. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 24, n. 2, p. 335-340, 1986.
- NICHOLS, D. E.; SHULGIN, A. T. Sulfur analogs of psychotomimetic amines. **J. Pharm. Sci.**, v. 65, n. 10, p. 1554-1556, 1976.
- 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. **Int. J. Neurosci.**, v. 68, n. 3-4, p. 283 - 287, 1993.
- O'DONOVAN, A.; HUGHES, B. M.; SLAVICH, G. M.; LYNCH, L.; CRONIN, M. T.; O'FARRELLY, C.; MALONE, K. M. Clinical anxiety, cortisol and interleukin-6: evidence for specificity in emotion-biology relationships. **Brain Behav. Immun.**, 2010.
- OJIRI, Y.; NOGUCHI, K.; CHIBANA, T.; SAKANASHI, M. Effects of adrenergic stimulants on the splenic diameter, haemoglobin content and haematocrit in anaesthetized dogs: determination of the adrenoceptor subtype responsible for changes in the splenic diameter. **Acta Physiol. Scand.**, v. 149, n. 1, p. 31-39, 1993.
- O'NEILL, M. F.; SHAW, G. Comparison of dopamine receptor antagonists on hyperlocomotion induced by cocaine, amphetamine, MK-801 and the dopamine D1 agonist C-APB in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 145, n. 3, p. 237-50, 1999.
- OOTSUKA, Y.; NALIVAICO, E.; BLESSING, W. W. Spinal 5-HT_{2A} receptors regulate cutaneous sympathetic vasomotor outflow in rabbits and rats; relevance for cutaneous vasoconstriction elicited by MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine, "Ecstasy") and its reversal by clozapine. **Brain Res.**, v. 1014, n. 1-2, p. 34-44, 2004.
- O'SHEA, E.; ESCOBEDO, I.; ORIO, L.; SANCHEZ, V.; NAVARRO, M.; GREEN, A.R.; COLADO, M. I. Elevation of ambient room temperature has differential effects on MDMA-induced 5-HT and dopamine release in striatum and nucleus accumbens of rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 7, p. 1312-1323, 2005.
- PACIFICI, R.; ZUCCARO, P.; FARRE, M.; PICHINI, S.; DI CARLO, S.; ROSET, P. N.; ORTUNO, J.; SEGURA, J.; DE LA TORRE, R. Immunomodulating properties of MDMA alone and in combination with alcohol: a pilot study. **Life Sci.**, v. 65, n. 26, p. PL309-16. 1999.
- PACIFICI, R.; ZUCCARO, P.; FARRÉ, M.; PICHINI, S.; DI CARLO, S.; ROSET, P.N.; PALMI, I.; ORTUÑO, J.; MENOYO, E.; SEGURA, J.; DE LA TORRE, R.; Cell-mediated immune response in MDMA users after repeated dose administration: studies in controlled versus noncontrolled settings. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 965, n.2 p. 421-433, 2002.
- PAGE, C. P. An explanation of the asthma paradox. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 147, n. 6 pt 2, p. (S29-S32), 1993.
- PALENICEK, T.; VOTAVA, M.; BUBENIKOVA, V.; HORACEK, J. Increased sensitivity to the acute effects of MDMA ("ecstasy") in female rats. **Physiol. Behav.**, v. 86, n. 4, p. 546-553, 2005.

- PALERMO-NETO, J.; FONSECA, E.S.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; CORREIA, C. S.; SAKAI, M. Effects of individual housing on behavior and resistance to Ehrlich tumor growth in mice. **Physiol. Behav.**, v. 95, n. 3, p. 435-440, 2008.
- PALERMO-NETO, J; MASSOCO, C.; SOUZA, W. R. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain. Behav. Immun.**, v. 17, n. 1, p. 43 - 54, 2003.
- PARÉ, W. P.; GLAVIN, G. B. Animal Models of Stress in Pharmacology. In: **Methods in behavioral pharmacology**, edited by: VAN HAAREN, F. Elsevier Science Publishers, 1993. p. 413 - 441.
- PARROTT, A. C. The psychotherapeutic potential of MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine): an evidence-based review. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 191, n. 2, p. 181-193, 2007.
- PAUWELS, R.A.; KIPS, J.C.; PELEMAN, R.A.; VAN DER STRAETEN, M.E. The effect of endotoxin inhalation on airway responsiveness and cellular influx in rats. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 141, n. 3, p. 540 - 545, 1990.
- PAWLAK, C. R.; SCHWARTING, R. K. Repeated nicotine treatment in rats with high versus low rearing activity: analyses of behavioural sensitisation and place preference. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 178, n. 4, p. 440-450, 2005.
- PEACHELL, P. Targeting the mast cell in asthma. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 5, n.3, p. 251-256, 2005.
- PELLOW, S.; CHOPPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Meth.**, v. 14, n. 3, p. 149 -167, 1985.
- PENTNEY, A. R. An exploration of the history and controversies surrounding MDMA and MDA. **J. Psychoactive Drugs**, v. 33, n. 3, p. 213-221, 2001.
- PICAZO, O.; LOPEZ-RUBALCAVA, C.; FERNANDEZ-GUASTI, A. Anxiolytic effect of the 5-HT_{1A} compounds 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin and ipsapirone in the social interaction paradigm: evidence of a presynaptic action. **Brain Res Bull.**, v. 37, n. 2, p.169-75, 1995.
- PLATTS-MILLS, T.; LEUNG, D.Y.; SCHATZ, M. The role of allergens in asthma. **Am. Fam. Physician.**, v. 76, n. 5, p. 675-680, 2007.
- PORTELA, C. DE P.; TIBÉRIO, I. D. E. F.; LEICK-MALDONADO, E. A.; MARTINS, M. A.; PALERMO-NETO, J. Effects of diazepam and stress on lung inflammatory response in OVA-sensitized rats. **Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.**, v. 282, n. 6, p. L1289-L1295, 2002.
- PORTELA, C. P.; LEICK-MALDONADO, E. A.; KASAHARA, D. I.; PRADO, C. M.; CALVO-TIBÉRIO, I. F.; MARTINS, M. A.; PALERMO-NETO, J. Effects of stress and neuropeptides on airway responses in ovalbumin-sensitized rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 14, n. 2, p. 105-111, 2007.
- PROUST, B.; NAHORI, M. A.; RUFFIE, C.; LEFORT, J.; VARGAFTIG, B. B. Persistence of bronchopulmonary hyper-reactivity and eosinophilic lung inflammation after anti-IL-5 or -IL-13 treatment in allergic BALB/c and IL-4R α knockout mice. **Clin. Exp. Allergy**, v. 33, n. 1, p. 119-131, 2003.
- PUJOLS, L.; MULLOL, J.; TORREGO, A.; PICADO, C.; Glucocorticoid receptors in human airways. **Allergy**, v.59, n. 10, p. 1042-1052, 2004.

- QUEIROZ, S. J.; TORELLO, C. O.; PALERMO-NETO, J.; VALADARES, M. C.; QUEIROZ, M. L. Hematopoietic response of rats exposed to the impact of an acute psychophysiological stressor on responsiveness to an in vivo challenge with *Listeria monocytogenes*: modulation by *Chlorella vulgaris* prophylactic treatment. **Brain Behav. Immun.**, v. 22 n. 7, p. 1056-1065, 2008.
- QUINTEIRO-FILHO, W. M.; RIGHI, D. A.; PALERMO-NETO, J. Effect of cyhalothrin on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. **Braz. J. Méd. Biol. Res.**, v. 42, n. 10, p. 912-917, 2009.
- RATTRAY, M. Ecstasy: towards an understanding of the biochemical basis of the actions of MDMA. **Essays Biochem.**, v.26, n. 1, p. 77-87, 1991.
- RENEMAN, L.; LAVALAYE, J.; SCHMAND, B.; DE WOLFF, F. A.; VAN DEN BRINK, W.; DEN HEETEN, G. J.; BOOIJ, J. Cortical serotonin transporter density and verbal memory in individuals who stopped using 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "ecstasy"): preliminary findings. **Arch Gen Psychiatry**, v. 58, n.10, p. 901-6, 2001.
- RIBEIRO, A.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; PINHEIRO, M. L.; SAKAI, M.; COSTA-PINTO, F. A.; PALERMO-NETO, J. Anandamide prior to sensitization increases cell-mediated immunity in mice. **Int. Immunopharmacol.**, v. 10, n.1, p. 431-439, 2010.
- RIETVELD, S.; EVERAERD, W.; CREER, T. L. Stress-induced asthma: a review of research and potential mechanisms. **Clin. Exp. Allergy**, v. 30, n. 8, p. 1058-1066, 2000.
- RIVERA, J.; GILFILLAN, A. M. Molecular regulation of mast cell activation. *J. Allergy. Clin. Immunol.* v. 117, n. 6, p. 1214-1225, 2006.
- RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety defense and the elevated plus-maze. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 2, n.6, p. 801 - 810, 1997.
- RIGHI, D.A.; PALERMO-NETO, J. Effects of type II pyrethroid-cyhalothrin in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 191, n.2, p. 167-176, 2003.
- ROCHE, W. R.; BEASLEY, R.; WILLIAMS, J. H.; HOLGATE, S. T. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. **Lancet.**, v. 1, n. 8637, p. 520-524, 1989.
- ROGERS, G.; ELSTON, J.; GARSIDE, R.; ROOME, C.; TAYLOR, R.; YOUNGER, P.; ZAWADA, A.; SOMERVILLE, M. The harmful health effects of recreational ecstasy: a systematic review of observational evidence. **Health Technol. Assess.**, v. 13, n. 1-315, p. 34-42, 2009.
- ROGGERO, E.; PÉREZ, A. R.; BOTTASSO, O. A.; BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Neuroendocrine-immunology of experimental Chagas' disease. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1153, p. 264-271, 2009.
- ROMANO, S. J. Selectin antagonists : therapeutic potential in asthma and copd. **Treat. Respir. med.**, v. 4, N. 2, p. 85-94, 2005.
- SAJDYK, T. J.; SHEKHAR, A. Sodium lactate elicits anxiety in rats after repeated GABA receptor blockade in the basolateral amygdala. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 394, n. 2-3, p. 265-273, 2000.
- ROTH, B. L.; BERRY, S. A.; KROEZE, W. K.; WILLINS, D. L.; KRISTIANSEN, K. Serotonin 5-HT_{2A} receptors: molecular biology and mechanisms of regulation. **Crit. Ver. Neurobiol.**, v. 12, n. 4, p. 319-338, 1998.
- SAKAI, M.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; PINHEIRO, M. L.; RIBEIRO, A.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; RONE, M. B.; MARTINEZ-ARGUELLES, D. B.; DAGLI, M. L.; PAPADOPOULOS, V.;

- PALERMO-NETO, J. Translocator protein (18 kDa) mediates the pro-growth effects of diazepam on Ehrlich tumor cells in vivo. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 626, n. 2-3, p. 131-138, 2010.
- SAKAI, M.; FONSECA, E. S.; DAGLI, M. L.; PALERMO-NETO, J. Diazepam effects on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. **Life Sci.**, v. 78, n. 16, p. 1777-1783, 2006.
- SALICRÚ, A. N.; SAMS, C. F.; MARSHALL, G. D. Cooperative effects of corticosteroids and catecholamines upon immune deviation of the type-1/type-2 cytokine balance in favor of type-2 expression in human peripheral blood mononuclear cells. **Brain Behav. Immun.**, v. 21, n. 7, p. 913-920, 2007.
- SALICRÚ, A. N.; SAMS, C. F.; MARSHALL, G. D. Cooperative effects of corticosteroids and catecholamines upon immune deviation of the type-1/type-2 cytokine balance in favor of type-2 expression in human peripheral blood mononuclear cells. **Brain Behav. Immun.**, v. 21, n. 7, p. 913-920, 2007.
- SANDERS, V. M. Interdisciplinary research: noradrenergic regulation of adaptive immunity. **Brain Behav. Immun.**, v. 20, n. 1, p. 1-8, 2006.
- SAPOLSKY, R.; RIVIER, C.; YAMAMOTO, G.; PLOTSKY, P.; VALE, W. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. **Science.**, v. 1, n. 4, p. 522-524, 1987.
- SA-ROCHA, V. M.; SA-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Variations in behavior, innate immunity and host resistance to B16F10 melanoma growth in mice that present social stable hierarchical ranks. **Physiol. Behav.**, v. 88, n. 1-2, p. 108-115, 2006.
- SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents 1936. **J. Neuropsychiatry. Clin. Neurosci.**, v. 10, n. 2, p. 230-231, 1998.
- SHANKARAN, M.; YAMAMOTO, B. K.; GUDELSKY, G. A. Ascorbic acid prevents 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced hydroxyl radical formation and the behavioral and neurochemical consequences of the depletion of brain 5-HT. **Synapse.**, v. 40, n. 1, p. 55-64, 2001.
- SIBBALD, B.; ANDERSON, H. R.; MCGUIGAN, S. Asthma and employment in young adults. **Thorax.**, v. 47, n. 1, p. 19-24, 1992.
- SILVA, F. R.; LAZZARINI, R.; DE SA-ROCHA, L. C.; MORGULIS, M. S.; MASSOCO, C.; PALERMO-NETO, J. Effects of acute and long-term diazepam administrations on neutrophil activity: a flow cytometric study. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 478, n. 2-3, p. 97-104, 2003.
- SIMPSON, J.; L.; SCOTT, R.; BOYLE, M. J.; GIBSON, P. G. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. **Respirology.**, v. 11, n. 1, p. 54-61, 2006.
- SIRACUSA, A.; MARABINI, A.; PACE, M. L.; TACCONI, C.; FOLLETTI, I.; BUSSETTI, A.; MAESTRELLI, P. Occupational asthma: the role of airways inflammation and remodelling in persistent respiratory symptoms and bronchial hyper-responsiveness. **Med. Lav.**, v. 95, n. 4, p. 275-281, 2004.
- SOLÉ, D.; YAMADA, E.; VANA, A. T.; WERNECK, G.; SOLANO DE FREITAS, L.; SOLOGUREN, M. J.; BRITO, M.; ROSÁRIO FILHO, N. A.; STEIN, R. T.; MALLOL, J. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): prevalence of asthma and asthma-related symptoms among Brazilian schoolchildren. **J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.**, v. 11, n. 2, p. 123-128, 2001.
- SPADARO, F.; DUNN, A. J. Intracerebroventricular administration of interleukin-1 to mice alters investigation of stimuli in a novel environment. **Brain Behav. Immun.**, v. 4, n. 4, p. 308-322, 1990.

- SPAHN, J. D.; COVAR, R. Clinical assessment of asthma progression in children and adults. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 121, n. 3, p. 548-557, 2008.
- STANKEVICIUS, D.; RODRIGUES-COSTA, E. C.; CAMILO FLÓRIO, J.; PALERMO-NETO, J. Neuroendocrine, behavioral and macrophage activity changes induced by picrotoxin effects in mice. **Neuropharmacology.**, v. 54, n. 2, p. 300-308, 2008.
- STEPHENSON, C. P.; HUNT, G. E.; TOPPLE, A. N.; MCGREGOR, I. S. The distribution of 3,4-methylenedioxymethamphetamine "Ecstasy"-induced c-fos expression in rat brain. **Neuroscience.**, v. 92, n. 3, p. 1011-1023, 1999.
- STIRLING, R. G.; CHUNG, K. F. Severe asthma: definition and mechanisms. **Allergy.**, v. 56, n. 9, p. 825-840, 2001.
- STITES, D. P.; TERR, A. L. In: Basic human immunology. **Ed. Prentice Hall**, 1991. p.86.
- STONE, D. M.; MERCHANT, K. M.; HANSON, G. R.; GIBB, J. W. Immediate and long-term effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on serotonin pathways in brain of rat. **Neuropharmacology.**, v. 26, n. 12, p. 1677-1683, 1987.
- STONE, D. M.; STAHL, D. C.; HANSON, G. R.; GIBB, J. W. The effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxymphetamine (MDA) on monoaminergic systems in the rat brain. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 128, n. 1-2, p. 41-48, 1986.
- SUMNALL, H. R.; O'SHEA, E.; MARSDEN, C. A.; COLE, J. C. The effects of MDMA pretreatment on the behavioural effects of other drugs of abuse in the rat elevated plus-maze test. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 77, n. 4, p. 805-814, 2004.
- SWERDLOW, N.R.; KOOB, G.F.; CADOR, M.; LORANG, M.; HAUGER, R.L. Pituitary-adrenal axis responses to acute amphetamine in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.45, p.629-637, 1993.
- Symposium on host-guest molecular interactions: from chemistry to biology. **Ciba Foundation Symp.**, London v. 3-5, 158, p. 1-278, 1991.
- TANAKA, M.; KOHNO, Y.; NAKAGAWA, R.; IDA, Y.; TAKEDA, S.; NAGASAKI, N. Time-related differences in noradrenaline turnover in rat brain regions by stress. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**, v.16, p. 315-319, 1982.
- TANGYE, S. G.; FERGUSON, A.; AVERY, D. T.; MA, C. S.; HODGKIN, P. D. Isotype switching by human B cells is division-associated and regulated by cytokines. **J. Immunol.**, v. 169, n. 8, p. 4298-4306, 2002.
- TAVARES DE LIMA, W.; SIROIS, P.; JANCAR, S. Immune-complex alveolitis in the rat: evidence for platelet activation factor and leukotrienes as mediators of the vascular lesions. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 213, n. 1, p. 63-70, 1992.
- The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC), **Eur. Respir. J.**, v. 12 p. 315-335, 1998.
- THOMAS, L. H.; WAENER, J. A. The eosinophil and its role in asthma. **Pharmacol.**, v. 27, n. 4, p. 593-597, 1996.

- THOMPSON, V. B.; HEIMAN, J.; CHAMBERS, J. B.; BENOIT, S. C.; BUESING, W. R.; NORMAN, M. K.; NORMAN, A. B.; LIPTON, J. W. Long-term behavioral consequences of prenatal MDMA exposure. **Physiol. Behav.**, v. 96, n. 4-5, p. 593-601, 2009.
- TILLIE-LEBLOND, I.; MONTANI, D.; CRESTANI, B.; DE BLIC, J.; HUMBERT, M.; TUNON-DE-LARA, M.; MAGNAN, A.; ROCHE, N.; OSTINELLI, J.; CHANEZ, P. Relation between inflammation and symptoms in asthma. **Allergy**, v. 64, n. 3, p. 354-367, 2009.
- TRIFILIEFF, A.; EL-HASHIM, A.; BERTRAND, C. Time course of inflammatory and remodeling events in a murine model of asthma: effect of steroid treatment. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* v. 279, n. 6, p. L1120-L1128, 2000.
- TOMIYOSHI, M. Y.; SAKAI, M.; BALEEIRO, R. B.; STANKEVICIUS, D.; MASSOCO C. O.; PALERMO-NETO, J.; BARBUTO, J. A. Cohabitation with a B16F10 melanoma-bearer cage mate influences behavior and dendritic cell phenotype in mice. **Brain Behav. Immun.**, v. 23, n. 4, p.558-567, 2009.
- ULBRICH, H. ERIKSSON, E. E., LINDOBOM, L. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 24; n.2, p. 640-647, 2003.
- VAN BEVER, H. P. Determinants in early life for asthma development. **Allergy Asthma Clin. Immunol.**, v. 5, n. 1, p. 6, 2009.
- VENTURA, R.; ALCARO, A.; MANDOLESI, L.; PUGLISI-ALLEGRA, S. In vivo evidence that genetic background controls impulse-dependent dopamine release induced by amphetamine in the nucleus accumbens. **J Neurochem.**, v. 89, n. 2, p. 494-502, 2004.
- VIKSMAN, M. Y.; LIU, M. C.; BICKEL CA, SCHLEIMER RP, BOCHNER BS. Phenotypic analysis of alveolar macrophages and monocytes in allergic airway inflammation. I. Evidence for activation of alveolar macrophages, but not peripheral blood monocytes, in subjects with allergic rhinitis and asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 155, n. 3, p. 858-863, 1997.
- VISSERS, J. L.; VAN ESCH, B. C.; HOFMAN, G. A.; VAN OOSTERHOUT, A. J. Macrophages induced an allergen-specific and long-term suppression in a mouse model. **Eur. Respir. J.** v. 26, n.2, p.1040-1046, 2005.
- WEERSINK, E. J.; POSTMA, D. S.; AALBERS, R.; DE MONCHY, J. G. Early and late asthmatic reaction after allergen challenge. **Respir. Med.**, v. 88, n. 2, p. 103-114, 1994.
- WINSLOW, J. T.; INSEL, T. R. Serotonergic modulation of rat pup ultrasonic vocal development: studies with 3,4-methylenedioxymethamphetamine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 254, n. 1, p. 212-220, 1990.
- YACOUBIAN, G. S. JR.; PETERS, R. J. An exploration of recent club drug use among rave attendees. **J. Drug. Educ.**, v. 37, n. 2, p. 145-161, 2007.
- YANG, M.; AUGUSTSSON, H.; MARKHAM, M. C.; HUBBARD, T. D.; WEBSTER, D.; WALL, M. P.; BLANCHARD, J. R.; BLANCHARD, C. D. The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. **Physiology & Behavior**, v. 81, n. 3, p.465-473, 2004.
- YAWN, B. P. Factors accounting for asthma variability: achieving optimal symptom control for individual patients. **Prim. Care. Respir. J.**, v. 17, n. 3, p. 138-147, 2008.

- ZHANG, S.; SHEN, Z.; HU, G.; LIU, R.; ZHANG, X. Effects of endogenous glucocorticoids on allergic inflammation and TH1/TH2 balance in airway allergic disease **Annals of Allergy, Asthma & Immunology.**, v. 103, n. 6, p. 525-534, 2009.
- ZOLKOWSKA, D.; ROTHMAN, R. B.; BAUMANN, M. H. Amphetamine analogs increase plasma serotonin: implications for cardiac and pulmonary disease. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 318, n. 2, p. 604-610, 2006.
- ZORRILLA, E. P.; LUBORSKY, L.; MCKAY, J. R.; ROSENTHAL, R.; HOULDIN, A.; TAX, A.; MCCORKLE, R.; SELIGMAN, R.; SCHMIDT, K. The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta analytic review. **Brain Beh. Immunity.** v.15, p. 199 - 226, 2001.