UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

VIVIANE FERRAZ DE PAULA

**Avaliação dos efeitos do N-metil-3,4
metilenodioximetanfetamina (MDMA – Ecstasy)
sobre parâmetros comportamentais,
neuroendócrinos e de atividade de neutrófilos em
camundongos**

São Paulo
2007

VIVIANE FERRAZ DE PAULA

**Avaliação dos efeitos do N-metil-3,4
metilenodioximetanfetamina (MDMA – Ecstasy)
sobre parâmetros comportamentais,
neuroendócrinos e de atividade de neutrófilos em
camundongos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração:
Neurociências e Comportamento

Orientador: Prof. Dr. João Palermo Neto
Co-orientador: Profa. Dra. Regina Lúcia de Moraes Moreau

**São Paulo
2007**

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.

Catlogação na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Paula, Viviane Ferraz de.

Avaliação dos efeitos do N-metil-3,4 metilenodioximetanfetamina (MDMA – Ecstasy) sobre parâmetros comportamentais, neuroendócrinos e de atividade de neutrófilos em camundongos / Viviane Ferraz de Paula; orientador João Palermo Neto; Co-orientadora Regina Lúcia de Moraes Moreau. --São Paulo, 2007.

151 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Ecstasy (Droga) 2. Distúrbios infecciosos 3. Neuroimunologia
4. Citometria de fluxo I. Título.

RM 666.M35

FOLHA DE APROVAÇÃO

VIVIANE FERRAZ DE PAULA

Título: Avaliação dos efeitos do N-metil-3,4 metilenodioximetanfetamina (MDMA – Ecstasy) sobre parâmetros comportamentais, neuroendócrinos e de atividade de neutrófilos em camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração:
Neurociências e Comportamento

Aprovada em:

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

À minha mãe Vilma Ferraz de Paula

Dedico este trabalho a mulher que persistiu, apesar das pedras no caminho, e proporcionou a mim e ao meu irmão, uma boa educação e uma boa formação; sem medir esforços, sacrificando suas próprias vontades para que hoje eu pudesse chegar aqui e dizer:

Mãe muito obrigada! Tudo que você fez valeu a pena. Te amo!

**Aos meus avós Benedita de Oliveira Campos e Silvio Ferraz de Campos
(in memorian)**

Por todo amor, afeto e carinho que tiveram por mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir mais uma conquista em minha vida.

Ao Prof. Dr. João Palermo Neto, pela orientação neste trabalho e pelos ensinamentos ao longo destes dois anos e meio, me mostrando sempre o melhor caminho a seguir para alcançar meus objetivos. Um exemplo de dedicação ao ensino e à ciência.

A Profa. Dra. Regina Lucia de Moraes Moreau, pela co-orientação deste trabalho e por estar sempre disposta a ouvir e ajudar durante todo este período, tornando mais prazerosa esta etapa em minha vida.

Ao Prof. Dr. Frederico Azevedo Costa Pinto, por contribuir com o enriquecimento dos meus conhecimentos nas manhãs de quarta-feira.

Ao Prof. Dr. Fábio Ribeiro da Silva, pela confiança que depositou em mim durante a minha graduação e pelo incentivo a iniciar a pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Jorge Camilo Flório pelas dosagens neuroquímicas e pela agradável convivência.

A Claudia, médica veterinária responsável do biotério e aos funcionários do biotério pela colaboração com meu trabalho.

Aos técnicos do laboratório Ricardo, Priscila e Magali pela colaboração no laboratório e pela agradável convivência.

Ao laboratório de microbiologia do VPT por ceder o *Staphylococcus aureus* que foi utilizado neste trabalho.

A Priscila do Laboratório de Dosagens Hormonais do VRA - FMVZ-USP pelas dosagens de corticosterona.

A Dra. Evelise Fonseca pelos conselhos no projeto inicial deste trabalho e pela convivência que deixou saudades e boas lembranças.

Ao Dr. Dario Abbud Righi pelos conselhos e orientação nos experimentos comportamentais.

Aos pós-graduandos Daniel Stankevicius e Elaine Cristina Rodrigues Costa que colaboraram comigo no início da minha jornada na pós-graduação.

Aos pós-graduandos Alison Ribeiro, Andréia Latorre, Domenica Polomaris, Milena Lobão Pinheiro, Mônica Sakai e Wanderley Quinteiro Filho pelo auxílio nos experimentos e pelas discussões sempre produtivas para este trabalho.

A Mariana Lacava pelas dosagens de MDMA que contribuíram muito com a conclusão deste trabalho e pela amizade que surgiu desta agradável parceria.

A todos os colegas da pós-graduação que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho e proporcionaram muitos momentos agradáveis e alegres.

Ao meu namorado, Alison Ribeiro, pelo carinho, amor e atenção. Obrigada por você ter permanecido ao meu lado em todos os momentos, dividindo as angústias e as alegrias desta trajetória que ficou ainda mais bonita e inesquecível com você.

Ao meu irmão Silvio Ferraz pela compreensão e horas perdidas me ajudando na apresentação e formatação deste trabalho.

E por fim não poderia deixar de agradecer aos grandes amigos que fiz aqui e que sempre serão lembrados com muito amor e carinho: Alison Ribeiro, Carolina Penna, Daniel Vagner Hamada Cohn, Domenica Palomaris, Luciana Vismari, Maria Isabel, Mariana Lacava, Milena Lobão Pinheiro, Mônica Sakai, Renato Couto Moraes e Wanderley Quinteiro Filho. Amo vocês!

RESUMO

FERRAZ DE PAULA, V. Avaliação dos efeitos do N-metil-3,4 metilenodioximetanfetamina (MDMA-*Ecstasy*) sobre parâmetros comportamentais, neuroendócrinos e de atividade de neutrófilos em camundongos.[Effects of N-methyl-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA-*Ecstasy*) on behavioral, neuroendocrines, and neutrophils activity parameters in mice.] 2007. 151 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Ecstasy é o nome popular do 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), uma droga de abuso muito utilizada por adultos jovens. Diferentes relatos de caso têm mostrado correlações positivas entre o abuso do *Ecstasy* e doenças infecciosas. Muitos estudos em modelos animais mostraram que o MDMA induz alterações de imunidade inata e adquirida; entretanto pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais estes efeitos ocorrem. Buscamos neste trabalho por efeitos da administração i.p. de MDMA sobre parâmetros comportamentais, neuroendócrinos e de atividade de neutrófilos e o fizemos à luz de mecanismos neuroimunomodulatórios. Nossos resultados mostraram que o MDMA (5,0; 8,0; 10,0 e 20,0 mg/kg) produz, 30 minutos após a administração (1) aumento da atividade locomotora avaliada no campo aberto e no LCE e (2) diminuição do *burst* oxidativo de neutrófilos após indução por *Staphylococcus aureus* nas doses de 8,0; 10,0 e 20,0 mg/kg. Adicionalmente, 60 minutos após a administração de 10,0 mg/kg observou-se (3) um aumento de atividade locomotora avaliada no campo aberto e no LCE, (4) aumento do *turnover* de noradrenalina e de dopamina no hipotálamo; (5) aumento do *turnover* de dopamina no estriato; (6) aumento dos níveis séricos de corticosterona; (7) diminuição do *burst* oxidativo após indução por SAPI e PMA e, também, da porcentagem e da intensidade de fagocitose por neutrófilos sanguíneos; (8) aumento do número de eritrócitos, da quantidade de hemoglobina e da porcentagem do hematócrito e diminuição do número de linfócitos sanguíneos; (9) diminuição do

número total de células na medula óssea; (10) aumento do número de leucócitos e (11) diminuição do peso relativo do baço. A exposição *in vitro* ao MDMA (12) não alterou o *burst* oxidativo e a fagocitose por neutrófilos. Esses resultados sugerem que o MDMA produz ao mesmo tempo alterações comportamentais, neuroquímicas, endócrinas e imunológicas em camundongos. A estimulação motora dos animais parece relacionada a um aumento da atividade catecolaminérgica central e, muito especialmente, do sistema dopaminérgico estriatal. É possível sugerir que a alteração na imunidade inata após MDMA esteja relacionada ao aumento de atividade do eixo HHA e, conseqüentemente, dos níveis séricos de corticosterona. Não se descarta, porém, uma possível ativação do SNAS induzida pelo MDMA. Finalmente, observamos que o MDMA não tem efeito direto sobre neutrófilos.

Palavras-chave: Neuroimunomodulação, *Burst* Oxidativo, Fagocitose, Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado, Citometria de Fluxo.

ABSTRACT

FERRAZ DE PAULA, V. Effects of N-methyl-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA-*Ecstasy*) on behavioral, neuroendocrines, and neutrophils activity parameters in mice. [Avaliação dos efeitos do N-metil-3,4 metilenodioximetanfetamina (MDMA-*Ecstasy*) sobre parâmetros comportamentais, neuroendócrinos e de atividade de neutrófilos em camundongos.] 2007. 151 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Ecstasy is the popular name of N-metil-3,4 methylenedioxymethamphetamine (MDMA), a drug of abuse widely used by young adults. Different case reports have been demonstrating the existence of a positive correlation between *Ecstasy* abuse and the presence of infectious disease. Many studies conducted in animal models showed that MDMA reduces innate and adaptative immunity. However, little is known about the mechanisms behind these reported effects. In this work we searched for effects of i.p. MDMA administration on behavioral, neuroendocrines, and neutrophil activity in mice, especially parameters looking for neuroimmune relationships. We showed that MDMA treatment (5,0; 8,0; 10,0; and 20,0 mg/kg) produces after 30 minutes (1) increased locomotor activity in the open field and plus maze apparatuses, (2) decreased neutrophil oxidative burst after *Staphylococcus aureus* (SAPI) after *in vitro* induction 8,0, 10,0, and 20,0 mg/kg doses. Additionally, 60 minutes after MDMA (10,0 mg/kg) we observed (3) increased locomotor activity in the open field and plus maze apparatuses, (4) increased noradrenaline and dopamine turnover in the hypothalamus, (5) increased dopamine turnover in the striatum, (6) increased level of serum corticosterone, (7) decreased neutrophil oxidative burst after SAPI and PMA inductions, and also decreased percentage and intensity of neutrophil phagocytosis, (8) increased erythrocyte number, hemoglobin level, and hematocrit, and decreased peripheral blood lymphocyte number, (9) decreased bone marrow total cell number, (10) increased leucocyte number on spleen and (11) splenic weight reduction. It was

also observed that (12) *in vitro* exposure to MDMA induced no effects on both neutrophil oxidative burst and phagocytosis. These results suggest that MDMA produces at the same time behavioral, neurochemical, endocrine, and immunological alterations in mice. The increased locomotor activity observed seems to be related to an action on central catecholaminergic activity, mainly, at the level of the dopaminergic striatal system. It is also possible to suggest that the observed innate immunity alterations are related to an increased HPA axis activity induced by MDMA, via corticosterone. However, we cannot discharge a possible SNS activation induced by MDMA, a fact that could have contributed to the present reported effects. Finally, and importantly we observed that *in vitro* MDMA has no effects on neutrophil activity.

Key words: Neuroimmunomodulation, Oxidative burst, Fagocytosis, Open field, Plus maze, Flow citometry.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Etho Vision® - (Vídeo Tracking Motion & Behavior Recognition System Versão 1.90) - equipamento de rastreamento em vídeo, utilizado no procedimento experimental para análise de movimentos. As setas indicam: 1-Campo Aberto para camundongo, 2-Câmera filmadora acoplada ao computador, 3-Monitor de vídeo e 4-Imagem digitalizada representada em pixels. Adaptado de Alves, 2005. 49
- Figura 2 - Citômetro de fluxo modelo FACScalibur da Becton Dickinson acoplado a um computador Macintosh (G4) da Apple utilizado no presente trabalho para avaliar a atividade de neutrófilos. As setas indicam: 1- Injeção da amostra, 2-Painel de controle do citômetro e 3-gráficos dos dados adquiridos. Adaptado de Alves, 2005. 54
- Figura 3 – Representação esquemática de seqüências de reagentes utilizados nas técnicas de burst oxidativo e fagocitose: Tubo A – PBS; Tubo B – DCFH; Tubo C – SAPI; Tubo D – DCFH + SAPI, Tubo E – DCFH + PMA. Adaptado de Costa, 2004. 55
- Figura 4 - Sistema HPLC-ED (SHIMATZU modelo 6A) utilizado no presente para dosagens neuroquímicas. As setas indicam: 1- Injeção da amostra, 2-Visor do painel de controle e 3-Detector eletroquímico. Adaptado de Alves, 2005. 60
- Figura 5 - Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a locomoção total de camundongos Balb/c no campo aberto. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n=8$ animais/grupo. 66
- Figura 6 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a locomoção de camundongos Balb/c na zona externa do campo aberto. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n=8$ animais/grupo. 67
- Figura 7 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a locomoção de camundongos Balb/c na zona tigmotóxica do campo aberto. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n=8$ animais/grupo. 67
- Figura 8 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre o tempo de locomoção de camundongos Balb/c no campo aberto. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n=8$ animais/grupo. 69
- Figura 9 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre o tempo de locomoção de camundongos Balb/c na zona externa do campo aberto. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n=8$ animais/grupo. 69
- Figura 10 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre o tempo de locomoção de camundongos Balb/c na zona tigmotóxica do campo aberto. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n=8$ animais/grupo. 70
- Figura 11 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre o número de grooming de camundongos Balb/c no campo aberto. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n=8$ animais/grupo. 71
- Figura 12 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre o tempo de realização de *grooming* de camundongos Balb/c no campo aberto. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n=8$ animais/grupo. 72
- Figura 13 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a freqüência do comportamento de levantar de camundongos Balb/c no campo aberto. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n=8$ animais/grupo. 72

Figura 14 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre o número de movimentos iniciados de camundongos Balb/c no campo aberto. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo.	73
Figura 15 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a velocidade média da locomoção de camundongos Balb/c no campo aberto. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo.	73
Figura 16 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a % de entradas e % de tempo gasto em movimento de camundongos Balb/c nos braços abertos do LCE. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, ** $p < 0,01$ em relação ao controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo.	75
Figura 17 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a % de entradas e % de tempo gasto em movimento de camundongos Balb/c nos braços fechados do LCE. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, * $p < 0,05$ em relação ao controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo.	75
Figura 18 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre o número total de entradas de camundongos Balb/c nos braços abertos e fechados do LCE. ** $p < 0,01$ em relação ao controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo.	76
Figura 19 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a locomoção total de camundongos Balb/c no LCE. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, * $p < 0,05$ em relação ao controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo.	77
Figura 20 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre o tempo de locomoção de camundongos Balb/c no LCE. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, * $p < 0,05$ em relação ao controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo.	78
Figura 21 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a velocidade média da locomoção de camundongos Balb/c no LCE. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo.	78
Figura 22 - Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0mg/kg) sobre a locomoção de camundongos Balb/c no campo aberto. * $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle, teste “t” de Student. n=11 animais/grupo.	80
Figura 23 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0mg/kg) sobre o tempo de locomoção de camundongos Balb/c no campo aberto. * $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle, teste “t” de Student. n=11 animais/grupo.	81
Figura 24 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0mg/kg) sobre o número de ocorrências de <i>grooming</i> e número do comportamento de levantar de camundongos Balb/c no campo aberto. * $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle, teste “t” de Student. n=11 animais/grupo.	82
Figura 25 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0mg/kg) sobre o número de movimentos iniciados e velocidade média de camundongos Balb/c no campo aberto. * $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle, teste “t” de Student. n=11 animais/grupo.	83
Figura 26 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0mg/kg) sobre a % de entradas (%EBA) e % de tempo gasto em movimento nos braços abertos (%TBA) de camundongos Balb/c no LCE. $p < 0,0001$, teste “t” de Student. n=9 animais/grupo.	84
Figura 27 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0mg/kg) sobre a % de entradas (%EBF) e % de tempo gasto em movimento nos braços fechados (%TBF) de camundongos Balb/c no LCE. * $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle; teste “t” de Student. n=9 animais/grupo.	85
Figura 28 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0mg/kg) sobre o número total de entradas nos braços abertos e fechados de camundongos Balb/c no LCE. * $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle; teste “t” de Student. n=9 animais/grupo.	85

Figura 29 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0mg/kg) em camundongos Balb/c sobre a locomoção total e em diferentes zonas do LCE. * $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle, # $p < 0,0018$ em relação ao grupo controle; teste “t” de Student. n=9 animais/grupo.	86
Figura 30 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0mg/kg) sobre o tempo total em movimento e a frequência do comportamento de levantar de camundongos Balb/c no LCE. * $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle; teste “t” de Student. n=9 animais/grupo.	88
Figura 31 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0mg/kg) sobre a velocidade média de camundongos Balb/c no LCE. * $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle; teste “t” de Student. n=9 animais/grupo.	88
Figura 32 - Citograma dos leucócitos (A) e Histograma (B) dos neutrófilos após a incubação com DCFH de animais do grupo controle R1=linfócitos; R2=monócitos; R3=neutrófilos.	91
Figura 33 - Citograma dos leucócitos (A) e Histograma (B) dos neutrófilos incubados com <i>S.aureus</i> realizando fagocitose R1=linfócitos; R2=monócitos; R3=neutrófilos.	92
Figura 34 - Citogramas de leucócitos circulantes de camundongos incubados com PBS (TUBO A) e citograma de leucócitos circulantes de camundongos incubados com <i>S.aureus</i> realizando fagocitose (TUBO C) em animais do grupo controle.	92
Figura 35 - Histograma de neutrófilos de animais do grupo controle: (1) Histograma de células controle incubadas apenas com PBS; (2) Histograma da porcentagem de neutrófilos incubados com <i>S.aureus</i> realizando fagocitose.	93
Figura 36 - Citograma dos leucócitos (A) e Histograma (B) dos neutrófilos após a incubação com o PMA de animais do grupo controle R1=linfócitos; R2=monócitos; R3=neutrófilos.	93
Figura 37 - Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos de camundongos Balb/c, 30 minutos após administração. A – <i>burst</i> oxidativo basal, B – <i>burst</i> oxidativo após estímulo <i>in vitro</i> com SAPI, C – <i>burst</i> oxidativo após estímulo <i>in vitro</i> com PMA, 30 minutos após a administração. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=10 animais/grupo.	95
Figura 38 - Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos de camundongos Balb/c, 30 minutos após a administração. A – intensidade de fagocitose, B – porcentagem de fagocitose. $p > 0,05$, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=10 animais/grupo.	96
Figura 39 – Esquema de tratamento de camundongos Balb/c para avaliação da atividade de neutrófilos sanguíneos – Azul: animais receberam injeção de solução salina; Vermelho: animais receberam injeção de MDMA 10,0 mg/kg. Todos os animais receberam três injeções.	97
Figura 40 - Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos de camundongos Balb/c – Curva tempo-resposta. A – <i>burst</i> oxidativo basal, B – <i>burst</i> oxidativo após estímulo <i>in vitro</i> com SAPI, C – <i>burst</i> oxidativo após estímulo <i>in vitro</i> com PMA. # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=10 animais/grupo.	100
Figura 41 - Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos de camundongos Balb/c – Curva Tempo-Resposta. A – intensidade de fagocitose, B – porcentagem de fagocitose. # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=10 animais/grupo.	101
Figura 42 - Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre os níveis séricos de corticosterona de camundongos Balb/c 60 minutos após a administração. * $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle, teste “t” de Student. n=9 animais/grupo.	103
Figura 43 - Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre os níveis hipotalâmicos de noradrenalina e VMA (A); dopamina, DOPAC e HVA (B) e serotonina e 5-HIAA (C) de camundongos Balb/c, 60 minutos após a administração. * $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle, # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; teste “t” de Student. n=9 animais/grupo.	107
Figura 44 - Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre <i>turnover</i> hipotalâmico de VMA/noradrenalina (A); DOPAC/dopamina, HVA/dopamina e DOPAC+HVA/dopamina; (B) e 5-HIAA/serotonina (C) de camundongos Balb/c, 60 minutos após a administração. * $p < 0,0001$ em	

relação ao grupo controle, #p<0,05 em relação ao grupo controle; teste “t” de Student.n=9 animais/grupo.	108
Figura 45 - Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre os níveis estriatais de noradrenalina e VMA (A); dopamina, DOPAC e HVA (B) e serotonina e 5-HIAA (C) de camundongos Balb/c, 60 minutos após a administração. #p<0,05 em relação ao grupo controle; teste “t” de Student.n=9 animais/grupo.	109
Figura 46 - Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre <i>turnover</i> estriatal de VMA/noradrenalina (A); DOPAC/dopamina, HVA/dopamina e DOPAC+HVA/dopamina; (B) e 5-HIAA/serotonina (C) de camundongos Balb/c, 60 minutos após a administração. #p<0,05 em relação ao grupo controle; teste “t” de Student.n=9 animais/grupo.	110
Figura 47 - Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre parâmetros hematológicos: (A) número de leucócitos e eritrócitos totais sanguíneos; (B) valores médios de hemoglobina (HGB); (C) porcentagem do hematócrito (Ht) de camundongos Balb/c, 60 minutos após a administração. #p<0,05 em relação ao grupo controle; *p<0,0001 em relação ao grupo controle; teste “t” de Student.n=10 animais/grupo.	113
Figura 48 - Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre contagem diferencial de leucócitos sanguíneos de camundongos Balb/c, 60 minutos após a administração. **p=0,0006 em relação ao grupo controle; teste “t” de Student.n=10 animais/grupo.	113
Figura 49 - Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre contagem total de leucócitos da medula óssea e baço de camundongos Balb/c, 60 minutos após a administração. # p<0,05 em relação ao grupo controle; teste “t” de Student.n=10 animais/grupo.	114
Figura 50- Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre o peso relativo do baço de camundongos Balb/c, 60 minutos após a administração. * p=0,031 em relação ao grupo controle; teste “t” de Student.n=10 animais/grupo.	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a atividade locomotora de camundongos Balb/c observados no campo aberto. Os dados representam a média±DP (desvio padrão).....	66
Tabela 2 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre o tempo em movimento de camundongos Balb/c observados no campo aberto. Os dados representam a média±DP (desvio padrão).....	68
Tabela 3 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre o número e tempo de <i>grooming</i> , frequência de levantar, número de movimentos iniciados e velocidade média da locomoção de camundongos Balb/c observados no campo aberto. Os dados representam a média±DP (desvio padrão).....	71
Tabela 4 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre número entradas e tempo gasto em movimento nos braços abertos e fechados de camundongos Balb/c no labirinto em cruz elevado. Os dados representam a média±DP (desvio padrão)	74
Tabela 5 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre locomoção total, tempo de locomoção e velocidade média da locomoção de camundongos Balb/c observados no labirinto em cruz elevado. Os dados representam a média±DP (desvio padrão).....	77
Tabela 6 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0mg/kg) sobre a atividade locomotora de camundongos Balb/c observados no campo aberto. Os dados representam a média±DP (desvio padrão)	80
Tabela 7– Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0mg/kg) sobre o tempo de locomoção de camundongos Balb/c observados no campo aberto. Os dados representam a média±DP (desvio padrão)	81
Tabela 8 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre o número de <i>grooming</i> , frequência de levantar, número de movimentos iniciados e velocidade média da locomoção de camundongos Balb/c observados no campo aberto. Os dados representam a média±DP (desvio padrão)	82
Tabela 9 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre porcentagem de entradas e porcentagem de tempo gasto em movimento nos braços abertos e fechados de camundongos Balb/c no labirinto em cruz elevado. Os dados representam a média±DP (desvio padrão).....	84
Tabela 10 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre locomoção total e em diferentes zonas do labirinto em cruz elevado em camundongos Balb/c. Os dados representam a média±DP (desvio padrão).....	86
Tabela 11 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre tempo de locomoção, frequência do comportamento de levantar e velocidade média da locomoção de camundongos Balb/c observados no labirinto em cruz elevado. Os dados representam a média±DP (desvio padrão)	87
Tabela 12 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos em camundongos Balb/c, 30 minutos após a administração. Os dados representam a média±DP (desvio padrão).....	94
Tabela 13 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos em camundongos Balb/c. Os dados representam a média±DP (desvio padrão)	99
Tabela 14 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) em camundongos Balb/c sobre os níveis séricos de corticosterona, 60 minutos após a administração. Os dados representam a média±DP (desvio padrão).....	102
Tabela 15 – Efeitos da administração aguda de MDMA na dose 10,0 mg/kg sobre os níveis, os metabólitos e o <i>turnover</i> hipotalâmicos e estriatais de noradrenalina, dopamina e serotonina, 60 minutos após a administração, em camundongos Balb/c.....	106
Tabela 16 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre parâmetros hematológicos 60 minutos após a administração em camundongos Balb/c. Os dados representam a média±DP (desvio padrão).....	112

Tabela 17 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre contagem diferencial de leucócitos sanguíneos 60 minutos após a administração em camundongos Balb/c. Os dados representam a média±DP (desvio padrão).....	112
Tabela 18 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre contagem total de leucócitos do baço e medula óssea 60 minutos após a administração em camundongos Balb/c. Os dados representam a média±DP (desvio padrão).....	112
Tabela 19 - Efeitos <i>in vitro</i> do MDMA sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos de camundongos Balb/c. Os dados representam a média±DP (desvio padrão).....	116

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO.....	23
2.2 MDMA - ECSTASY.....	28
2.3 NEUTRÓFILOS	38
3. OBJETIVOS.....	44
3.1 OBJETIVO GERAL.....	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 ANIMAIS.....	45
4.2 FÁRMACO.....	46
4.3 CORANTES CELULARES.....	46
4.4 REAGENTES E SOLUÇÕES	46
4.5 REGISTRO COMPORTAMENTAL.....	48
4.5.1 Medida da Atividade Geral no Campo Aberto	48
4.5.2 Avaliação do Comportamento no Labirinto em Cruz Elevado	51
4.6 CITÔMETRO DE FLUXO	52
4.6.1 Medida da Atividade Celular	53
4.7 DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA	57
4.7.1 Coleta de Sangue para Obtenção do Soro	57
4.7.2 Dosagem de Corticosterona.....	57
4.7.3 Curva Padrão	58
4.7.4 Soro Controle	58
4.8 DOSAGENS NEUROQUÍMICAS.....	59
4.8.1 Coleta e Processamento dos Tecidos.....	59
4.8.2 Dosagens Neuroquímicas	60
4.9 HEMOGRAMA.....	62
4.10 AVALIAÇÃO DA CELULARIDADE DO BAÇO E MEDULA ÓSSEA.....	63
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS.....	65
6.1 EXPERIMENTO 1 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM DOSES CRESCENTES DE MDMA SOBRE O COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS OBSERVADOS NO CAMPO ABERTO E NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO 30 MINUTOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO.	65
6.2 EXPERIMENTO 2 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 10,0 mg/Kg DE MDMA SOBRE O COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS OBSERVADOS NO CAMPO ABERTO E NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO, 60 MINUTOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO.....	79

6.3 EXPERIMENTO 3 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM DOSES CRESCENTES DE MDMA SOBRE A ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS SANGÜÍNEOS DE CAMUNDONGOS MEDIDA 30 MINUTOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO.....	89
6.4 EXPERIMENTO 4 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 10,0 mg/kg DE MDMA SOBRE A ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS SANGÜÍNEOS DE CAMUNDONGOS MEDIDA 30, 60 MINUTOS E 24 HORAS APÓS A ADMINISTRAÇÃO.....	97
6.5 EXPERIMENTO 5 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 10,0 mg/Kg DE MDMA, SOBRE A DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA DE CAMUNDONGOS, 60 MINUTOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO.....	102
6.6 EXPERIMENTO 6 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 10,0 mg/kg DE MDMA SOBRE OS NÍVEIS DE MONOAMINAS E DE SEUS METABÓLITOS NO HIPOTÁLAMO E ESTRIATO DE CAMUNDONGOS, 60 MINUTOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO.....	104
6.7 EXPERIMENTO 7 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 10,0 mg/kg DE MDMA SOBRE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E DE CELULARIDADE DO BAÇO E DA MEDULA ÓSSEA, 60 MINUTOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO.	111
6.8 EXPERIMENTO 8 – EFEITOS <i>in vitro</i> DO MDMA SOBRE A ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS SANGÜÍNEOS DE CAMUNDONGOS.....	115
7. DISCUSSÃO	117
8. CONCLUSÕES	135
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137

1. INTRODUÇÃO

A existência de mecanismos nervosos que modulam a atividade do sistema imune e das respostas a agentes infecciosos foi inferida por observações empíricas advindas da ingenuidade e da capacidade dedutiva dos antigos investigadores. Durante a primeira metade do século 20 este conhecimento prévio coincidiu com evidências que mostravam que os sistemas endócrino e nervoso se integravam para regular diferentes funções do organismo dentre as quais, aquelas ligadas ao sistema imune. A partir daí, diversas evidências no campo da psicologia, neurobiologia e imunologia têm demonstrado que o sistema imune não tem função autônoma, mas que ao contrário, é influenciado por fatores externos intermediados pelo sistema nervoso central. Mais que isso, existem evidências claras dos efeitos de citocinas como, por exemplo, de interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6), sobre a atividade nervosa central e sobre o comportamento. Uma variedade de modelos experimentais estão, pois, evidenciando a existência de interações bidirecionais entre os sistemas nervoso central e imune, que constituem o pilar mestre de um ramo da ciência conhecido como neuroimunomodulação ou psiconeuroimunologia.

Neste sentido, estudos *in vivo* relatam que estados emocionais, como estresse, ansiedade e depressão, bem como fármacos de ação central, como o diazepam e psicoestimulantes, entre eles a anfetamina, interferem com a imunidade de animais de laboratório. Nas últimas duas décadas, tem-se documentado que inúmeras drogas de abuso, tais como cocaína, opióides, canabinóides e anfetaminas, entre elas o *Ecstasy*, têm a capacidade de alterar diversos aspectos de funções do sistema imune, atuando diretamente em células ou órgãos imunes e/ou indiretamente através de vias neuroimunes.

O *Ecstasy* é uma substância sintética, classificada como uma anfetamina alucinógena, que tem sido utilizada de forma ilegal pela população desde os anos 80 como droga de uso recreacional, especialmente pelos mais jovens. Um relatório técnico da Organização Mundial da Saúde (ONU) de 2003 mostrou a existência de um crescimento no consumo do *Ecstasy* em todo o mundo; dados mais recentes indicam que há 8,5 milhões de consumidores. No Brasil, em 2003, foram apreendidos mais de 70 mil comprimidos desta droga, e em 2004 este número ultrapassou os 80 mil. Estes números mostram que a situação no Brasil não deve diferir daquela registrada no mundo, uma vez que em 2005 o relatório da ONU classificou o Brasil como terceiro colocado no ranking de consumo de *Ecstasy* de toda a América do Sul.

Estudos demonstram que o *Ecstasy* apresenta propriedades psicoativas complexas e, também, que tem potencial para interferir com várias funções do sistema imune. De fato, usuários de *Ecstasy* são geralmente mais susceptíveis a desenvolverem infecções. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos através dos quais essa droga atua sobre o sistema imune, particularmente sobre os mecanismos ditos inatos e responsáveis pela primeira linha de defesa orgânica contra agentes nocivos.

Portanto, diante do envolvimento do *Ecstasy* com a atividade do sistema nervoso central e com a imunidade, pareceu-nos relevante abordar de forma mais aprofundada, alguns efeitos do MDMA sobre parâmetros comportamentais, neuroendócrinos e do sistema imune inato, mais especificamente, sobre a atividade de neutrófilos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO

Define-se neuroimunomodulação como um ramo da ciência que estuda as interconexões neuroimunoendócrinas em diferentes níveis de funcionamento do organismo. Ader 2000 descreveu a neuroimunomodulação como sendo a ciência que estuda as interações entre o comportamento, as funções neurais e endócrinas, e os processos imunes; segundo ele, essas funções constituem um sistema orgânico único e integrado, em que cada uma de suas partes executa uma função especializada. Há muito se conhecia a existência de uma integração entre o corpo e a 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. Evidências experimentais bem mais recentes e advindas de estudos *in vivo* mostram que estados emocionais, como estresse, ansiedade e depressão, bem como medicamentos de ação central, como o diazepam (MASSOCO; PALERMO NETO, 1999, LAZZARINI et al., 2001, 2006) e psicoestimulantes, entre eles a anfetamina (PACIFICI et al., 2002, CONNOR, 2004, LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2004) interferem com a imunidade de animais de laboratório.

Em 1936 Selye, em um trabalho pioneiro, demonstrou que o estresse causava alterações no tamanho do timo, do baço e dos linfonodos. Em 1977, Bartrop verificou em seu trabalho, que um estresse de natureza psicológica era capaz de produzir alterações imunológicas independentemente da participação de hormônios. Porém, as primeiras evidências realmente diretas das relações neuroimunes foram

relatadas por volta dos anos 70, entre outros, por Besedovsky et al., 1977 demonstraram que a ativação do sistema imune aumentou a razão de disparo de neurônios hipotalâmicos, sugerindo que o cérebro estaria envolvido com a resposta imune. A partir deste trabalho passaram a ser estudadas uma série de interações entre os mecanismos neuroendócrinos e a atividade de macrófagos e de leucócitos (BRINES, 1994).

Grande parte dos avanços em neuroimunologia teve como responsável um grupo de cientistas liderados por Branislav D. Jankovic; estes pesquisadores demonstraram a existência de uma correlação antigênica entre timócitos, linfócitos B e vesículas sinápticas do cérebro de ratos através de ensaios de citotoxicidade e de imunofluorescência (JANKOVIC; HORVAT; MITROVIC, 1979). Estas informações juntamente com outras, estabeleceram uma sólida base molecular e bioquímica para a existência de uma comunicação bidirecional entre os sistemas imune e neuroendócrino. Sabe-se hoje que, tanto mecanismos neuroendócrinos modulam a atividade do sistema imune, quanto este influencia a atividade do sistema neuroendócrino (MADDEN; FELTEN, 1995). De fato, os sistemas nervoso, endócrino e imune compartilham de receptores para citocinas, neurotransmissores, hormônios e neuropeptídeos. Por outro lado, produtos tidos como específicos de cada um destes sistemas coexistem em tecidos linfóides, endócrino e nervoso. Sendo assim, por exemplo, há citocinas sendo produzidas no sistema nervoso central (SNC) e também hormônios e neurotransmissores sendo sintetizados por células linfóides (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996).

É de se acreditar, portanto, que estímulos elétricos aplicados em áreas específicas do SNC, como também, lesões de estruturas específicas neste sistema, interfiram com diversas respostas do sistema imune. De fato, modelos que envolvem

lesões de estruturas específicas do SNC e análise das alterações ocasionadas por estas em parâmetros ligados à atividade do sistema imune têm sido, também, utilizado para o estudo destas relações. Assim por exemplo, ratos com lesões no *locus coeruleus* apresentaram uma menor produção de anticorpos contra albumina sérica bovina, uma redução no tamanho do timo e uma redução da população de linfócitos T 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; ISAKOVIC, 1973). Em nossos laboratórios, verificou-se que animais tornados ansiosos, por estimulação aversiva, apresentaram alterações na imunidade inata (PALERMO-NETO; OLIVEIRA-MASSOCO; ROBESPIERRE, 2003) e também já foram constatadas alterações no comportamento e na imunidade de camundongos cujas mães receberam um estresse pré-natal (FONSECA et al., 2002; 2005).

Por outro lado, substâncias liberadas por células do sistema imune são capazes de modular ou influenciar a atividade de áreas específicas do SNC e, dessa forma, o comportamento animal. Neste sentido, Basso e colaboradores (2003) mostraram em nossos laboratórios que uma reação alérgica intestinal é 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. Mostraram também, que as fibras nervosas do tipo C desempenhavam um importante papel nos mecanismos ligados a esta manifestação neuroimune (BASSO et al., 2004). Dados obtidos pelo grupo de Besedovsky sugerem que a ativação do sistema imune e a

conseqüente produção de interleucinas provoca uma resposta endócrina desencadeada pela ação destas no SNC. De fato, mostrou-se que a IL-1 ativa o eixo hipotálamo hipófise adrenal (HHA) de várias maneiras: (1) atuando diretamente na liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH) pelo hipotálamo, com conseqüente liberação de hormônio adrenocorticotrópico (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; STEPIEN; KOMOROWSKI, 1994); (3) atuando diretamente na adrenal, e desta forma aumentando a liberação de glicocorticóides (GWOSDOW et al., 1992).

Neste contexto, o eixo HHA é um dos mais importantes sistemas de integração dos organismos, sendo ativado em resposta a estresses ou distúrbios homeostáticos. Por conseguinte, o estresse crônico pode ser visto como um estado em que o eixo HHA é ativado por períodos prolongados, ocorrendo neste estado uma prolongada elevação nos níveis de glicocorticóides circulantes. Tal exposição prolongada a elevados níveis de glicocorticóides é prejudicial a alguns sistemas do corpo incluindo-se, aqui o sistema imune (MCEWEN, 1998; 2000 a, b).

Como salientado, há sólidas evidências comportamentais e bioquímicas, que suportam a hipótese de haver uma comunicação direta e bidirecional entre os sistemas neuroendócrino e imune. Desta forma, não é difícil supor que substâncias que atuem no SNC tenham a capacidade de influenciar as respostas imunes. Neste sentido, fármacos com ação no SNC, como, por exemplo, os benzodiazepínicos, carregam potencial para modificar a imunidade por alterar principalmente as atividades do eixo HHA (WEIZMAN et al., 1997; CASTRO; PALERMO-NETO 1989; DOMINGUES-JUNIOR et al., 2000; RIGHI et al., 1999; LAZZARINI et al., 2001;

2003; 2006) e/ou do sistema nervoso autônomo simpático, como também por agir diretamente em células imunes (RAMSEIER; LICHTENSTEIGER; SCHULUMPF, 1993; MASSOCO; PALERMO-NETO, 1999; 2003; MARINO et al., 2001; SILVA et al., 2003). Destes trabalhos destacamos aqueles que analisaram os efeitos do tratamento *in vivo* com anfetamina, registrando alterações de comportamento e/ou alterações endócrinas concomitantes com alterações de parâmetros relacionados à atividade do sistema imune. Ligeiro-Oliveira et al., (2004) mostraram em nossos laboratórios, que ratos sensibilizados com ovalbumina, uma proteína obtida da clara do ovo, tratados com anfetamina apresentaram uma diminuição na população de leucócitos no pulmão e no sangue periférico e um aumento no número de células na medula óssea, provavelmente via ativação do eixo HHA e conseqüente liberação de corticosterona. De fato, o pré-tratamento com metirapona, um fármaco inibidor da síntese de corticosterona, reverteu parcialmente os efeitos induzidos pela anfetamina na migração de células inflamatórias no modelo de inflamação alérgica pulmonar.

Neste sentido, resolvemos analisar algumas das ações, do N-metil-3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), uma droga do mesmo grupo da anfetamina e com maior relevância toxicológica e social sobre parâmetros comportamentais, neuroendócrinos e de atividade de neutrófilos em camundongos.

2.2 MDMA - ECSTASY

O abuso de drogas é um problema mundial de grande importância econômica e social. Nas últimas duas décadas, constatou-se a capacidade que inúmeras drogas de abuso, tais como cocaína, opióides, canabinóides e anfetaminas, têm de alterar muitos aspectos de funções do sistema imune, atuando diretamente e/ou indiretamente por via neuroimune (NUNES-IGLESIAS; CASTRO-BOLANO; LOSADA, 1996; KLEIN; FRIEDMAN; SPECTER, 1998; MELLON; BAYER, 1998; PELLEGRINO; BAYER, 1998; YU et al., 2002; FRIEDMAN; NEWTON; KLEIN, 2003). Numerosos estudos, usando vários modelos experimentais têm indicado que a imunossupressão causada por drogas de abuso pode resultar em diminuição da resistência às doenças (CABRAL; DOVE PETTIT, 1998; RISDAHL et al., 1998). Neste sentido, algumas investigações apontam as drogas de abuso como cofatores na suscetibilidade a infecções pelo vírus HIV ou por outros vírus (GAVRILIN; MATHES; PODELL, 2002).

O MDMA produzido sinteticamente a partir da metanfetamina, é classificado como uma anfetamina alucinógena. Este fármaco também é conhecido como *Ecstasy*, sendo ilicitamente vendido na forma de comprimidos, cápsulas ou pó (GREEN et al., 2003). Ele foi desenvolvido em 1914 pela Merck Pharmaceuticals, como um inibidor do apetite; no entanto, nunca foi usado para este propósito. De fato, sugeriu-se posteriormente, ter ele propriedades psicoativas, sendo capaz de conferir benefícios para alguns casos de psicoterapias, onde se mostrou capaz de melhorar a comunicação e a intimidade entre o paciente e o terapeuta (HEGADOREN; BAKER; BOURIN, 1999).

Em consequência de suas propriedades psicoativas, o *Ecstasy* tornou-se popular nos anos 80 como uma droga de uso recreacional particularmente em *raves*

e danceterias noturnas, alegando-se ser ele capaz de produzir uma elevação da auto-estima, da simpatia e de empatia, causando uma sensação de proximidade e intimidade dos usuários com as pessoas ao redor. A alta popularidade que ganhou o *Ecstasy* a partir desta época, vinculada ao potencial neurotóxico do análogo metilenodioxianfetamina (MDA), fez com que a fase de uso legal do *Ecstasy* tivesse um fim. Sendo assim, o MDMA foi classificado pela *Food and Drug Administration* (FDA), em 1985, como uma substância controlada da lista I – a saber: droga com alto potencial de abuso; sem benefício terapêutico/médico e cujo uso é inseguro mesmo sob supervisão médica (MCCLAIN; SAPIENZA, 1989).

O MDMA é um potente liberador e inibidor da recaptação pré-sináptica de neurotransmissores no SNC, dentre os quais, de serotonina, de dopamina e de noradrenalina (KOCH; GALLOWAY, 1997, KANKAANPAA et al., 1998, DE LA TORRE; FARRE, 2004). Ele atravessa a membrana do neurônio pré-sináptico promovendo um efluxo de noradrenalina, e principalmente de serotonina e de dopamina das vesículas para o citoplasma do neurônio, sendo estes neurotransmissores rapidamente liberados para o meio extracelular (HUETHER; ZHOU; RUTHER, 1997 a, b). Além disso, o MDMA inibe parcialmente a enzima monoamina oxidase (MAO) e também exerce ação direta sobre vários tipos de receptores, incluindo-se aqui, receptores serotoninérgicos 5-HT₂, muscarínicos M₁, adrenérgicos α ₂ e receptores de histamina H₁. Inibe, ainda, a enzima triptofano hidroxilase, reduzindo a síntese de serotonina (COLE; SUMNALL, 2003; GREEN et al., 2003). Esta complexa ação neuroquímica do MDMA no SNC resulta em propriedades psicoativas que têm sido estudadas em animais e humanos (CALLAWAY; WING; GEYER, 1990; LIECHTI; VOLLENWEIDER, 2001; COLE; SUMNALL, 2003).

O MDMA é metabolizado no fígado onde é desmetilado para 3,4-dihidroximetanfetamina (DHMA) pela enzima citocromo P450 2D6 (TUCKER et al., 1994), este metabólito por ser instável é novamente O-metilado para 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA) (EASTON et al., 2003). Uma porção menor do MDMA é, também, N-desmetilado via citocromo P450 1A2 e 2D6 para 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) (MAURER et al., 2000). Segundo, De La Torre; Farre (2004), a toxicidade aguda, em especial, a neurotoxicidade induzida pelo fármaco, difere entre as espécies animais por depender da disponibilidade dos metabólitos desta droga, em cada espécie animal e, também, dos parâmetros cinéticos e das enzimas que regulam suas formações. Neste sentido, estudos em camundongos mostraram que o MDMA é a principal forma química encontrada no plasma e no cérebro destes animais (DE LA TORRE; FARRE, 2004). Embora, o MDMA tenha sido observado em ratos e humanos após sua administração, os metabólitos DHMA e HMMA, estão também, presentes em altas concentrações no plasma de ambos (DE LA TORRE; FARRE, 2004).

O uso de MDMA pode causar alterações neuroquímicas, comportamentais e endócrinas, semelhantes àsquelas produzidas por exposição a um estresse agudo, sugerindo este fato, ser ele um estressor químico (PACIFICI et al., 2002). O eixo HHA é um dos mais importantes sistemas de integração do organismo, sendo ativado em resposta a estímulos estressores ambientais ou químicos ou a distúrbios homeostáticos (MC EWEN, 1998; 2000 a, b). Neste sentido, em nossos laboratórios Righi e Palermo-Neto (2003) constataram que a cialotrina, um praguicida do grupo dos piretróides, induz aumento dos níveis séricos de corticosterona e de ansiedade, semelhante ao que faz a picrotoxina, um clássico ansiogênico.

Evidências recentes demonstram 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 a locomoção e induziu estereotipia em ratos. Mostraram também, um aumento nos níveis plasmáticos de ACTH e de corticosterona, o que configurava ocorrência de uma ativação do eixo HHA após o uso da droga; segundo os autores, estes aumentos ocorriam de forma dose-dependente, e os efeitos observados podiam ser prevenidos pela imunoneutralização do CRH. Neste contexto, Ligeiro-Oliveira et al. (2004) constataram que ratos tratados com anfetamina apresentaram um aumento na atividade locomotora total, principalmente nas zonas externas e tigmotáticas do campo aberto, na primeira hora após o tratamento, mas não 12 horas após; este efeito foi coincidente com níveis aumentados de corticosterona sérica medida nos animais tratados, confirmando informações de que o tratamento com anfetamina induz não apenas alterações comportamentais indicativas de ansiedade e estresse, mas também que ativa o eixo HHA.

Sams-Dodd (1995) mostrou que administrações agudas e subcrônicas de anfetamina em doses muito baixas, 0,7-22,0 $\mu\text{mol/kg}$, produziram comportamento estereotipado e que doses superiores a 10,4 $\mu\text{mol/kg}$ não induziram qualquer efeito consistente sobre a interação social de ratos; porém, segundo o trabalho, todas as doses aumentaram a atividade locomotora dos animais.

Dawson et al. (1995) ao utilizarem modelos de análise experimental de ansiedade baseados em exploração animal como, por exemplo, o labirinto em cruz elevado, sugeriram que os efeitos de fármacos ansiolíticos e de fármacos ansiogênicos poderiam ser confundidos por mudanças induzidas pelo tratamento na

atividade locomotora dos animais. Segundo esses autores, o número total de entradas nos braços abertos seria uma medida pouco sensível dos níveis de ansiedade para fármacos que produzem mudanças na atividade locomotora. De fato, drogas psicoestimulantes como a anfetamina, em doses que aumentam a atividade locomotora podem até mesmo, apresentar um perfil ansiolítico no labirinto em cruz elevado, por aumentar a atividade locomotora dos animais nos braços abertos do aparelho. Neste contexto, o efeito estimulante interferiria com a escolha dos animais por braços abertos ou fechados.

Dados de literatura são contraditórios com relação aos efeitos comportamentais do MDMA em roedores. De fato, como o MDMA é um fármaco psicoestimulante, seus efeitos sobre parâmetros comportamentais indicativos de níveis de ansiedade podem ser confundidos com outros que produz e ligados, por exemplo, ao aumento da atividade motora e da sensibilidade tátil (ao toque).

Neste contexto, Navarro e Maldonado (1999) sugeriram que o MDMA apresentava atividade ansiogênica em camundongos após as doses de 5,0 e 20,0 mg/kg, uma vez que observaram, no teste de interação social, uma redução da duração de investigação social e um aumento de um tipo de exploração feita à distância; observaram, também, comportamentos como os de evitar/fugir e de defesa/submissão, sugerindo que os efeitos, por eles relatados, não eram consequência de aumento de imobilidade.

Em um estudo subsequente as doses 8,0 e 15,0 mg/kg de MDMA induziram em camundongos os mesmos comportamentos no teste de interação social, sendo esses efeitos semelhantes àqueles induzidos por FG 7142, um ligante de receptor benzodiazepínico com conhecida atividade ansiogênica (MALDONADO; NAVARRO, 2001). O perfil ansiogênico do MDMA também foi observado no teste da caixa de

claro/escuro, onde a administração aguda de MDMA nas doses de 8,0 e 15,0 mg/kg produziu redução significativa da atividade de levantar e de atravessar de um lado (claro) para o outro (escuro) da caixa, sem diminuição da mobilidade total. De qualquer forma, relatou-se que o tempo gasto no compartimento escuro da caixa não foi significativamente afetado pelo fármaco, podendo então, os efeitos observados serem atribuídos a propriedades “anti-exploratórias” do MDMA (MALDONADO; NAVARRO, 2000). Além disso, o tratamento agudo com MDMA na dose de 8,0 mg/kg assim como o tratamento subcrônico com as doses 1,0 e 8,0 mg/kg de MDMA induziram em camundongos um efeito ansiogênico, verificado por uma redução no tempo gasto na exploração dos braços abertos e por um aumento no número de entradas nos braços fechados e na área central do labirinto em cruz elevado (NAVARRO; MALDONADO, 2002).

Em contrapartida, o MDMA induziu efeitos ansiolíticos em camundongos tratados cronicamente com MDMA na dose de 15,0 mg/kg, fato evidenciado pelo aumento significativo no tempo gasto na exploração dos braços abertos bem como por uma redução marcante do tempo gasto pelos animais na exploração dos braços fechados do labirinto em cruz elevado (NAVARRO; MALDONADO, 2002). Neste contexto, em relação a animais controles, ratos tratados uma única vez com MDMA na dose 12,5 mg/kg apresentaram, após dois meses do tratamento, redução dos níveis de ansiedade medidos no campo aberto e no labirinto em cruz elevado. Segundo os autores esses efeitos ocorreram, provavelmente, devido a uma ação neurotóxica do MDMA (MECHAN et al., 2002).

Palenicek et al. (2005) observaram que a administração subcutânea de MDMA nas doses de 2,5; 5,0 e 10,0 mg/kg, em ratos machos e fêmeas, induziram aumento de locomoção na caixa moradia e no campo aberto, fato que ocorreu de

forma dose-dependente. Além disso, o MDMA aumentou a exploração da zona tigmotática apenas nas fêmeas observadas no campo aberto, uma resposta característica de animais com níveis de ansiedade aumentados. No entanto, diminuiu os níveis de ansiedade medidos no labirinto em cruz elevado em animais de ambos os sexos, como evidenciado por um maior tempo gasto nos braços abertos. Estes achados levaram os autores a concluir que as fêmeas de ratos eram mais sensíveis aos efeitos estimulantes e comportamentais do MDMA, que os machos. Entretanto, quer nos parecer que este estudo não avaliou os níveis de ansiedade, mas sim os efeitos estimulantes e a estereotipia induzida pelo fármaco.

Morley e McGregor (2000) usando diversos testes para análise experimental de ansiedade analisaram, em ratos, os efeitos da administração de MDMA nas doses 1,25; 2,5 e 5,0 mg/kg. Esses autores concluíram que o MDMA induz efeito ansiolítico na dose de 5,0 mg/kg no teste de vocalização ultrassônica, conduzidos com animais que foram submetidos a choque na pata, e no teste de interação social, sendo isto caracterizado, respectivamente, por uma diminuição no número de vocalizações e por um aumento dos níveis de interação social, assim como por uma diminuição da agressividade. Em contrapartida, o MDMA após todas as doses usadas induziu efeito ansiogênico nos testes de avaliação de risco (*emergence test*) e no labirinto em cruz elevado. Finalmente, observou-se que o MDMA no teste de exposição ao odor do gato teve efeito ansiolítico apenas após a dose de 5,0 mg/kg. Estes resultados indicaram que o MDMA apresentou tanto efeitos ansiogênicos como ansiolíticos dependendo a direção desses do tipo de teste, da dose de MDMA usada e da situação empregada no teste.

É importante mencionar que atividade locomotora não pode ser usada como sinônimo de exploração, visto que esta última é considerada como tendo uma

participação cognitiva, que envolve investigação e resposta a estímulos novos e inclui movimentos mais direcionados, como levantar, farejar, mexer as vibrissas, comportamento de mergulho de cabeça, entre outros (ARCHER, 1973; KELLEY, 1993).

Em humanos, o MDMA produziu relaxamento e estado de euforia que inclui liberdade emocional, aumento da empatia e diminuição da inibição. Além destes efeitos o MDMA, produziu, também, uma série de ações fisiológicas tais como hipertermia, efeitos simpatomiméticos agudos (aumento do ritmo cardíaco e da pressão arterial), ativação do eixo HHA e aumento dos níveis de ansiedade (GREEN et al., 2003). O uso de MDMA em humanos tem sido associado a uma série grande de efeitos nocivos, dentre os quais incluem-se arritmias cardíacas, hipertermia (acompanhada da necessidade de ingerir grandes quantidades de água), falência renal e hemorragia intracranial (HEGADOREN; BAKER; BOURIN, 1999; GREEN et al., 2003). 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; 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).

Além dos efeitos relatados acima, a diminuição na atividade da enzima triptofano-hidroxilase provocada pelo MDMA (MCKENNA; PEROUTKA, 1990), associada aos altos níveis de serotonina liberada e aos bloqueios da recaptação deste neurotransmissor, provoca um esgotamento intraneuronal de serotonina. Apesar disso, os efeitos neurotóxicos do MDMA estão relacionados ao

desenvolvimento de severas reduções dopaminérgicas, sendo as serotoninérgicas menos pronunciadas (RICAURTE et al., 2002)

Como foi citado, a exposição de animais ao MDMA e seus análogos ativa o eixo HHA (CONNOR, 2004) e, conseqüentemente altera alguns parâmetros do sistema imune (PACIFICI et al., 2002; CONNOR et al, 1998; 2004; LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2004). Estudos realizados por CONNOR et al., (1998), verificaram que a administração de 20 mg/Kg, i.p. de MDMA em ratos reduziu a proliferação de linfócitos e o número total de leucócitos circulantes estimulados *in vitro* por Con A; estas alterações foram acompanhadas por um significativo aumento da concentração de corticosterona no plasma. Em 2000, Connor et al., mostraram que a administração aguda de MDMA diminuiu significativamente a secreção de IL-1 β e de TNF- α induzida *in vivo* e *in vitro* com LPS, uma endotoxina da parede celular bacteriana. A administração de 10,0 mg/kg de MDMA em ratos também suprimiu o *burst* oxidativo de neutrófilos em resposta à fagocitose do zymozan opsonizado (informação pessoal)¹.

Neste sentido, o MDMA induz muitas alterações neuroquímicas, comportamentais e endócrinas como aquelas provocadas pela exposição aguda a um agente estressor. Sendo assim, o MDMA poderia ser pensado como sendo um estressor químico, e neste contexto seus efeitos sobre o sistema imune poderiam também ser resultantes da ativação do eixo HHA ou do sistema nervoso autônomo simpático (SNAS), entre outros sistemas. No entanto, não se pode descartar uma possível ação direta do fármaco em células do sistema imune. A análise dos efeitos

¹ CONNOR, T.J. Methylenodioxymethamphetamine (MDMA-ECSTASY) suppresses zymosan-induced oxidative burst in neutrophils. Mensagem recebida por vivi_ferraz@terra.com.br em 08 agosto, 2006.

neuroendócrinos, e em especial, sua repercussão sobre a atividade de neutrófilos, é objeto deste trabalho.

2.3 NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos correspondem a aproximadamente metade dos leucócitos circulantes em muitas espécies animais; são diferenciados de outros polimorfonucleares por apresentarem núcleos multilobulados e grânulos citoplasmáticos distintos. Estes incluem grânulos primários ou azurófilos, secundários ou específicos e grânulos terciários, os quais contêm enzimas, proteínas e glicosaminoglicanos que se acredita participem de muitas das funções desta célula (HELLEWELL; WILLIAMS, 1994).

Os neutrófilos, juntamente com os macrófagos, exercem um papel importante na defesa orgânica contra microorganismos, sendo que a migração desta célula dentro dos tecidos é considerada como crucial e de grande importância para a manutenção da homeostase (LEHRER et al., 1988), como evidenciado experimentalmente em animais “depletados” de neutrófilos circulantes que mostraram-se incapazes de combater bactérias gram-negativas presentes em seus pulmões (REHM; GROSS; PIERCE, 1980).

Os neutrófilos são atraídos quimiotaticamente por bactérias e corpos estranhos, expondo diversas integrinas presentes em sua membrana celular, que participam do processo de sua ativação; dentre estas, destacam-se os receptores CR3, LFA-1 e ICAM-1 que reconhecem outras moléculas e componentes de matrizes extracelulares, aumentando a capacidade de espreiamento e fagocitose destas células, passando estes a serem denominados de neutrófilos ativados (ADAMS; HAMILTON, 1984).

Neste estado de ativação, estas células estão envolvidas com a síntese e a liberação de citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α) que modulam, entre outros, os efeitos de

linfócitos T e B (LLOYD; OPPENHEIN, 1992) e a produção e liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio. Portanto, é possível concluir que os neutrófilos tenham duas funções relacionadas à resposta imune-inflamatória: uma função relacionada à liberação de citocinas imunomodulatórias e outra ligada à fagocitose.

É de amplo conhecimento que os neutrófilos produzem EROs como peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, ânion superóxido e o oxigênio *singlet* (PICK; MIZEL 1981; WEISS et al., 1981; BADWEY; TAUBER; KARNOVSKY, 1983). Estas EROs são produzidas *in vivo* durante o metabolismo de células aeróbicas e também são produtos de secreção de fagócitos ativados (ROOT et al., 1975; BADWEY; TAUBER; KARNOVSKY, 1983). Em ambos os casos, resultam de uma seqüência de reações bioquímicas de alto consumo de oxigênio conhecidas como *burst* oxidativo. Esse mecanismo é importante para a intensificação das atividades microbicida, ou como mediadores da inflamação e da lesão tecidual. Deste modo, o peróxido de hidrogênio é conhecido por ser o principal componente do aparato microbicida de fagócitos. Assim, a mensuração da liberação de peróxido de hidrogênio tem sido considerada como um relevante parâmetro de avaliação de ativação destas células (ROOT et al., 1975; NATHAN; ROOT, 1977).

O ânion superóxido produzido sob estímulo de neutrófilos é rapidamente convertido em peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (ALLEN, 1982), que contribuem para a atividade microbicida desta célula, seja dentro do fagolisossomo seja no meio extracelular. A quantidade de peróxido de hidrogênio produzida no fagolisossomo de neutrófilos não é suficiente para eliminar totalmente as bactérias e outros microrganismos. Contudo, a enzima mieloperoxidase (MPO) produzida nos grânulos azurofílicos quando combinada com o peróxido de hidrogênio gera

hipoclorito que apresenta uma atividade antimicrobiana mais eficaz. Assim, uma das técnicas mais utilizadas para análise de atividade neutrofílica é a mensuração da atividade da MPO, pois vários trabalhos já demonstraram que o sistema dependente dessa enzima é mais eficaz contra bactérias, fungos e parasitas do que aquele relacionado à ação dos radicais de oxigênio sozinho (ODA et al., 1995).

A literatura indica que estas espécies reativas de oxigênio têm participação nos processos de inflamação, morte celular e tecidual, transformação neoplásica, aterosclerose e envelhecimento (HAMMOND; HESS, 1985).

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

Com relação ao papel imunorregulatório dos neutrófilos, é possível relacionar esta atividade com a produção de IL-1 por estas células (TIKU; TIKU; SKOSEY, 1986; GOH et al., 1989; DINARELLO, 1991; LORD et al., 1991). A IL-1 possui inúmeras atividades biológicas, sendo produzida por polimorfonucleares (PMN) em duas formas, a IL-1 α e a IL-1 β (LORD et al., 1991). Neste sentido, durante o processo inflamatório, a IL-1 produzida por neutrófilos pode servir para inúmeras funções incluindo-se entre elas a estimulação da síntese e liberação de proteínas de fase aguda, o aumento da ativação de células T e B e a indução de outras citocinas regulatórias como IL-6, IL-8 e GM-CSF (fator estimulante de colônia granulócito macrófago) (DINARELLO, 1991).

Os neutrófilos circulantes também sintetizam e liberam outras citocinas imunoregulatórias tais como TNF- α (DUBRAVEC et al., 1990) e GM-CSF em

resposta à estimulação com LPS (LINDEMANN et al., 1989). A produção pelos neutrófilos de TNF- α e de IL-1 pode ter funções regulatórias, principalmente na formação do edema inflamatório, devido ao aumento da permeabilidade vascular induzido por essas citocinas (ABE et al., 1990).

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

A função dos macrófagos e neutrófilos é sabidamente regulada pela atividade do eixo HHA, tendo este fato recebido considerável atenção (ZWILLING et al., 1990; 1992; 1993; PORTELA et al., 2001; FONSECA; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2002; MORGULIS et al., 2004). O eixo HHA regula a função dos fagócitos através da produção de uma cascata de hormônios em resposta a uma variedade de estímulos, dentre os quais as situações estressantes, que resultam entre outros fatos em um aumento da produção de esteróides pelas adrenais. Esta resposta fisiológica ao estresse, no entanto, é mediada também pelo SNAS (ADER et al., 1991; STANKEVICIUS; 2004). De fato, a ativação do SNAS resulta na liberação de adrenalina pela medula da adrenal e de noradrenalina pelas terminações nervosas do SNAS em órgãos linfóides primários e secundários (AUTELITANO et al., 1989; PURCELL; GATTONE, 1992) alterando-se desta forma a capacidade funcional de macrófagos e neutrófilos, que apresentam receptores β -adrenérgicos (SANDERS; KAVELAARS, 2007).

Neste contexto, ao longo dos anos diversos autores vêm, padronizando novas técnicas e métodos, para elucidar a estrutura, função e sistemas envolvidos com a

atividade de fagócitos, levando em consideração a complexidade dos fenômenos acima descritos. De fato, técnicas que avaliam a fagocitose por citometria de fluxo trouxeram muitas vantagens, tornando possível discriminar as populações celulares com maior velocidade, aliando-se esse fato à necessidade de um menor número de células para os estudos.

Métodos de citometria de fluxo vêm sendo amplamente utilizados para estudar as atividades fagocíticas de macrófagos e neutrófilos em seres humanos (BASOE et al., 1983 a,b; ROTHE; VALET, 1988) e em animais (SAAD; HAGELTORN, 1985; JOHANNISSON et al., 1995; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2003). Além disto, a citometria de fluxo também permite a verificação da diferenciação e da proporção de células que fagocitaram, por exemplo, bactérias ou leveduras fluorescentes (JOHANNINSSON et al., 1995; SILVA et al., 2003; FONSECA et al., 2005; ALVES et al., 2006).

Os métodos citométricos também têm sido considerados convenientes para estudar o *burst* oxidativo celular quando comparados com outras técnicas bioquímicas, uma vez que eles permitem a diferenciação dos eventos oxidativos intra e extracelulares (BASOE et al., 1983b) e pode ser medido concomitantemente à fagocitose.

Em nossos laboratórios, a técnica de citometria de fluxo tem sido utilizada para avaliar o *burst* oxidativo de macrófagos peritoneais e de neutrófilos circulantes de eqüinos tratados *in vivo* com midazolam (MASSOCO; PALERMO-NETO, 2003) e também para avaliar o *burst* oxidativo e fagocitose por neutrófilos circulantes em ratos tratados com diazepam (SILVA et al., 2003).

Portanto, diante da importância e da atividade dos neutrófilos nas interações entre os sistemas nervoso e imune, e do envolvimento do MDMA com a atividade do

SNC e com a imunidade, pareceu-nos relevante abordar de forma mais aprofundada, aspectos neuroimunológicos do MDMA sobre a atividade de neutrófilos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da 3,4 metilenodioximetanfetamina (MDMA ou *Ecstasy*) sobre parâmetros comportamentais, neuroendócrinos e sobre a atividade de neutrófilos, buscando-se a existência de correlações neuroimunológicas entre eles.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Caracterizar os efeitos do MDMA através de metodologias comportamentais: campo aberto e labirinto em cruz elevado;

3.2.2 Caracterizar os efeitos do MDMA através de metodologias bioquímicas: medida dos níveis de corticosterona e dos níveis e *turnover* hipotalâmicos e estriatais de serotonina, dopamina e noradrenalina;

3.2.3 Caracterizar os efeitos *in vivo* do MDMA sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos, avaliada por citometria de fluxo;

3.2.4 Caracterizar os efeitos *in vivo* do MDMA, através de estudos hematológicos, de celularidade do baço e da medula óssea.

3.2.5 Caracterizar os efeitos *in vitro* do MDMA sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos, avaliada por citometria de fluxo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos adultos da linhagem BALB/c, com 8 a 10 semanas de idade, provenientes de proles obtidas no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ – USP). Os animais foram utilizados segundo as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório do Comitê de Ética da FMVZ – USP (Protocolo nº762/2005).

Antes do início dos experimentos, os camundongos foram alojados, por um período de 7 dias, em caixas de propileno (28 x 17 x 12cm) em número de 5 por caixa, para adaptação às condições do biotério experimental. Estas caixas foram devidamente acondicionadas em salas cuja temperatura ambiente (24 a 26°C) e umidade (65 a 70%) foram mantidas constantes por meio de aparelhos de ar condicionado central, com ventilação, exaustão e luminosidade controladas, obedecendo-se a um ciclo claro – escuro de 12 horas, com início da fase clara às 7:00 horas. Os animais foram alimentados com ração balanceada para roedores NUVILAB®. Ração e água foram fornecidas aos animais *ad libitum* durante todos os experimentos. Os experimentos descritos abaixo foram realizados após um período de adaptação de 7 dias.

4.2 FÁRMACO

MDMA – Foi extraído e purificado de comprimidos apreendidos pela Polícia Federal – DENARC, no laboratório de Análises Toxicológicas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF – USP), com grau de pureza de 99%. O MDMA foi diluído em solução salina (0,9%) e injetado por via intra-peritoneal (i.p.) uma vez ao dia, nas doses e tempos de latência específicos para cada experimento descrito abaixo. As doses e tempo de latência para observação foram embasados em dados de literatura².

4.3 CORANTES CELULARES

- ✓ Azul de TRIPAN (*Merck®*, Darmstadt, Germany) a 0,1 % - Utilizado para corar as células do baço e medula óssea.
- ✓ ROSENFELD (*Merck®*, Darmstadt, Germany) - Utilizado para corar as células coletadas do sangue periférico para contagem diferencial de leucócitos.

4.4 REAGENTES E SOLUÇÕES

- ✓ Diacetato 2'7'-Diclorofluoresceína (DCFH-DA/ Molecular Probes, Eugene, OR, USA) - empregado na citometria de fluxo. Este reagente foi mantido congelado (-20° C), e protegido da luz, sendo dissolvido em PBS no momento de uso;

² Todas as referências estão na Revisão de Literatura.

- ✓ EDTA (Sigma®, St Louis, MO, USA) - utilizado na técnica de fagocitose, na concentração de 3 mM, com o objetivo de interromper a reação após o período de incubação das amostras;
- ✓ Heparina (Liquemine®-Roche, São Paulo, SP, Brasil) – anticoagulante utilizado nas coletas de amostras de sangue;
- ✓ Iodeto de Propídio (PI) (Sigma®, St Louis, MO, USA) - utilizado na técnica de citometria de fluxo, responsável pela emissão de fluorescência vermelha captada pelo citômetro;
- ✓ Kit de corticosterona Coat-a-Count (DPC®, Los Angeles, CA, USA) - Kit de radioimunoensaio para dosagem de corticosterona;
- ✓ PBS (Phosphate-buffered saline, pH=7,2-7,4) - Solução utilizada nas técnicas de *burst* oxidativo e fagocitose;
- ✓ PBS glicosado - Solução utilizada na técnica de conjugação do *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) com iodeto de propídio;
- ✓ PMA - Miristato-acetato de forbol-(Calbiochem®, San Diego, CA, USA) - utilizado como estímulo para desencadear o *burst* oxidativo de neutrófilos.
- ✓ Solução de meio de cultura RPMI – 1641 (Gibco®, Grand Island, NY, USA) – utilizada na coleta do baço e da medula óssea do fêmur de camundongos;
- ✓ Solução de NaCl 0,9% - Soluções utilizadas na técnica de conjugação do *S. aureus* - **Cepa ATCC 25923** (DIFCO®, Detroit, MI, USA) - bactéria marcada com Iodeto de Propídio (Sigma, St Louis, MO, USA) utilizada para avaliar a atividade fagocítica de neutrófilos sangüíneos;

- ✓ Soluções de NaCl 0,2% e 1,6%- Soluções utilizadas com o objetivo de romper as hemácias presentes nas amostras analisadas no citômetro de fluxo.

4.5 REGISTRO COMPORTAMENTAL

Para registro e análise comportamental foi utilizado o aparelho Ethovision[®] (Noldus Information Technology[®], Leesburg, VA, USA) que consiste em um sistema de rastreamento em vídeo, análise do 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, monitor SVGA, teclado e mouse, além de cabos e conectores.

O sistema de observação indireta é constituído pela filmadora instalada no teto da sala de observação, conectada ao monitor e ao microcomputador, localizados fora da sala. Para interpretar as imagens observadas durante a realização dos testes comportamentais no campo aberto (CA) e no labirinto em cruz elevado (LCE) o *software* (EthoVison – Vídeo Tracking, Motion & Behavior Recognition System[®] - versão 1.90) fez virtualmente as divisões do campo aberto em 4 áreas concêntricas (central, intermediária e externa e tigmotáxica) e em braços abertos, braços fechados e área central no LCE. Este sistema digitalizou e analisou os comportamentos dos animais. A **figura 1** ilustra este sistema.

4.5.1 Medida da Atividade Geral no Campo Aberto

Em um ambiente novo os animais tendem a explorá-lo ou podem ficar imóveis, com a musculatura tensa, vigilantes e de prontidão. A atividade geral foi

avaliada no campo aberto; esse aparelho constitui em um bom teste para quantificação dos efeitos comportamentais do estresse e da ansiedade (BELZUNG; GRIEBEL, 2001).

Figura 1 - Etho Vision® - (Vídeo Tracking Motion & Behavior Recognition System Versão 1.90) - equipamento de rastreamento em vídeo, utilizado no procedimento experimental para análise de movimentos. As setas indicam: 1-Campo Aberto para camundongo, 2-Câmera filmadora acoplada ao computador, 3-Monitor de vídeo e 4-Imagem digitalizada representada em pixels. Adaptado de Alves, 2005.

O campo aberto usado é constituído de uma arena³ circular de madeira medindo 40,0 cm de diâmetro e parede de 25,0 cm de altura pintada na cor cinza grafite. O fundo circular da arena é dividido, virtualmente, por 4 círculos concêntricos em zonas⁴ central, média, externa e tigmotóxica⁵.

³ Arena: Área do aparelho em que o animal pode se locomover, dentro da qual o sistema rastreia o movimento.

⁴ Zonas: subdivisões da arena.

⁵ Tigmotaxia: termo referente ao comportamento do roedor de manter contato com objetos ou perímetros no ambiente, o que, no caso do campo aberto, significa explorar o ambiente junto à zona próxima às paredes, por essa razão denominada de zona tigmotóxica (TREIT; FUNDYTUS, 1988).

A atividade geral dos animais foi avaliada por meio de observação indireta através do sistema, ETHOVISION (VIDEO TRACKING MOTION & BEHAVIOR RECOGNITION SYSTEM® VERSÃO 1.90). Desta forma, a presença do observador não interferiu com os parâmetros observados, uma vez que este ficou fora da sala onde se encontravam os animais em teste. É importante ressaltar que a sala onde foi realizado o experimento era pouco iluminada e sem nenhum tipo de ruído. Ainda, os animais dos diferentes grupos foram intercalados entre si para evitar-se possíveis interferências do ritmo circadiano sobre os resultados. Os animais foram colocados no centro da arena e observados por 5 minutos. A avaliação da atividade geral foi feita sempre no mesmo período do dia (entre as 7:00 hs e 12:00 hs) e entre as observações o aparelho foi limpo com solução aquosa de etanol 5%, com a finalidade de evitar influência de odores.

Os parâmetros considerados indicativos da atividade geral no campo aberto foram os seguintes: 1) distância percorrida (cm): corresponde ao ato de o animal entrar com as quatro patas em uma das divisões (zonas) do piso da arena e se locomover; 2) 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; 3) número de movimentos iniciados: corresponde ao ato de o animal iniciar movimentos na arena; 4) tempo (s) em movimento: quanto tempo o animal se movimentou no interior das zonas do campo aberto; 5) velocidade média (cm/s): corresponde à distância percorrida pelo animal, por unidade de tempo; 6) número de *grooming* (auto-limpeza): ato de limpar qualquer parte da superfície corporal com língua, dentes e/ou patas dianteiras; 7) tempo de *grooming*: tempo gasto pelo animal na realização de *grooming*.

4.5.2 Avaliação do Comportamento no Labirinto em Cruz Elevado

O estudo dos níveis de ansiedade foi feito como aquele descrito para ratos por Pellow et al. (1985) e validado para camundongos por Lister (1987). Assim como o campo aberto, o labirinto em cruz elevado é outro teste freqüentemente utilizado em roedores para avaliação dos níveis de ansiedade. Trata-se de um labirinto em forma de cruz, feito de madeira e pintado de cinza, constituído por dois braços abertos medindo 30 cm de comprimento por 5 cm de largura cada um, em oposição a dois braços fechados de iguais medidas, mas com paredes laterais de 15 cm de altura. Na intersecção entre os braços abertos e fechados forma-se um espaço de 25 cm² de área, denominado centro. O aparelho é colocado sobre um suporte a 55 cm do chão. Segundo Barnett (1956; 1958), os roedores têm preferência natural por locais próximos às superfícies verticais, provavelmente por ficarem menos expostos aos predadores. Este comportamento faz parte do repertório defensivo natural dos roedores (GROSSEN; KELLEY, 1972). Assim, sabe-se que animais muito ansiosos preferem os braços fechados do aparelho, enquanto drogas ansiolíticas aumentam a exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado.

A avaliação do comportamento no labirinto em cruz elevado foi feita imediatamente após o fim do teste de campo aberto, colocando-se cada animal, individualmente, no centro do aparelho, com a cabeça voltada para um dos braços fechados. Resultados prévios deste laboratório e de outros tem apresentado que animais colocados no campo aberto ou no *hole-board*, imediatamente antes ao teste de labirinto em cruz elevado, apresentam uma melhor atividade exploratória no LCE, facilitando a análise dos dados (LISTER, 1987; FILE; BRILEY, 1991; PALERMONETO; GUIMARÃES, 2000). Foi considerada como “entrada” em um dos braços ou permanência nos braços ao 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 4.5.

Foram registrados os seguintes parâmetros: 1) número de entradas nos braços abertos (EA): corresponde ao ato de o animal entrar nos braços abertos com as quatro patas; 2) número de entradas nos braços fechados (EF): corresponde ao ato de o animal entrar nos braços fechados com as quatro patas; 3) tempo em movimento nos braços abertos (TA): corresponde ao tempo gasto em movimento neste braço em segundos; 4) tempo em movimento nos braços fechados (TF): corresponde ao tempo em movimento gasto neste braço em segundos; 5) velocidade média (cm/s): corresponde à distância percorrida pelo animal, por unidade de tempo; 6) distância percorrida (cm): corresponde ao ato de o animal entrar com as quatro patas em uma das divisões (zonas) do piso da arena e se locomover.

Para comparação dos níveis de ansiedade entre os grupos foram consideradas as seguintes taxas:

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

As observações foram realizadas sempre no mesmo período do dia (entre as 7:00 hs e 12:00 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.

4.6 CITÔMETRO DE FLUXO

Foi utilizado um citômetro de fluxo (FACScalibur Becton Dickinson Immunocytometry Sistem, San Jose, Ca, USA) conectado com um computador (Macintosh Apple, CA, USA). Foram analisados 10.000 eventos utilizando-se o

software Cell Quest Pro (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). A **figura 2** ilustra este equipamento.

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. A fluorescência verde do DCFH foi mensurada a 530 ± 30 nm (detector FL1) e fluorescência de cor vermelha do *S. aureus* marcado com o iodeto de propídeo mensurada a 585 ± 42 nm (detector FL2). A fluorescência verde emitida pelo DCFH foi usada para estimar o *burst* oxidativo das células analisadas em diferentes situações de estimulação. A fagocitose foi estimada pela intensidade média de fluorescência/célula emitida pelo PI. A porcentagem de fagocitose (porcentagem de neutrófilos que fagocitaram as bactérias) foi calculada através do número de neutrófilos fluorescentes divididos pelo número total destas células e multiplicado por 100. As fluorescências do PI e do DCFH foram analisadas utilizando-se compensação de fluorescências para corrigir quaisquer interferências de sinais emitidos pelos mesmos. Através do Cell Quest Pro® foram analisadas as populações de interesse (neutrófilos), excluindo-se as populações de linfócitos e monócitos, por meio da análise dos *gates*. Além disso, para todos os experimentos o aparelho foi calibrado com um tubo *branco* usado como controle de fluorescência basal da célula a ser analisada.

4.6.1 Medida da Atividade Celular

a) Obtenção de neutrófilos sanguíneos

As células utilizadas para o estudo no citômetro de fluxo foram coletadas imediatamente após a eutanásia dos animais, que foi feita por decaptação. O sangue foi coletado em *eppendorfs* de 1,5 mL contendo 10 μ L de heparina, sendo

colocadas imediatamente em banho de gelo. Foram usadas amostras sangüíneas de 100 µl para a análise do *burst* oxidativo e da atividade fagocítica.

Figura 2 - Citômetro de fluxo modelo FACScalibur da Becton Dickinson acoplado a um computador Macintosh (G4) da Apple utilizado no presente trabalho para avaliar a atividade de neutrófilos. As setas indicam: 1- Injeção da amostra, 2-Painel de controle do citômetro e 3-gráficos dos dados adquiridos. Adaptado de Alves, 2005.

b) Avaliação do *burst* oxidativo e da fagocitose por neutrófilos por citometria de fluxo

O preparo das amostras foi realizado de acordo com Hasui; Hirabayashi; Kobayashi, 1985, como descrito a seguir.

Após a eutanásia dos animais, o sangue foi individualmente coletado; uma bateria de 5 tubos foi, então, montada para cada animal sendo enumerada de “A” até “E”, como ilustra a **figura 3**.

Cada tubo (de acordo com a letra) recebeu uma substância diferente, obedecendo-se sempre a uma mesma ordem.

Desta forma, todos os tubos de “A” a “E” receberam alíquotas, que correspondem a 2×10^5 cel/100 μ l de sangue. Os tubos com as letras “B”, “D” e “E” receberam 200 μ l da solução de DCFH-DA 3 mM cada. Todos os tubos de letra “C” e “D” receberam 100 μ l da solução de SAPI (100ng). Os tubos de letra “E”, por sua vez, receberam 100 μ l de PMA (100ng). Como as amostras deveriam ter o volume final de 1100 μ l, todos os tubos foram completados com PBS 1x. Sendo assim, todos os tubos “A” receberam 1000 μ l de PBS, os tubos “B” 800 μ l, os “C” 900 μ l e finalmente os tubos “D” e “E” receberam 700 μ l.

Todas as soluções, reagentes e estímulos citados anteriormente foram preparados conforme descrito por Alves, 2005.

Figura 3 – Representação esquemática de seqüências de reagentes utilizados nas técnicas de burst oxidativo e fagocitose: Tubo A – PBS; Tubo B – DCFH; Tubo C – SAPI; Tubo D – DCFH + SAPI, Tubo E – DCFH + PMA. Adaptado de Costa, 2004.

Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria sob agitação a 37°C por 30 minutos. Depois da incubação, foram adicionados 2 ml de EDTA 3 mM nos

tubos “C” e “D” para interromper a reação de fagocitose, sendo os mesmos centrifugados posteriormente a 1932g (1200 rpm) por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante após a centrifugação; as células foram, então, ressuspensas por agitação manual, realizando-se, a seguir, a lise hipotônica das amostras com soluções de NaCl a 0,2% e 1,6%. Primeiramente, foi colocado em cada tubo 2 mL de solução de NaCl 0,2%, imediatamente após 20 segundos, colocou-se mais 2 mL de solução de NaCl 1,6% para tornar a solução isotônica novamente. Após centrifugação foi realizada uma nova lise hipotônica. Após a segunda lise, os tubos foram centrifugados novamente e os sobrenadantes desprezados; as células resultantes foram ressuspensas em 200 µL de PBS gelado.

Após completar o procedimento para obtenção das amostras, realizou-se a leitura destas no citômetro de fluxo; os tubos “C” e “D” foram utilizados para a avaliação da fagocitose, enquanto que os tubos “B” e “E” foram utilizados na avaliação do *burst* oxidativo. Cada amostra passou pelo citômetro apenas 1 vez, e de cada uma delas, foram adquiridos 10.000 eventos (células). A fluorescência foi obtida padronizando-se o número de eventos para cada tubo A, B, C, D e E. Os valores referentes ao *burst* oxidativo das amostras foram avaliados por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pela população de neutrófilos. O valor da média geométrica foi fornecido pelo software sendo utilizado para indicar a intensidade de fluorescência das células. Com relação à atividade fagocítica, verificou-se a porcentagem de fagocitose, ou seja, o número de neutrófilos que fagocitaram o *S. aureus* marcado com PI e, conseqüentemente que emitiam fluorescência vermelha, divididos pelo número total destas células multiplicadas por 100. Foi avaliada, também, a intensidade de fagocitose

(quantidade de bactérias fagocitadas) por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pelos neutrófilos.

4.7 DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA

4.7.1 Coleta de Sangue para Obtenção do Soro

Os animais foram submetidos à eutanásia, para a coleta de sangue e posterior obtenção do soro para a dosagem dos níveis séricos de corticosterona. Trata-se do glicocorticóide mais abundante na circulação de camundongos, sendo considerado como um ótimo indicador da função adrenocortical nesta espécie animal. O sangue foi coletado em *ependorfs* secos, após 60 minutos da administração de MDMA (10,0 mg/kg) e deixado à temperatura ambiente para a retração do coágulo. Então foi centrifugado sob refrigeração a 4025g (2500 rpm) por 20 minutos para obtenção do soro. Este soro foi armazenado em *ependorfs* de polietileno em freezer a -80°C até o momento da realização das dosagens hormonais. As amostras foram coletadas à mesma hora do dia (entre 08:00 e 09:00 hs) para minimizar os efeitos do ritmo circadiano sobre os níveis séricos de corticosterona.

4.7.2 Dosagem de Corticosterona

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

Nesta técnica de radioimunoensaio, há competição da corticosterona 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 1 mL 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 sendo a leitura da radioatividade remanescente desta reação feita no contador automático de radiação gama (Packard®). Os resultados finais das contagens por minutos foram expressos em ng/mL.

4.7.3 Curva Padrão

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

4.7.4 Soro Controle

Foi utilizado um soro controle (50µl) com concentração de 200ng/ml de corticosterona no início, meio e final do ensaio. Os seguintes parâmetros de validação foram registrados:

- ✓ Sensibilidade do método: 91,30%;
- ✓ Coeficiente de Variação Baixo: 4,16%;
- ✓ Coeficiente de Variação Alto: 0,17%;
- ✓ Limite de Detecção: 3,161 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 DOSAGENS NEUROQUÍMICAS

4.8.1 Coleta e Processamento dos Tecidos

Os animais foram submetidos à eutanásia, sendo os cérebros rapidamente retirados e lavados com solução salina gelada (4° C). Imediatamente após, foram dissecados sobre uma placa de petri rodeada por gelo seco, formando assim um microambiente o mais frio possível. O hipotálamo e o estriato do hemisfério esquerdo foram retirados, pesados e congelados a -80°C num tempo máximo de 3 minutos, onde permaneceram por no máximo 1 mês até a realização das dosagens.

Antes das dosagens os tecidos cerebrais foram homogeneizados por sonicação (caneta sonicadora), durante 2 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 das monoaminas a serem dosadas (COSTA; FRUSSA-FILHO; FELÍCIO, 2001).

Após a homogeneização, as amostras foram colocadas na geladeira onde permaneceram por uma noite. No dia seguinte foram centrifugadas a 16100g (10000 rpm) por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro *ependorf*, sendo em seguida congeladas as amostras a -80° C, aguardando a leitura no aparelho.

A dopamina (DA), seus metabólitos ácido homovanílico (HVA) e ácido diidroxifenilacético (DOPAC), a noradrenalina (NA) e seu metabólito ácido vanililmandélico (VMA), a serotonina (5HT) e o seu metabólito o ácido 5 hidrox-

indolacético (5HIAA) foram dosadas por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), com detector eletroquímico. Foram calculadas também as relações NOR/VMA e DOPAC/DA, HVA/DA, DOPAC+HVA/DA e de 5HT/5HIAA, consideradas como indicadores da taxa de renovação (*turnover*) de NOR, DA e de 5HT, respectivamente.

4.8.2 Dosagens Neuroquímicas

As dosagens das aminas cerebrais e de seus metabólitos foram realizadas por meio de HPLC a partir de método previamente descrito em nossos laboratórios (FELICIO et al., 1996). A **figura 4** mostra o equipamento citado.

Figura 4 - Sistema HPLC-ED (SHIMATZU modelo 6A) utilizado no presente para dosagens neuroquímicas. As setas indicam: 1- Injeção da amostra, 2-Visor do painel de controle e 3-Detector eletroquímico. Adaptado de Alves, 2005.

O sistema de HPLC-ED (SHIMATZU Modelo 6 A) usado, é composto por uma bomba, um amortecedor de impulsos, uma válvula injetora de 20µL, um detector eletroquímico, um forno de coluna para manutenção da temperatura, um registrador e um integrador (Modelo Chromatopac), todos marca SHIMATZU. A coluna cromatográfica utilizada foi a C-18 (SUPELCO) medindo 220 x 4,6 mm com filtro de linha.

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 de 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 colocada no HPLC. Após sua instalação no sistema cromatográfico, a fase móvel permaneceu por uma noite circulando em um sistema fechado, de modo tal a permitir a estabilização do aparelho, com fluxo constante de 1,2 mL/min. O detector eletroquímico foi mantido com potencial de +0,83 V no eletrodo de trabalho. A temperatura para amostragem no HPLC foi mantida em 25°C.

Os padrões com concentrações de 1 mM de NOR, VMA, DHBA, DA, DOPAC, HVA, 5HIAA e 5HT foram diluídos em ácido perclórico 0,1 M contendo 0,02% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, distribuídos em tubos *ependorf* de 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 0,1M.

As substâncias foram reconhecidas segundo seu tempo de retenção na coluna cromatográfica, através de comparação com os padrões de concentrações conhecidas. O tempo total de passagem de cada amostra foi de 15 min. O limite de detecção do aparelho foi de 1,0 ng/mL e o limite de quantificação de 10,0 ng/mL para os diferentes neurotransmissores quantificados.

Para todas as dosagens foram estabelecidas curvas de calibração tendo sido calculados os coeficientes de correlação linear (r^2) sendo considerados adequados valores r^2 superiores 0,9. Para o estabelecimento da precisão intra-ensaio do método cromatográfico foram calculados os coeficientes de variação (CV%) das 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 foram adicionadas concentrações de padrão interno, DHBA 14 ng/mL, e os valores obtidos foram utilizados para efetivação dos devidos ajustes nas medidas das concentrações de neurotransmissores. As micro-seringas, pipetas automáticas e vidrarias volumétricas usadas foram todas de boa procedência, tendo em vista a necessidade de precisão exigida para estas dosagens.

4.9 HEMOGRAMA

O hemograma foi constituído pelo eritrograma e pelo leucograma. Os animais foram anestesiados e a coleta de sangue 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.

4.10 AVALIAÇÃO DA CELULARIDADE DO BAÇO E MEDULA ÓSSEA

A celularidade do baço foi determinada após fricção destes órgãos por meio de RPMI-1640 a 4°C, com auxílio de lâminas de microscopia Perfecta[®]. A seguir, esta suspensão de células foi centrifugada a 1932g (1200 rpm) por 8 minutos, 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 (diluição 1:100), sendo a viabilidade celular das mesmas observadas pela coloração com azul de tripan, aceitando o mínimo 95% de viabilidade.

Para determinar a celularidade da medula óssea, foi utilizado o fêmur direito de cada animal. O conteúdo da medula óssea foi lavado com 5,0 mL de meio RPMI-1640 e a suspensão resultante foi acondicionada em tubos de polipropileno de 10,0 mL, dentro de banho de gelo. Imediatamente após, as células da medula óssea foram contadas, utilizando-se a técnica descrita por Raisuddin et al. (1990).

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 da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, para avaliação dos contrastes. Os resultados não paramétricos foram analisados pelo teste “U” de Mann-Whitney ou por Kruskal-Wallis com sua resolução própria. Foram consideradas significantes as análises com nível de significância menor ou igual $p < 0,05$.

Todas as análises estatísticas foram feitas com o auxílio de um programa estatístico denominado GRAPHPAD INSTAT em sua versão 3.01.

6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

6.1 EXPERIMENTO 1 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM DOSES CRESCENTES DE MDMA SOBRE O COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS OBSERVADOS NO CAMPO ABERTO E NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO 30 MINUTOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO.

Cinquenta e seis camundongos foram separados ao acaso em 7 grupos: um grupo controle (C) e seis grupos experimentais (E). O experimento foi realizado em dois dias consecutivos, no mesmo período do dia (entre as 7:00 hs e 12:00 hs), com 4 animais em cada grupo. Os animais dos grupos experimentais foram tratados pela via intraperitoneal com doses crescentes de MDMA, a saber: 0,2; 1,0; 5,0; 8,0; 10,0 e 20,0 mg/kg. Os animais do grupo controle receberam idêntico volume (0,1 mL/10g) de solução controle, isto é, de NaCl 0,9%, correspondente ao veículo do MDMA. Trinta minutos após as administrações, os animais foram colocados individualmente na arena do campo aberto para a medida da atividade geral conforme item 4.5.1. Após os 5 minutos de observação no campo aberto os animais foram retirados e colocados no labirinto em cruz elevado para avaliação dos níveis de ansiedade, durante 5 minutos conforme descrito no item 4.5.2. As doses de MDMA e o tempo de latência para as observações foram embasados em dados de literatura ⁶.

RESULTADOS

A **tabela 1** mostra os efeitos da administração aguda de MDMA sobre os parâmetros de locomoção total na arena e nas diferentes zonas (interna, média, externa e tigmotáxica) do campo aberto. Da análise estatística dos resultados verificou-se um aumento da locomoção total dos animais tratados com MDMA nas doses de 5,0 mg/kg, 8,0 mg/kg, 10,0 mg/kg e 20,0 mg/kg ($F(6,48)=49,80$; $p<0,0001$) em relação aos animais do grupo controle tratados com solução salina. E que este

⁶ Todas as referências estão na Revisão de Literatura.

aumento ocorreu principalmente nas zonas externa ($F(6,48)=30,53$; $p<0,0001$) e tigmotóxica ($F(6,48)=24,17$; $p<0,0001$). As **figuras 5, 6 e 7** ilustram esses dados.

Tabela 1 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a atividade locomotora de camundongos Balb/c observados no campo aberto. Os dados representam a média $\pm$ DP (desvio padrão).

Grupos ^B	Parâmetros ^A				
	LT	LZI	LZM	LZE	LZT
C	1858,01 $\pm$ 428,08	128,33 $\pm$ 50,56	414,19 $\pm$ 88,56	689,20 $\pm$ 202,26	600,39 $\pm$ 193,09
E1	1764,40 $\pm$ 274,22	179,21 $\pm$ 54,47	448,87 $\pm$ 123,89	701,01 $\pm$ 149,80	438,80 $\pm$ 92,90
E2	2179,55 $\pm$ 289,97	232,17 $\pm$ 57,41#	581,45 $\pm$ 133,74	736,85 $\pm$ 99,06	623,95 $\pm$ 135,05
E3	3640,45 $\pm$ 577,81#	154,76 $\pm$ 35,03	536,05 $\pm$ 125,17	1427,01 $\pm$ 410,75#	1661,73 $\pm$ 488,52#
E4	4171,30 $\pm$ 393,04#	134,72 $\pm$ 37,23	448,17 $\pm$ 150,18	1639,20 $\pm$ 260,30#	1818,37 $\pm$ 508,99#
E5	4837,84 $\pm$ 630,18#	132,18 $\pm$ 41,07	646,83 $\pm$ 186,11*	2009,77 $\pm$ 322,20#	1891,97 $\pm$ 534,21#
E6	4503,51 $\pm$ 796,33#	140,21 $\pm$ 22,50	607,79 $\pm$ 153,40	1988,90 $\pm$ 470,48#	1898,27 $\pm$ 419,92#

$p<0,001$ em relação ao grupo controle, * $p<0,05$ em relação ao grupo controle, dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações.

^ALT = locomoção total na arena, LZI = locomoção na zona interna, LZM = locomoção na zona média, LZE = locomoção na zona externa, LZT = locomoção na zona tigmotóxica.

^BC – controle, E1 – 0,2mg/kg, E2 – 1,0mg/kg, E3 – 5,0mg/kg, E4 – 8,0mg/kg, E5 – 10,0mg/kg, E6 – 20,0mg/kg. n=8 animais/grupo.

Figura 5 - Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a locomoção total de camundongos Balb/c no campo aberto. # $p<0,001$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo.

Figura 6 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a locomoção de camundongos Balb/c na zona externa do campo aberto. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n = 8$ animais/grupo.

Figura 7 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a locomoção de camundongos Balb/c na zona tigmotática do campo aberto. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n = 8$ animais/grupo.

A **tabela 2** mostra os efeitos da administração aguda de MDMA sobre os parâmetros de tempo em movimento na arena e nas diferentes zonas (interna, média, externa e tigmotática) do campo aberto. A análise estatística dos dados mostrou um aumento do tempo gasto em movimento na arena, nos animais tratados com MDMA nas doses de 5,0 mg/kg, 8,0 mg/kg, 10,0 mg/kg e 20,0 mg/kg ($F(6,48)=91,89$; $p<0,0001$) em relação aos animais do grupo controle tratado com solução salina. Mostrou, ainda, que este aumento ocorreu principalmente nas zonas externa ($F(6,48)=46,91$; $p<0,0001$) e tigmotática ($F(6,48)=57,85$; $p<0,0001$) do aparelho. As figuras **8, 9 e 10** ilustram esses dados.

Tabela 2 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre o tempo em movimento de camundongos Balb/c observados no campo aberto. Os dados representam a média $\pm$ DP (desvio padrão)

Grupos ^B	Parâmetros ^A				
	TM	TZI	TZM	TZE	TZT
C	89,44 $\pm$ 41,74	5,25 $\pm$ 4,74	18,18 $\pm$ 9,39	31,86 $\pm$ 14,50	35,89 $\pm$ 15,05
E1	81,99 $\pm$ 27,19	8,91 $\pm$ 5,86	20,05 $\pm$ 8,96	31,31 $\pm$ 9,97	23,51 $\pm$ 7,92
E2	124,28 $\pm$ 25,82	14,16 $\pm$ 7,29*	31,03 $\pm$ 6,96	42,54 $\pm$ 9,48	33,09 $\pm$ 9,30
E3	235,43 $\pm$ 26,99#	10,48 $\pm$ 4,62	33,04 $\pm$ 7,70*	84,98 $\pm$ 16,81#	112,82 $\pm$ 17,87#
E4	259,03 $\pm$ 11,35#	7,05 $\pm$ 2,68	30,02 $\pm$ 7,46	99,34 $\pm$ 19,34#	138,60 $\pm$ 23,46#
E5	268,56 $\pm$ 7,83#	8,34 $\pm$ 4,86	34,49 $\pm$ 11,66**	111,38 $\pm$ 15,42#	116,12 $\pm$ 24,47#
E6	262,39 $\pm$ 17,46#	7,50 $\pm$ 2,29	35,61 $\pm$ 8,80**	114,15 $\pm$ 17,46#	111,35 $\pm$ 18,14#

$p<0,001$ em relação ao grupo controle, * $p<0,05$ em relação ao grupo controle, ** $p<0,01$ em relação ao grupo controle dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações.

^ATM=tempo em movimento na arena, TZI=tempo em movimento na zona interna, TZM=tempo em movimento na zona média, TZE=tempo em movimento na zona externa, TZT=tempo em movimento na zona tigmotática.

^BC – controle, E1 – 0,2mg/kg, E2 – 1,0mg/kg, E3 – 5,0mg/kg, E4 – 8,0mg/kg, E5 – 10,0mg/kg, E6 – 20,0mg/kg. n=8 animais/grupo.

Figura 8 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre o tempo de locomoção de camundongos Balb/c no campo aberto. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n = 8$ animais/grupo.

Figura 9 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre o tempo de locomoção de camundongos Balb/c na zona externa do campo aberto. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n = 8$ animais/grupo.

Figura 10 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre o tempo de locomoção de camundongos Balb/c na zona tigmotática do campo aberto. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n = 8$ animais/grupo.

A **tabela 3** mostra que o número de ocorrências ($F(6,48) = 15,91$; $p < 0,0001$) e o tempo ($F(6,48) = 12,27$; $p < 0,0001$) de *grooming* (auto-limpeza) foram diminuídos, após MDMA nas doses 5,0mg/kg; 8,0mg/kg; 10,0mg/kg e 20mg/kg, assim como o número de ocorrências do comportamento de levantar ($F(6,48) = 23,87$; $p < 0,0001$) no campo aberto. Além disso, o número de movimentos iniciados apresentou-se diminuído ($F(6,48) = 9,52$; $p < 0,0001$) após as doses de 10,0mg/kg e 20,0mg/kg, e houve aumento da velocidade média ($F(6,48) = 44,72$; $p < 0,0001$) de locomoção dos animais tratados com doses superiores a 5,0 mg/kg. As **figuras 11 a 15** ilustram esses dados.

Tabela 3 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre o número e tempo de *grooming*, frequência de levantar, número de movimentos iniciados e velocidade média da locomoção de camundongos Balb/c observados no campo aberto. Os dados representam a média±DP (desvio padrão).

Grupos ^B	Parâmetros ^A				
	NG	TG	FL	MI	VM
C	10,88±5,36	10,63±6,64	25,88±11,62	48,25±16,53	6,20±1,43
E1	9,00±4,73	12,21±6,64	24,29±6,47	45,43±13,62	5,88±0,91
E2	7,38±4,98	8,87±6,34	30,38±8,62	59,63±8,02	7,27±0,97
E3	1,00±1,69#	1,07±1,84**	10,63±8,30**	44,25±13,57	12,65±2,52#
E4	0,0±0,0#	0,0±0,0#	3,95±1,80#	31,50±5,40	13,91±1,31#
E5	0,0±0,0#	0,0±0,0#	2,50±1,77#	26,38±5,48**	16,14±2,10#
E6	0,63±0,92#	1,01±1,80**	3,94±1,97#	28,34±10,67*	15,02±2,66#

#p<0,001 em relação ao grupo controle, *p<0,05 em relação ao grupo controle, **p< 0,01 em relação ao grupo controle dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações.

^ANG=número de ocorrências de *grooming*, TG=tempo gasto durante *grooming*, FL=frequência de levantar, MI=número de movimentos iniciados, VM=velocidade média da locomoção na arena.

^BC – controle, E1 – 0,2mg/kg, E2 – 1,0mg/kg, E3 – 5,0mg/kg, E4 – 8,0mg/kg, E5 – 10,0mg/kg, E6 – 20,0mg/kg. n=8 animais/grupo.

Figura 11 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre o número de grooming de camundongos Balb/c no campo aberto. #p<0,001 em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo.

Figura 12 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre o tempo de realização de *grooming* de camundongos Balb/c no campo aberto. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n = 8$ animais/grupo.

Figura 13 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a frequência do comportamento de levantar de camundongos Balb/c no campo aberto. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n = 8$ animais/grupo.

Figura 14 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre o número de movimentos iniciados de camundongos Balb/c no campo aberto. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n = 8$ animais/grupo.

Figura 15 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a velocidade média da locomoção de camundongos Balb/c no campo aberto. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n = 8$ animais/grupo.

A **tabela 4** mostra os efeitos da administração aguda de MDMA nas doses apresentadas anteriormente sobre os níveis de ansiedade e atividade de camundongos Balb/c, avaliados no labirinto em cruz elevado, 5 minutos após a exposição ao campo aberto. A análise dos dados mostrou que somente após a dose de 20,0 mg/kg de MDMA houve aumento da % EBA ($F(6,48)=4,19$; $p<0,001$), sendo essa dose de MDMA capaz de diminuir %EBF($F(6,48)=2,36$; $p=0,044$). As doses de 10,0 mg/kg e 20,0 mg/kg aumentaram a % TBA ($F(6,48)=35,16$; $p<0,0001$) e diminuíram a %TBF ($F(6,48)=109,49$; $p<0,0001$). Além disso, observou-se existência de uma diferença estatística significativa na soma do número de entradas nos braços abertos e fechados ($F(6,48)=7,34$; $p<0,0001$) para a dose de 10,0 mg/kg, que produziu aumento deste parâmetro. As figuras **16, 17 e 18** ilustram estes dados.

Tabela 4 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre número entradas e tempo gasto em movimento nos braços abertos e fechados de camundongos Balb/c no labirinto em cruz elevado. Os dados representam a média $\pm$ DP (desvio padrão)

Grupos ^B	Parâmetros ^A				
	%EBA	%TBA	%EBF	%TBF	TE
C	21,52 $\pm$ 8,49	0,51 $\pm$ 0,74	78,48 $\pm$ 8,49	98,37 $\pm$ 3,67	37,28 $\pm$ 7,45
E1	28,21 $\pm$ 6,10	0,39 $\pm$ 0,99	71,79 $\pm$ 6,10	99,61 $\pm$ 0,998	37,42 $\pm$ 4,39
E2	33,93 $\pm$ 7,87	2,87 $\pm$ 3,01	66,07 $\pm$ 7,87	97,13 $\pm$ 3,01	45,750 $\pm$ 6,11
E3	23,73 $\pm$ 10,28	6,92 $\pm$ 6,91	78,29 $\pm$ 12,15	93,08 $\pm$ 6,91	41,43 $\pm$ 10,74
E4	27,69 $\pm$ 9,05	13,19 $\pm$ 24,01	72,31 $\pm$ 9,05	94,01 $\pm$ 6,60	42,87 $\pm$ 13,56
E5	33,23 $\pm$ 11,19	27,83 $\pm$ 16,95**	70,36 $\pm$ 14,50	82,42 $\pm$ 9,87#	56,38 $\pm$ 8,30**
E6	45,86 $\pm$ 19,03**	74,84 $\pm$ 14,96#	70,36 $\pm$ 14,50*	31,96 $\pm$ 9,29#	30,00 $\pm$ 4,66

$p<0,001$ em relação ao grupo controle, * $p<0,05$ em relação ao grupo controle, ** $p<0,01$ em relação ao grupo controle dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações.

^AEBA=entrada nos braços abertos, TBA=tempo em movimento nos braços abertos, EBF=entrada nos braços fechados, TBF=tempo em movimento nos braços fechados, TE=total de entradas nos braços abertos e fechados.

^BC – controle, E1 – 0,2mg/kg, E2 – 1,0mg/kg, E3 – 5,0mg/kg, E4 – 8,0mg/kg, E5 – 10,0mg/kg, E6 – 20,0mg/kg. n=8 animais/grupo.

Figura 16 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a % de entradas e % de tempo gasto em movimento de camundongos Balb/c nos braços abertos do LCE. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, ** $p < 0,01$ em relação ao controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n = 8$ animais/grupo.

Figura 17 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a % de entradas e % de tempo gasto em movimento de camundongos Balb/c nos braços fechados do LCE. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, * $p < 0,05$ em relação ao controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n = 8$ animais/grupo.

Figura 18 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre o número total de entradas de camundongos Balb/c nos braços abertos e fechados do LCE.** $p < 0,01$ em relação ao controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n=8$ animais/grupo.

Os dados da **tabela 5** referem-se à locomoção total, tempo de locomoção e velocidade média da locomoção de camundongos Balb/c observados no labirinto em cruz elevado, após tratamentos com as diferentes doses de MDMA em relação aos animais controle tratados com solução salina. A análise estatística destes dados mostrou aumento significativo da locomoção total ($F(6,48)=18,86$; $p < 0,0001$), tempo de locomoção ($F(6,48)=24,41$; $p < 0,0001$) e velocidade média ($F(6,48)=18,86$; $p < 0,0001$) a partir da dose de 5,0mg/kg. As **figuras 19, 20 e 21** ilustram esses dados.

Tabela 5 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre locomoção total, tempo de locomoção e velocidade média da locomoção de camundongos Balb/c observados no labirinto em cruz elevado. Os dados representam a média±DP (desvio padrão)

Grupos ^B	Parâmetros ^A		
	LT	TLT	VM
C	1370,07±214,48	56,26±11,43	4,57±0,72
E1	1213,49±134,03	45,78±7,24	4,05±0,45
E2	1275,08±210,04	42,56±13,17	4,25±0,70
E3	1750,76±394,90*	82,33±23,38*	5,84±1,32*
E4	1800,38±215,07*	82,46±21,84*	6,005±0,72*
E5	2126,54±249,07#	101,57±16,74#	7,09±0,83#
E6	2081,40±224,77#	115,29±11,64#	6,94±0,75#

#p<0,001 em relação ao grupo controle, *p<0,05 em relação ao grupo controle dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações.

^ALT=locomoção total na arena, TLT=tempo de locomoção total na arena, VM=velocidade média da locomoção na arena.

^BC – controle, E1 – 0,2mg/kg, E2 – 1,0mg/kg, E3 – 5,0mg/kg, E4 – 8,0mg/kg, E5 – 10,0mg/kg, E6 – 20,0mg/kg. n=8 animais/grupo.

Figura 19 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a locomoção total de camundongos Balb/c no LCE. #p<0,001 em relação ao grupo controle, *p<0,05 em relação ao controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo.

Figura 20 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre o tempo de locomoção de camundongos Balb/c no LCE. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, * $p < 0,05$ em relação ao controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n = 8$ animais/grupo.

Figura 21 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a velocidade média da locomoção de camundongos Balb/c no LCE. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n = 8$ animais/grupo.

6.2 EXPERIMENTO 2 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 10,0 mg/Kg DE MDMA SOBRE O COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS OBSERVADOS NO CAMPO ABERTO E NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO, 60 MINUTOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO.

Vinte e dois camundongos foram separados ao acaso em 2 grupos: um grupo controle (C) e um grupo experimental (E). O experimento foi realizado entre 7:00 hs e 12:00 hs, com 11 animais em cada grupo. Os animais do grupo experimental foram tratados pela via intraperitoneal (ip) com a dose de 10,0 mg/kg de MDMA. Os animais do grupo controle receberam idêntico volume (0,1 mL/10g) de solução salina 0,9%, correspondente ao veículo do MDMA. Sessenta minutos após as administrações, os animais foram colocados individualmente na arena do campo aberto para a medida da atividade geral conforme item 4.5.1. Após os 5 minutos de observação no campo aberto os animais foram retirados e colocados no labirinto em cruz elevado para avaliação dos níveis de ansiedade, durante 5 minutos conforme descrito no item 4.5.2. A dose de MDMA e o tempo de latência para as observações foram embasados em dados de literatura ⁷ e em experimentos realizados anteriormente.

RESULTADOS

A **tabela 6** mostra os efeitos da administração aguda de MDMA sobre os parâmetros de locomoção total na arena e nas diferentes zonas (interna, média, externa e tigmotática) do campo aberto. Da análise estatística dos resultados verificou-se um aumento da locomoção total dos animais tratados com MDMA na dose 10,0 mg/kg ($p < 0,0001$) em relação aos animais do grupo controle tratados com solução salina, este aumento ocorreu principalmente nas zonas média ($p < 0,0001$) e externa ($p < 0,0001$) do aparelho. A **figura 22** ilustra esses dados.

⁷ Todas as referências estão na Revisão de Literatura.

Tabela 6 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0mg/kg) sobre a atividade locomotora de camundongos Balb/c observados no campo aberto. Os dados representam a média±DP (desvio padrão)

Parâmetros ^A	Grupos	
	Controle	E2
LT	2205,23±361,40	3774,34±252,55*
LZI	247,56±53,90	213,61±67,86
LZM	521,79±106,64	1005,17±255,70*
LZE	832,41±126,59	2124,91±187,80*
LZT	577,26±156,91	563,22±249,25

*p<0,0001 em relação ao grupo controle, dentro do mesmo parâmetro, teste “t” de Student. n=11 animais/grupo

^ALT = locomoção total na arena, LZI = locomoção na zona interna, LZM = locomoção na zona média, LZE = locomoção na zona externa, LZT = locomoção na zona tigmotática.

Figura 22 - Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0mg/kg) sobre a locomoção de camundongos Balb/c no campo aberto. *p<0,0001 em relação ao grupo controle, teste “t” de Student. n=11 animais/grupo.

A **tabela 7** mostra os efeitos da administração aguda de MDMA sobre os parâmetros de tempo em movimento na arena e nas diferentes zonas (interna, média, externa e tigmotática) do campo aberto. A análise estatística dos dados mostrou um aumento do tempo gasto em movimento na arena, nos animais tratados

com 10,0 mg/kg de MDMA ($p<0,0001$) em relação aos animais do grupo controle tratados com solução salina 0,9%. Mostrou, ainda, que este aumento ocorreu principalmente nas zonas média ($p<0,0001$) e externa ($p<0,0001$) do aparelho. A **figura 23** ilustra esses dados.

Tabela 7– Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0mg/kg) sobre o tempo de locomoção de camundongos Balb/c observados no campo aberto. Os dados representam a média $\pm$ DP (desvio padrão)

Parâmetros ^A	Grupos	
	Controle	Experimental
TM	122,820 $\pm$ 34,800	244,930 $\pm$ 16,830*
TZI	14,350 $\pm$ 4,220	12,760 $\pm$ 3,000
TZM	29,820 $\pm$ 7,570	57,520 $\pm$ 15,420*
TZE	47,490 $\pm$ 12,500	138,300 $\pm$ 20,490*
TZT	36,160 $\pm$ 14,470	36,750 $\pm$ 24,440

* $p<0,0001$ em relação ao grupo controle, dentro do mesmo parâmetro, teste “t” de Student. n=11 animais/grupo

^ATM=tempo em movimento na arena, TZI=tempo em movimento na zona interna, TZM=tempo em movimento na zona média, TZE=tempo em movimento na zona externa, TZT=tempo em movimento na zona tigmotática.

Figura 23 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0mg/kg) sobre o tempo de locomoção de camundongos Balb/c no campo aberto. * $p<0,0001$ em relação ao grupo controle, teste “t” de Student. n=11 animais/grupo.

A **tabela 8** mostra diminuição do número de ocorrências de *grooming* ($p<0,0001$) e do comportamento de levantar no campo aberto ($p<0,0001$) após 10,0 mg/kg de MDMA. Além disso, o número de movimentos iniciados apresentou-se diminuído ($p<0,0001$), e houve aumento da velocidade média ($p<0,0001$) de locomoção dos animais tratados com MDMA. A **figuras 24 e 25** ilustram esses dados.

Tabela 8 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre o número de *grooming*, frequência de levantar, número de movimentos iniciados e velocidade média da locomoção de camundongos Balb/c observados no campo aberto. Os dados representam a média $\pm$ DP (desvio padrão)

Parâmetros ^A	Grupos	
	Controle	Experimental
NG	4,540 $\pm$ 3,410	0,090 $\pm$ 0,300*
FL	40,10 $\pm$ 16,230	1,50 $\pm$ 1,850*
MI	60,3000 $\pm$ 10,6000	38,6000 $\pm$ 5,5700*
VM	7,350 $\pm$ 1,200	13,130 $\pm$ 1,530*

* $p<0,0001$ em relação ao grupo controle, dentro do mesmo parâmetro, teste “t” de Student. n=11 animais/grupo

^ANG=número de ocorrências de *grooming*, FL=Frequência de levantar, MI=número de movimentos iniciados, VM=velocidade média da locomoção na arena.

Figura 24 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0mg/kg) sobre o número de ocorrências de *grooming* e número do comportamento de levantar de camundongos Balb/c no campo aberto. * $p<0,0001$ em relação ao grupo controle, teste “t” de Student. n=11 animais/grupo.

Figura 25 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0mg/kg) sobre o número de movimentos iniciados e velocidade média de camundongos Balb/c no campo aberto. * $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle, teste “t” de Student. $n = 11$ animais/grupo.

A **tabela 9** mostra os efeitos da administração aguda de 10,0 mg/kg de MDMA sobre os níveis de ansiedade e atividade de camundongos, avaliados no LCE, 5 minutos após a exposição ao campo aberto. A análise dos dados mostrou que após o MDMA não houve diferença estatística na % EBA e % EBF. No entanto, houve aumento da % TBA ($p < 0,0001$) e diminuição acentuada da % TBF ($p < 0,0001$). Além disso, os dados demonstram uma diferença estatística significativa na soma do número de entradas nos braços abertos e fechados ($p < 0,0001$) na dose de 10,0 mg/kg após 60 minutos da administração, que produziu diminuição deste parâmetro. As **figuras 26, 27 e 28** ilustram estes dados.

Tabela 9 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre porcentagem de entradas e porcentagem de tempo gasto em movimento nos braços abertos e fechados de camundongos Balb/c no labirinto em cruz elevado. Os dados representam a média±DP (desvio padrão)

Parâmetros ^A	Grupos	
	Controle	Experimental
%EBA	29,560±8,530	38,040±12,370
%TBA	2,9800±4,3700	90,8900±8,5000*
%EBF	70,430±8,500	63,910±17,330
%TBF	96,6800±4,4500	6,4600±4,2300*
TE	38,300±5,530	14,500±9,410*

*p<0,0001 em relação ao grupo controle, dentro do mesmo parâmetro, teste “t” de Student. n=9 animais/grupo

^AEBA=entrada nos braços abertos, TBA=tempo em movimento nos braços abertos, EBF=entrada nos braços fechados, TBF=tempo em movimento nos braços fechados, TE=total de entradas nos braços abertos e fechados.

Figura 26 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0mg/kg) sobre a % de entradas (%EBA) e % de tempo gasto em movimento nos braços abertos (%TBA) de camundongos Balb/c no LCE. p<0,0001, teste “t” de Student.n=9 animais/grupo.

Figura 27 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0mg/kg) sobre a % de entradas (%EBF) e % de tempo gasto em movimento nos braços fechados (%TBF) de camundongos Balb/c no LCE. * $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle; teste “t” de Student. $n = 9$ animais/grupo.

Figura 28 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0mg/kg) sobre o número total de entradas nos braços abertos e fechados de camundongos Balb/c no LCE. * $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle; teste “t” de Student. $n = 9$ animais/grupo.

Os dados da **tabela 10** referem-se à locomoção total e em diferentes zonas (central, braços abertos e braços fechados) do LCE de camundongos Balb/c, após tratamento com 10,0 mg/kg de MDMA em relação aos animais controle tratados com solução salina. A análise estatística destes dados mostrou aumento significativo da

locomoção total ($p<0,0001$), principalmente nos braços abertos do LCE. A **figura 29** ilustra esses dados.

Tabela 10 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre locomoção total e em diferentes zonas do labirinto em cruz elevado em camundongos Balb/c. Os dados representam a média $\pm$ DP (desvio padrão)

Parâmetros ^A	Grupos	
	Controle	Experimental
LT	1316,3300 $\pm$ 168,0700	1805,6800 $\pm$ 233,1000*
LBA	108,9200 $\pm$ 135,4100	1408,3400 $\pm$ 552,9500*
LBF	825,3500 $\pm$ 184,6500	301,3100 $\pm$ 406,5900#
LZC	347,9000 $\pm$ 62,2900	96,0200 $\pm$ 112,7600*

* $p<0,0001$ em relação ao grupo controle, # $p<0,0018$ em relação ao grupo controle, dentro do mesmo parâmetro, teste “t” de Student. n=9 animais/grupo

^ALT=locomção total na arena, LBA= locomoção nos braços abertos, LBF=locomção nos braços fechados, LZC=locomção na zona central do LCE.

Figura 29 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0mg/kg) em camundongos Balb/c sobre a locomoção total e em diferentes zonas do LCE. * $p<0,0001$ em relação ao grupo controle, # $p<0,0018$ em relação ao grupo controle; teste “t” de Student. n=9 animais/grupo.

Os dados da **tabela 11** mostram o tempo de locomoção, frequência do comportamento de levantar e velocidade média da locomoção de camundongos Balb/c observados no labirinto em cruz elevado, após tratamento com MDMA em relação aos animais controle tratados com solução salina. A análise estatística destes dados mostrou aumento significativo do tempo de locomoção ($p<0,0001$) e velocidade média ($p<0,0001$) destes animais. Mostrou, também, uma diminuição da frequência do comportamento de levantar. As **figuras 30 e 31** ilustram esses dados.

Tabela 11 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre tempo de locomoção, frequência do comportamento de levantar e velocidade média da locomoção de camundongos Balb/c observados no labirinto em cruz elevado. Os dados representam a média $\pm$ DP (desvio padrão)

Parâmetros ^A	Grupos	
	Controle	Experimental
TLT	44,530 $\pm$ 9,710	84,860 $\pm$ 16,040*
FL	22,4000 $\pm$ 3,9700	12,7000 $\pm$ 6,0100*
VM	4,27 $\pm$ 0,660	6,02 $\pm$ 0,770*

* $p<0,0001$ em relação ao grupo controle, dentro do mesmo parâmetro, teste “t” de Student. n=9 animais/grupo

^ATLT=tempo de locomoção total na arena, FL=frequência do comportamento de levantar, VM=velocidade média da locomoção na arena.

Figura 30 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0mg/kg) sobre o tempo total em movimento e a frequência do comportamento de levantar de camundongos Balb/c no LCE. * $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle; teste “t” de Student. $n = 9$ animais/grupo.

Figura 31 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0mg/kg) sobre a velocidade média de camundongos Balb/c no LCE. * $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle; teste “t” de Student. $n = 9$ animais/grupo.

6.3 EXPERIMENTO 3 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM DOSES CRESCENTES DE MDMA SOBRE A ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS SANGÜÍNEOS DE CAMUNDONGOS MEDIDA 30 MINUTOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO

Setenta camundongos foram separados ao acaso em 7 grupos: um grupo controle (C) e seis grupos experimentais (E). O experimento foi realizado em dois dias consecutivos e a coleta de sangue ocorreu no mesmo período do dia (entre 8:00 hs e 9:30 hs), com 5 animais em cada grupo. Os animais dos grupos experimentais foram tratados pela via intraperitoneal (ip) com doses crescentes de MDMA, a saber: 0,2; 1,0; 5,0; 8,0; 10,0 e 20,0 mg/kg. Os animais do grupo controle receberam idêntico volume (0,1 mL/10g) de solução salina 0,9%, correspondente ao veículo do MDMA. Trinta minutos após as administrações, o sangue foi coletado como descrito no item 4.6.1a) para a mensuração da fagocitose e do *burst* oxidativo basal e induzido por *S. aureus* e PMA, ambos realizados por neutrófilos e avaliados por citometria de fluxo conforme técnica descrita no item 4.6.1b). As doses de MDMA e o tempo de latência para as observações foram embasados em dados de literatura ⁸.

RESULTADOS

Os citogramas que ilustram os dados relativos ao SSC vs FSC de leucócitos do sangue de camundongos são apresentados a seguir (figuras 32A, 33A, 34 e 36A) bem como os histogramas que ilustram a fluorescência destas células frente aos diferentes estímulos utilizados (figuras 32B, 33B, 35 e 36B). Citogramas e histogramas semelhantes foram utilizados para a análise individual das populações celulares de neutrófilos do sangue periférico dos animais controles e experimentais. Estas populações foram identificadas ao microscópio óptico após uma separação

⁸ Todas as referências estão na Revisão de Literatura.

mecânica realizada pelo FACSCALIBUR e a devida coloração pelo Giemsa. Cada população celular teve uma pureza de aproximadamente 98%; na figura 32A a população R1 corresponde aos linfócitos, R2 aos monócitos e R3 aos neutrófilos. Todo o procedimento de separação por *sorting* e a identificação das diferentes populações celulares foi realizado e padronizado em nossos laboratórios por Massoco e Palermo-Neto (2003). Desta forma, os citogramas observados nas figuras 32A à 36A correspondem ao *burst* oxidativo e à fagocitose destas populações celulares frente aos estímulos utilizados, ou seja, DCFH, *S. aureus* e PMA, respectivamente. As figuras 32B à 36B correspondem aos histogramas de fluorescência das populações de neutrófilos obtidas também frente aos mesmos estímulos. A figura 35, especificamente, ilustra os histogramas relacionados à análise da fagocitose (porcentagem e intensidade). Desta forma, a figura 35-1 representa o histograma do controle negativo, isto é apenas dos neutrófilos em PBS, verificando-se, assim, ausência de fluorescência emitida pelas células no eixo das abcissas acima de 10^1 , o que foi considerado como limite da técnica de citometria usada (M1). Na figura 35-2 observa-se a porcentagem de neutrófilos que realizam fagocitose empregando-se o mesmo limite (M1); especificamente, a fluorescência observada acima de 10^1 corresponde a neutrófilos que realizam fagocitose. Na figura 35-2 está representada a intensidade de fluorescência emitida pelos neutrófilos que fagocitaram a *S. aureus*.

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

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

seja, as populações celulares distintas, suas diferentes respostas e, conseqüentemente, as diferentes intensidades de fluorescência emitidas pelas células provenientes de animais dos diferentes grupos experimentais e controle frente aos diferentes estímulos; sendo todos os dados colhidos neste trabalho obtidos a partir das análises feitas desta forma pelo citômetro de fluxo.

Figura 32 - Citograma dos leucócitos (A) e Histograma (B) dos neutrófilos após a incubação com DCFH de animais do grupo controle R1=linfócitos; R2=monócitos; R3=neutrófilos.

Figura 33 - Citograma dos leucócitos (A) e Histograma (B) dos neutrófilos incubados com *S.aureus* realizando fagocitose R1=linfócitos; R2=monócitos; R3=neutrófilos.

Figura 34 - Citogramas de leucócitos circulantes de camundongos incubados com PBS (TUBO A) e citograma de leucócitos circulantes de camundongos incubados com *S.aureus* realizando fagocitose (TUBO C) em animais do grupo controle.

(1)

(2)

Figura 35 - Histograma de neutrófilos de animais do grupo controle: (1) Histograma de células controle incubadas apenas com PBS; (2) Histograma da porcentagem de neutrófilos incubados com *S.aureus* realizando fagocitose.

(A)

(B)

Figura 36 - Citograma dos leucócitos (A) e Histograma (B) dos neutrófilos após a incubação com o PMA de animais do grupo controle R1=linfócitos; R2=monócitos; R3=neutrófilos.

A **tabela 12** mostra os efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre o *burst* oxidativo e fagocitose por neutrófilos sanguíneos, medidos 30 minutos após essa administração. A análise estatística dos dados mostrou que as doses de 8,0; 10,0 e 20,0 mg/kg do MDMA diminuíram ($F(6,63)=8,758$; $p=0,0013$) o *burst* oxidativo induzido por SAPI, porém não alteraram os demais parâmetros (*burst* basal e induzido por PMA, intensidade e porcentagem de fagocitose) em relação aos animais do grupo controle. As **figuras 37 e 38** ilustram esses resultados.

Tabela 12 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos em camundongos Balb/c, 30 minutos após a administração. Os dados representam a média $\pm$ DP (desvio padrão)

Parâmetros ^B	Grupos ^A						
	C	E1	E2	E3	E4	E5	E6
Burst Basal	19,49 $\pm$ 4,10	23,39 $\pm$ 8,77	22,79 $\pm$ 5,61	24,05 $\pm$ 8,99	20,11 $\pm$ 5,97	20,69 $\pm$ 4,50	25,15 $\pm$ 7,47
Burst SAPI	139,36 $\pm$ 29,23	105,02 $\pm$ 18,36	114,27 $\pm$ 43,89	106,73 $\pm$ 31,35	68,44 $\pm$ 14,18#	79,59 $\pm$ 10,82#	76,23 $\pm$ 24,95#
Burst PMA	40,47 $\pm$ 11,37	38,10 $\pm$ 11,73	47,90 $\pm$ 9,57	43,08 $\pm$ 7,91	38,03 $\pm$ 10,61	39,92 $\pm$ 7,09	36,17 $\pm$,28
% Fagocitose	94,49 $\pm$ 5,08	96,20 $\pm$ 2,20	95,49 $\pm$ 3,31	92,25 $\pm$ 4,64	92,25 $\pm$ 4,64	91,70 $\pm$ 4,73	91,66 $\pm$ 6,16
Int. Fagocitose	40,47 $\pm$ 11,37	38,10 $\pm$ 11,73	47,90 $\pm$ 9,57	43,08 $\pm$ 7,91	38,03 $\pm$ 10,61	39,92 $\pm$ 7,09	36,17 $\pm$ 9,28

Os dados representam a intensidade média de fluorescência (média $\pm$ desvio padrão), correspondente ao *gate* da população de neutrófilos sanguíneos. # $p<0,001$ em relação ao grupo controle, dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=10 animais/grupo.

^A C – controle, E1 – 0,2mg/kg, E2 – 1,0mg/kg, E3 – 5,0mg/kg, E4 – 8,0mg/kg, E5 – 10,0mg/kg, E6 – 20,0mg/kg.

^B **Porcentagem de Fagocitose:** porcentagem de neutrófilos que fagocitaram partículas de SAPI. **Intensidade de Fagocitose:** quantas bactérias foram fagocitadas pela população de neutrófilos. Expresso pela média geométrica da intensidade de fluorescência da população de neutrófilos.

Figura 37 - Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos de camundongos Balb/c, 30 minutos após administração. A – *burst* oxidativo basal, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, C – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA, 30 minutos após a administração. # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n = 10$ animais/grupo.

Figura 38 - Efeitos da administração aguda de doses crescentes de MDMA sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos de camundongos Balb/c, 30 minutos após a administração. A – intensidade de fagocitose, B – porcentagem de fagocitose. $p > 0,05$, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n=10$ animais/grupo.

6.4 EXPERIMENTO 4 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 10,0 mg/kg DE MDMA SOBRE A ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS DE CAMUNDONGOS MEDIDA 30, 60 MINUTOS E 24 HORAS APÓS A ADMINISTRAÇÃO.

Quarenta camundongos foram separados ao acaso em 4 grupos: um grupo controle (C) e 3 grupos experimentais (E1, E2 e E3). O experimento foi realizado em um dia e a coleta de sangue ocorreu no período entre 8:00 hs e 9:30 hs, com 10 animais em cada grupo. Os animais dos grupos experimentais foram tratados pela via intraperitoneal (ip) com 10,0 mg/kg de MDMA, 30 minutos (E1); 60 minutos (E2) e 24 horas (E3) antes da coleta de sangue. Os animais do grupo controle foram tratados com solução salina 0,9% (0,1 mL/10g) nos mesmos períodos de tempo do tratamento dos animais experimentais antes da coleta de sangue. Para eliminar possíveis efeitos do estresse da injeção, todos os animais em estudo receberam três injeções, de acordo com o esquema ilustrado na **figura 39** abaixo, proposto por Connor et al; 1998:

Figura 39 – Esquema de tratamento de camundongos Balb/c para avaliação da atividade de neutrófilos sanguíneos – Azul: animais receberam injeção de solução salina; Vermelho: animais receberam injeção de MDMA 10,0 mg/kg. Todos os animais receberam três injeções.

O sangue foi coletado como descrito no item 4.6.1a) para a mensuração da fagocitose e do *burst* oxidativo basal e induzido por *S. aureus* e PMA, ambos

realizados por neutrófilos e avaliados por citometria de fluxo conforme técnica descrita no item 4.6.1b). As doses de MDMA e o tempo de latência para as observações foram embasados em dados de literatura ⁹ e em experimentos realizados anteriormente.

RESULTADOS

A **tabela 13** mostra os efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA em camundongos Balb/c, em diferentes períodos após a administração do fármaco, sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos analisados em citômetro de fluxo. A análise estatística dos dados mostrou diminuição ($F(3,34)=3,288$; $p=0,0323$) do *burst* induzido por SAPI em animais tratados com MDMA após 30 minutos da administração, em relação aos animais do grupo controle tratados com solução salina.

Nos animais analisados 60 minutos após administração do MDMA observou-se redução tanto do *burst* induzido por SAPI ($F(3,34)=3,288$; $p=0,0323$) e PMA ($F(3,36)=4,912$; $p=0,0058$) como da intensidade ($F(3,36)=29,432$; $p<0,0001$) e porcentagem ($F(3,36)=22,904$; $p<0,0001$) de fagocitose em relação aos animais do grupo controle tratados com solução salina.

.Os dados obtidos 24 horas após a administração do fármaco não diferiram daqueles dos animais do grupo controle tratados com solução salina. O *burst* basal dos neutrófilos não foi alterado por qualquer um dos tratamentos. As **figuras 40 e 41** ilustram estes resultados.

⁹ Todas as referências estão na Revisão de Literatura.

Tabela 13 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos em camundongos Balb/c. Os dados representam a média±DP (desvio padrão)

Parâmetros ^B	Grupos ^A			
	Controle	E1	E2	E3
Burst Basal	27,006,99	33,04±9,63	28,89±5,86	24,16±8,71
Burst SAPI	243,84±116,88	160,50±51,19#	158,98±44,54#	261,08±124,17
Burst PMA	69,93±31,05	64,48±37,44	27,66±7,03#	71,56±32,87
%Fagocitose	94,85±1,92	88,17±6,03	76,34±9,42#	94,74±1,80
Int. Fagocitose	27,04±3,21	22,06±3,29	14,09±3,63#	25,90± 3,50

Os dados representam a intensidade média de fluorescência (média±desvio padrão), correspondente ao *gate* da população de neutrófilos sanguíneos. # $p<0,05$ em relação ao grupo controle, dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=10 animais/grupo.

^A C – controle, E1 – MDMA (30 min), E2 – MDMA (60 min), E3 – MDMA (24 horas)

^B**Porcentagem de Fagocitose:** porcentagem de neutrófilos que fagocitaram partículas de SAPI.
Intensidade de Fagocitose: quantas bactérias foram fagocitadas pela população de neutrófilos. Expresso pela média geométrica da intensidade de fluorescência da população de neutrófilos.

Figura 40 - Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos de camundongos Balb/c – Curva tempo-resposta. A – *burst* oxidativo basal, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, C – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n = 10$ animais/grupo.

Figura 41 - Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos de camundongos Balb/c – Curva Tempo-Resposta. A – intensidade de fagocitose, B – porcentagem de fagocitose. # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n=10$ animais/grupo.

6.5 EXPERIMENTO 5 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 10,0 mg/Kg DE MDMA, SOBRE A DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA DE CAMUNDONGOS, 60 MINUTOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO.

Vinte camundongos foram divididos ao acaso em 2 grupos: um grupo controle (C) e um grupo experimental (E). O experimento foi realizado em um dia e a coleta do sangue ocorreu no período entre 8:00 hs e 9:00 hs da manhã, com 10 animais em cada grupo. Os animais do grupo experimental foram tratados pela via intraperitoneal (ip) com 10,0 mg/kg de MDMA. Os animais do grupo controle foram tratados com solução salina 0,9% (0,1 mL/10g), correspondente ao veículo do MDMA. Sessenta minutos após os tratamentos, as amostras de sangue foram coletadas para dosagem de corticosterona conforme descrito no item 4.7.

RESULTADOS

A **tabela 14** mostra os efeitos da administração de MDMA 10,0 mg/kg em camundongos Balb/c, 60 minutos após a administração, sobre os níveis séricos de corticosterona. A análise estatística dos dados mostrou aumento significativo e de 6 vezes dos níveis séricos de corticosterona ($p < 0,0001$) nos animais tratados com MDMA em relação aos animais do grupo controle. A **figura 42** ilustra esses resultados.

Tabela 14 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) em camundongos Balb/c sobre os níveis séricos de corticosterona, 60 minutos após a administração. Os dados representam a média $\pm$ DP (desvio padrão).

	Grupos	
	Controle	Experimental
Corticosterona (ng/mL)	71,657 $\pm$ 21,892	451,314 $\pm$ 80,421*

$p < 0,0001$ em relação ao grupo controle; teste “t” de Student. n=9 animais/grupo.

Figura 42 - Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre os níveis séricos de corticosterona de camundongos Balb/c 60 minutos após a administração. * $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. $n = 9$ animais/grupo.

6.6 EXPERIMENTO 6 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 10,0 mg/kg DE MDMA SOBRE OS NÍVEIS DE MONOAMINAS E DE SEUS METABÓLITOS NO HIPOTÁLAMO E ESTRIATO DE CAMUNDONGOS, 60 MINUTOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO.

Vinte camundongos foram divididos ao acaso em 2 grupos: um grupo controle (C) e um grupo experimental (E). O experimento foi realizado em um dia e a coleta das estruturas de interesse no estudo ocorreu no período entre 8:00 hs e 9:00 hs, com 10 animais em cada grupo. Os animais do grupo experimental foram tratados pela via intraperitoneal (ip) com 10,0 mg/kg de MDMA. Os animais do grupo controle receberam solução salina 0,9% (0,1 mL/10g). Sessenta minutos após os tratamentos, os animais foram submetidos à eutanásia. O cérebro foi coletado para remoção do hipotálamo e do estriato como descrito no item 4.8.1. Foram dosados os seguintes neurotransmissores, noradrenalina, dopamina e serotonina, bem como seus metabólitos, VMA (ácido vanililmandélico); DOPAC (ácido diidroxifenilacético), HVA (ácido homovanílico) e 5-HIAA (ácido 5-hidroxi-indolacético) como descrito no item 4.8.2. Desta forma, foi possível inferir os dados de *turnover* desses neurotransmissores.

RESULTADOS

A **tabela 15** mostra os efeitos do tratamento agudo com MDMA sobre os níveis e *turnover* de neurotransmissores, mensurados no hipotálamo e no estriato de camundongos. Animais tratados com 10,0 mg/kg de MDMA apresentaram após 60 minutos da administração uma diminuição dos níveis de noradrenalina no hipotálamo ($p < 0,05$) e um aumento do *turnover* de noradrenalina nesta mesma região ($p < 0,05$). Os níveis de HVA ($p < 0,0001$) e o *turnover* de dopamina avaliada pela relação HVA/DA e DOPAC+HVA/DA ($p < 0,05$) estavam aumentados nesta

região. A análise dos dados mostrou que houve diminuição ($p < 0,0001$) das concentrações absolutas de 5-HIAA, bem como do *turnover* de serotonina no hipotálamo, quando comparados aos animais do grupo controle.

A análise estatística dos dados do estriato mostrou um aumento ($p < 0,05$) nos níveis de todos os metabólitos e de dopamina, em relação ao grupo controle. Os níveis de noradrenalina, serotonina bem como o *turnover* destes neurotransmissores não apresentaram alterações significantes nesta região. O *turnover* de dopamina medido pela relação DOPAC+HVA/DA aumentou no estriato ($p < 0,05$). As **figuras 43 a 46** ilustram estes resultados.

Tabela 15 – Efeitos da administração aguda de MDMA na dose 10,0 mg/kg sobre os níveis, os metabólitos e o *turnover* hipotalâmicos e estriatais de noradrenalina, dopamina e serotonina, 60 minutos após a administração, em camundongos Balb/c.

Parâmetros ^A	HIPOTÁLAMO		ESTRIATO	
	C	E	C	E
NOR	1290,2±248,4	1073,9±93,8#	79,0±50,4	97,1±19,4
VMA	1840,0±237,1	1655,1±182,4	794,1±169,5	1432,2±394,9#
VMA/NOR	1,44±0,10	1,53±0,07#	13,3±7,0	14,9±3,7
DA	577,32±116,89	545,01±39,76	1954,9±210,6	2964,7±964,1#
DOPAC	518,14±92,29	467,82±82,52	248,4±134,6	384,6±128,8#
HVA	169,76±8,91	237,25±19,44*	281,8±53,9	426,7±72,1*
DOPAC/DA	0,926±0,240	0,86±0,15	0,12±0,06	0,14±0,06
HVA/DA	0,30±0,070	0,43±0,05#	0,14±0,01	0,15±0,03
DOPAC+HVA/DA	1,17±0,06	1,29±0,07#	0,23±0,02	0,29±0,06#
5-HT	1155,08±184,00	1129,79±119,61	214,43±95,87	255,03±87,45
5-HIAA	614,03±71,68	396,70±26,60*	166,33±65,37	237,14±65,97#
5-HIAA/5-HT	0,53±0,03	0,35±0,03*	0,80±0,11	0,99±0,30

Os dados representam a média±desvio padrão em ng/g. * p< 0,0001 em relação ao grupo controle, #p<0,05 em relação ao grupo controle, dentro do mesmo parâmetro, teste “t” de Student. n=10 animais/grupo.

^A NOR:noradrenalina; VMA:ácido vanililmandélico; DA:dopamina, DOPAC:ácido diidroxifenilacético, HVA:ácido homovanílico, 5-HT:serotonina e 5-HIAA:ácido 5-hidroxi-indolacético.

Figura 43 - Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre os níveis hipotálamicos de noradrenalina e VMA (A); dopamina, DOPAC e HVA (B) e serotonina e 5-HIAA (C) de camundongos Balb/c, 60 minutos após a administração. * $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle, # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; teste "t" de Student. $n = 9$ animais/grupo.

Figura 44 - Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre *turnover* hipotalâmico de VMA/noradrenalina (A); DOPAC/dopamina, HVA/dopamina e DOPAC+HVA/dopamina; (B) e 5-HIAA/serotonina (C) de camundongos Balb/c, 60 minutos após a administração. * $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle, # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; teste "t" de Student. $n = 9$ animais/grupo.

Figura 45 - Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre os níveis estriatais de noradrenalina e VMA (A); dopamina, DOPAC e HVA (B) e serotonina e 5-HIAA (C) de camundongos Balb/c, 60 minutos após a administração. # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; teste "t" de Student. $n = 9$ animais/grupo.

Figura 46 - Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre *turnover* estriatal de VMA/noradrenalina (A); DOPAC/dopamina, HVA/dopamina e DOPAC+HVA/dopamina; (B) e 5-HIAA/serotonina (C) de camundongos Balb/c, 60 minutos após a administração. # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; teste "t" de Student. $n = 9$ animais/grupo.

6.7 EXPERIMENTO 7 – EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO COM 10,0 mg/kg DE MDMA SOBRE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E DE CELULARIDADE DO BAÇO E DA MEDULA ÓSSEA, 60 MINUTOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO.

Vinte camundongos foram divididos ao acaso em 2 grupos: um grupo controle (C) e um grupo experimental (E). O experimento foi realizado em um dia e a coleta do material biológico ocorreu no período entre 8:00 hs e 11:00 hs. Os animais do grupo experimental foram tratados pela via intraperitoneal (ip) com 10,0 mg/kg de MDMA. Os animais do grupo controle foram tratados com solução salina 0,9% (0,1 mL/10g). Sessenta minutos após os tratamentos, os animais foram anestesiados sendo coletadas amostras de sangue, o baço e a medula óssea para verificação do hemograma completo, peso relativo do baço e contagem de células totais do baço e da medula óssea, conforme descrito nos itens 4.9 e 4.10.

RESULTADOS

As **tabelas 16, 17 e 18** mostram os efeitos da administração aguda de 10,0 mg/kg de MDMA 60 minutos após a administração do fármaco sobre o hemograma, peso do baço e celularidade do baço e da medula óssea de camundongos. A análise estatística dos dados mostrou aumento no hematócrito ($p < 0,0001$), na concentração de eritrócitos ($p < 0,05$) e nos valores de hemoglobina ($p < 0,0001$) dos animais tratados com MDMA em relação aos animais controles. Não foram observadas diferenças significativas sobre a concentração de leucócitos sanguíneos.

Na contagem diferencial dos leucócitos sangüíneos observou-se diminuição ($p = 0,0004$) da porcentagem de linfócitos e aumento ($p = 0,0055$) da porcentagem de neutrófilos. Não se observaram quaisquer alterações nas porcentagens de monócitos.

Observou-se diminuição da celularidade total da medula óssea ($p < 0,05$) e aumento de leucócitos totais do baço ($p < 0,05$). Houve diminuição no peso relativo do baço ($p = 0,031$) dos animais tratados com MDMA em relação aos animais do grupo controle. As **figuras 47 a 50** ilustram estes resultados.

Tabela 16 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre parâmetros hematológicos 60 minutos após a administração em camundongos Balb/c. Os dados representam a média $\pm$ DP (desvio padrão)

Parâmetros	Grupos	
	Controle	Experimental
Leucócitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	3,94 $\pm$ 0,57	4,48 $\pm$ 0,52
Eritrócitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	8,29 $\pm$ 0,71	9,32 $\pm$ 1,01#
Hemoglobina (g/dL)	13,43 $\pm$ 0,53	14,85 $\pm$ 0,49*
Hematócrito (%)	47,80 $\pm$ 1,13	51,60 $\pm$ 1,43*

$p < 0,05$ em relação ao grupo controle, * $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle; teste “t” de Student. $n=10$ animais/grupo.

Tabela 17 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre contagem diferencial de leucócitos sangüíneos 60 minutos após a administração em camundongos Balb/c. Os dados representam a média $\pm$ DP (desvio padrão)

Parâmetros	Grupos	
	Controle	Experimental
Linfócitos (%)	60,50 $\pm$ 6,04	50,80 $\pm$ 3,73*
Monócitos (%)	2,0 $\pm$ 0,66	2,10 $\pm$ 1,10
Neutrófilos (%)	38,4 $\pm$ 7,58	47,40 $\pm$ 4,88**

** $p = 0,0004$ em relação ao grupo controle, ** $p=0,0055$ em relação ao grupo controle; teste “t” de Student. $n=10$ animais/grupo.

Tabela 18 – Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre contagem total de leucócitos do baço e medula óssea 60 minutos após a administração em camundongos Balb/c. Os dados representam a média $\pm$ DP (desvio padrão)

Parâmetros	Grupos	
	Controle	Experimental
Baço (células $\times 10^6$)	197,77 $\pm$ 31,95	238,05 $\pm$ 42,31#
Medula óssea (células $\times 10^6$)	150,0 $\pm$ 20,67	132,51 $\pm$ 6,96#
Peso relativo baço (g/100g pv)	0,48 $\pm$ 0,02	0,45 $\pm$ 0,02*

$p < 0,05$ em relação ao grupo controle, * $p=0,03$ em relação ao grupo controle; teste “t” de Student. $n=10$ animais/grupo.

Figura 47 - Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre parâmetros hematológicos: (A) número de leucócitos e eritrócitos totais sanguíneos; (B) valores médios de hemoglobina (HGB); (C) porcentagem do hematócrito (Ht) de camundongos Balb/c, 60 minutos após a administração. #p<0,05 em relação ao grupo controle; *p<0,0001 em relação ao grupo controle; teste "t" de Student. n=10 animais/grupo.

Figura 48 - Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre contagem diferencial de leucócitos sanguíneos de camundongos Balb/c, 60 minutos após a administração. **p=0,0006 em relação ao grupo controle; teste "t" de Student. n=10 animais/grupo.

Figura 49 - Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre contagem total de leucócitos da medula óssea e baço de camundongos Balb/c, 60 minutos após a administração. # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; teste "t" de Student. $n = 10$ animais/grupo.

Figura 50- Efeitos da administração aguda de MDMA (10,0 mg/kg) sobre o peso relativo do baço de camundongos Balb/c, 60 minutos após a administração. * $p = 0,031$ em relação ao grupo controle; teste "t" de Student. $n = 10$ animais/grupo.

6.8 EXPERIMENTO 8 – EFEITOS *in vitro* DO MDMA SOBRE A ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS DE CAMUNDONGOS.

Trinta e dois camundongos foram escolhidos ao acaso e sem nenhum tipo de tratamento. Amostras de sangue foram coletadas como descrito no item 4.6.1a). Alíquotas de 100 µL de sangue foram incubadas em tubos de citometria durante 60 minutos, com solução salina 0,9% e MDMA nas concentrações¹⁰ 66,7ng/mL, 667ng/mL e 6670ng/mL correspondendo, respectivamente, aos grupos controle e experimentais E1, E2 e E3.

Após a incubação das células com solução salina 0,9% e MDMA, procedeu-se a mensuração da fagocitose e do *burst* oxidativo basal e induzido por *S. aureus* e PMA, ambos realizados por neutrófilos e avaliados por citometria de fluxo conforme técnica descrita no item 4.6.1b).

RESULTADOS

A **tabela19** mostra os efeitos *in vitro* do MDMA em diferentes concentrações sobre o *burst* oxidativo e a fagocitose por neutrófilos sanguíneos analisados por citometria de fluxo. A análise estatística dos dados mostrou ausência de diferenças significantes entre os dados do grupo controle e aqueles do grupo experimental.

¹⁰ Concentrações de MDMA conforme LACAVA, MARIANA CAMARGO RODRIGUES. Padronização de um método para quantificação simultânea de anfetamina, MDMA, MDA por cromatografia gasosa com detector de nitrogênio e fósforo e determinação dos níveis plasmáticos de MDMA em camundongos submetidos ao tratamento agudo com MDMA – Projeto de Iniciação Científica desenvolvido na FCF-USP, sob a orientação da Profa. Dra. Regina Lúcia de Moraes Moreau.

Tabela 19 - Efeitos *in vitro* do MDMA sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos de camundongos Balb/c. Os dados representam a média±DP (desvio padrão)

Parâmetros ^B	Grupos ^A			
	Controle	E1	E2	E3
Burst Basal	33,34±11,61	24,76±7,04	24,71±7,62	23,44±8,28
Burst SAPI	90,17±6,13	68,16±21,21	81,83±22,50	82,01±24,11
Burst PMA	23,82±7,82	22,08±6,36	25,70±7,13	23,72±8,20
%Fagocitose	93,92±1,53	92,24±4,34	92,35±3,29	92,72±1,94
Int. Fagocitose	46,40±5,17	47,91±8,93	50,76±7,70	48,87±3,39

Os dados representam a intensidade média de fluorescência (média±desvio padrão), correspondente ao *gate* da população de neutrófilos sanguíneos. $p>0,05$ em relação ao grupo controle, dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. $n=8$ animais/grupo.

^A C – controle, E1 – MDMA (64ng/mL), E2 – MDMA (640ng/mL), E3 – MDMA (6400ng/mL)

^B **Porcentagem de Fagocitose:** porcentagem de neutrófilos que fagocitaram partículas de SAPI. **Intensidade de Fagocitose:** quantas bactérias foram fagocitadas pela população de neutrófilos. Expresso pela média geométrica da intensidade de fluorescência da população de neutrófilos.

7. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que a administração de MDMA nas doses de 5,0; 8,0; 10,0 e 20,0 mg/kg, 30 minutos antes da observação dos animais, induziu no campo aberto: 1) aumento da atividade geral de camundongos evidenciado pelo aumento da locomoção e da velocidade dos animais no interior da arena; 2) diminuição da atividade exploratória vertical caracterizado pela redução do número de ocorrências de levantar e 3) aumento da locomoção e do tempo gasto na locomoção nas zonas externa e tigmotática do aparelho. Com relação aos dados obtidos 30 minutos após o tratamento no labirinto em cruz elevado (LCE), o MDMA induziu: 4) aumento da porcentagem de entradas nos braços abertos após a dose de 20,0 mg/kg e 5) aumento da porcentagem do tempo gasto na exploração dos braços abertos após as doses de 10,0 e 20,0 mg/kg. Adicionalmente, observou-se 60 minutos após o tratamento com 10,0 mg/kg de MDMA: 6) aumento da atividade geral dos camundongos no campo aberto, principalmente na zona externa do aparelho; 7) aumento da locomoção nos braços abertos do LCE.

O tratamento dos animais com MDMA nas doses 8,0; 10,0 e 20,0 mg/kg, induziu 30 minutos após 8) diminuição do *burst* oxidativo de neutrófilos induzido por SAPI. Nos animais tratados com a dose de 10,0 mg/kg de MDMA, observou-se 60 minutos após o tratamento: 9) uma diminuição do *burst* oxidativo induzido por SAPI e PMA e, também, da porcentagem e da intensidade da fagocitose dos neutrófilos sanguíneos; 10) um aumento dos níveis séricos de corticosterona; 11) uma diminuição dos níveis hipotalâmicos de noradrenalina e de 5-HIAA e um aumento daqueles de HVA; 12) uma diminuição do *turnover* de serotonina e um aumento do *turnover* de noradrenalina e de dopamina no hipotálamo; 13) um aumento dos níveis estriatais de VMA, dopamina, DOPAC, HVA e de 5-HIAA; 14) um aumento do

turnover de dopamina no estriato; 15) um aumento do número de eritrócitos, da quantidade de hemoglobina e da porcentagem do hematócrito, e, uma diminuição do número de linfócitos sanguíneos; 16) uma diminuição do número total de leucócitos na medula óssea e aumento dos mesmos no baço e 17) diminuição do peso relativo do baço.

Em relação à avaliação dos efeitos *in vitro* do MDMA sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos, não foram observadas alterações no *burst* oxidativo e fagocitose.

No contexto da presente discussão, é importante ressaltar que a avaliação comportamental dos animais foi realizada em uma sala fracamente iluminada e sem ruídos, e que os dados foram adquiridos por meio de uma câmera de vídeo instalada dentro da sala. Desta forma, a presença do observador não interferiu com a manifestação do comportamento dos animais. Assim, como as observações no campo aberto foram realizadas na vigência de baixos níveis de estimulação ambiental pode-se dizer que representaram muito mais características de comportamento exploratório dos animais do que respostas emocionais comumente analisadas neste aparelho em condições de alta estimulação ambiental (PARE; GLAVIN, 1993). Neste sentido, infere-se a existência de níveis elevados de emocionalidade e/ou ansiedade no campo aberto pela preferência dos animais em mover-se nas áreas externa e tigmotática do aparelho (BARNETT, 1958; GROSSEN; KELLEY, 1972; BERNARDI; 1978) e/ou pela diminuição da atividade exploratória (LISTER, 1987).

Diversos trabalhos mostram a influência do MDMA nos níveis de ansiedade de animais de laboratório observados no campo aberto e no labirinto em cruz elevado (McNAMARA; KELLY; LEONARD, 1995; MALDONADO & NAVARRO, 2000;

MORLEY & MCGREGOR 2000; NAVARRO & MALDONADO, 2002, MECHAN et al., 2002). Em nossos experimentos observamos que animais sob efeito de doses superiores a 5,0 mg/kg de MDMA observados, 30 minutos após o tratamento e animais sob efeito da dose de 10,0 mg/kg de MDMA observados, 60 minutos após o tratamento apresentaram aumento de locomoção total no campo aberto, fato caracterizado, principalmente, pelo aumento da locomoção nas zonas periféricas do aparelho, sem diferenças significativas na movimentação nas zonas centrais do mesmo. Acreditamos que outro fato possa explicar nossos achados que não a inferência simplista de alteração induzida pelo MDMA nos níveis de ansiedade dos animais.

Uma hipótese explicativa para nossos resultados seria o aumento da liberação de dopamina no SNC, especificamente no estriato. Muitos estudos têm demonstrado que, em camundongos, a dopamina representa papel chave nas propriedades estimulantes da anfetamina e da cocaína (JACKSON; KELLY, 1993; O'NEILL; SHAW, 1999; VENTURA et al., 2004). Antagonistas de receptores D1 e D2 bloquearam de forma eficiente a estimulação locomotora induzida pelo MDMA em ratos (BALL; BUDREAU; REBEC, 2003; BUBAR et al., 2004). Sabe-se que a noradrenalina e a dopamina presentes no SNC estão relacionadas à atividade motora (BERNARDI; PALERMO-NETO, 1978; FLORIO; SAKATE; PALERMO-NETO, 1993), e que a atividade dos sistemas catecolaminérgicos centrais está relacionada tanto à atividade exploratória como a transtornos comportamentais, como ansiedade e depressão (GROSSMAN; POTTER, 1999, HALLER, 2004). Aumentos de atividade nesses sistemas de neurotransmissão por outro lado, já foram relacionados ao aumento da atividade geral ou ao comportamento exploratório observado no aparelho. O MDMA em nosso trabalho induziu a liberação de

noradrenalina, de 5-HT e de dopamina no hipotálamo e no estriado, além disso, esses dados são reforçados por outros da literatura (KOCH; GALLOWAY, 1997, KANKAANPAA et al., 1998, DE LA TORRE; FARRE, 2004), que revelam inclusive a demonstração de expressão de *c-Fos* no estriado após administração aguda de MDMA (McNAMARA; KELLY; LEONARD, 1995). Parece-nos viável sugerir que o aumento da atividade geral dos animais sob efeito do MDMA agora observada esteja relacionado à liberação dos neurotransmissores envolvidos com a atividade motora, uma vez que em nossos experimentos observamos aumento de *turnover* de catecolaminas (noradrenalina e dopamina) e aumento da liberação de dopamina no estriato de animais tratados com MDMA.

Além disso, é possível supor que o aumento de locomoção na área externa do campo aberto, por nós observada possa ser consequência de um efeito estimulatório/estereotipado (PALENICEK et al., 2005), pois observou-se um tipo diferente de locomoção (repetitiva e estereotipada) ao redor das paredes da arena, assim como diminuição acentuada dos movimentos iniciados e do número de *grooming*. Estas conclusões corroboram com dados obtidos em um estudo complementar realizado em nossos laboratórios (Stankevicius et al., dados não publicados) onde se observou uma diminuição da atividade exploratória de camundongos 30 minutos após o tratamento com as doses de 5,0; 8,0; 10,0; e 20,0 mg/kg de MDMA no *hole-board*. Especificamente, observou-se, um aumento de movimentos estereotipados emitidos pelos camundongos na zona periférica do aparelho e uma diminuição da exploração dos orifícios da arena após doses de MDMA superiores a 5,0 mg/kg, chegando a zero os níveis de exploração, após as doses de 10,0 e 20,0 mg/kg.

O nível de ansiedade dos animais no LCE pode ser operacionalmente inferido como proposto por Pellow et al. (1985), isto é, como uma resposta a uma situação na qual o comportamento é influenciado por duas forças motivacionais opostas – a curiosidade natural dos animais pela exploração de lugares novos e a aversão dos mesmos por locais abertos. Neste sentido, mostrou-se que fármacos ansiolíticos, como os benzodiazepínicos, aumentavam a exploração dos braços abertos do LCE; por outro lado, fármacos ansiogênicos como a cafeína, a ioimbina, pentilenotetrazol e a picrotoxina a diminuía (PELLOW et al., 1985; STANKEVICIUS; PALERMO NETO, 2004). O LCE foi validado também pela presença de estímulos aversivos que fazem parte do repertório comportamental natural dos roedores, como por exemplo, a exposição única de ratos a um predador (ADAMEC; SHALLOW, 1993) ou ao odor de um gato (ZANGROSSI; FILE, 1992).

Indicadores bioquímicos importantes do aumento de ansiedade são os níveis de *turnover* de noradrenalina no SNC e os níveis séricos de corticosterona. Neste sentido, avaliações comportamentais realizadas no LCE, bem como análises bioquímicas dos níveis séricos de corticosterona têm sido considerados bons indicadores de resposta orgânica ao estresse e à ansiedade (FILE, 1985; LISTER, 1987; McEWEN et al., 1997). Sabe-se que animais ansiosos apresentam aumento nos níveis séricos de corticosterona, diminuição da atividade geral avaliada em campo aberto na presença de estimulação ambiental e diminuição da exploração dos braços abertos do LCE (FILE, 1982; PELLOW et al., 1985; PELLOW; FILE, 1986). Neste sentido, demonstrou-se que a administração de 10,0 mg/kg de MDMA produz, após 30 minutos, um aumento dos níveis séricos de corticosterona, que se mantiveram elevados durante 4 horas, possivelmente devido a ativação de

receptores 5-HT₂ ou 5-HT_{1A} do hipotálamo e córtex frontal, fato sugerido por Nash, Meltzer e Gudelsky em 1988.

Em nossos experimentos observamos um aumento do tempo gasto pelos animais nos braços abertos do LCE, o que caracterizaria o MDMA como um fármaco de perfil ansiolítico. No entanto, observamos após idêntica dose de MDMA, um aumento dos níveis séricos de corticosterona, um resultado que contrasta francamente com os dados comportamentais obtidos no LCE e discutidos acima.

Quer nos parecer, outra explicação deva existir para nossos achados comportamentais no LCE que não uma alteração dos níveis de ansiedade dos animais. Assim, seria este aumento de exploração dos braços abertos do LCE um parâmetro indicativo da diminuição de ansiedade? De fato acreditamos que este efeito ansiolítico aparente possa ser interpretado, como decorrência também de alterações na atividade locomotora, visto que os animais tratados apresentaram aumento tanto na distância total percorrida como do tempo em locomoção total no LCE, fatos esses acompanhados por aumento da velocidade média após a dose de 10,0 mg/kg. Além disso, estes animais apresentam um aumento da sensibilidade tátil e, portanto poderiam estar evitando entrar ou se aproximar dos braços fechados, podendo ser esta a razão pela qual os animais tratados que se aproximaram da zona central do LCE ao encostar-se às paredes dos braços fechados mudaram bruscamente e rapidamente de posição e alguns deles caíram do aparelho.

Por tudo quanto exposto, quer nos parecer que a melhor explicação para os resultados obtidos com as duas metodologias empregadas, campo aberto e LCE, venha a ser uma somatória do efeito estimulante do MDMA sobre a atividade locomotora dos animais (conseqüente a um aumento do *turnover* de noradrenalina e de dopamina no SNC) acompanhada de uma hiperestimulação sensorial. Neste

sentido, Dawson et al. (1995) demonstraram em seu trabalho que a anfetamina aumentou o número total de entradas nos braços e a distância total movida no LCE, sugerindo que o aumento da atividade locomotora desencadeada pelo fármaco poderia ser confundido com um efeito ansiolítico. Estes dados corroboram com os nossos resultados, pois mostramos aumento da atividade locomotora dos animais no LCE, como amplamente discutido acima.

Por outro lado, sabe-se que algumas substâncias com ação ansiolítica, como a buspirona - que possuem mecanismo de ação distinto ao dos benzodiazepínicos - não apresentam o perfil clássico esperado de ansiolíticos no LCE; assim talvez, o LCE seja um modelo altamente sensível para avaliar os efeitos de substâncias ansiolíticas e ansiogênicas que atuam através de ativação ou inibição de receptores GABA centrais (RODGERS; COLE, 1994). Visto que o MDMA atua em diversos sistemas de neurotransmissão no SNC, parece-nos provável que os seus possíveis efeitos sobre o comportamento de animais de laboratório devam ser analisados por outro método. De fato, nossos resultados de campo aberto e LCE, após esse fármaco psicoestimulante mostram que eles apresentam comportamentos nos aparelhos que podem levar a interpretações falsas quando relacionadas à ansiedade. Assim, parece-nos que não seja possível inferir níveis de ansiedade em animais tratados com MDMA através desses métodos comportamentais. Esse fato justificaria a grande discrepância de dados comportamentais relatados para o MDMA na literatura.

De qualquer forma, o uso de MDMA causou alterações neuroquímicas e endócrinas, semelhantes àsquelas produzidas por exposição a um estressor agudo, sugerindo esses fatos, ser ele um estressor químico (PACIFICI et al., 2002). O eixo HHA é um dos mais importantes sistemas de integração do organismo, sendo

ativado em resposta a estímulos estressores ou distúrbios homeostáticos (MC EWEN, 1998; 2000a,b), resultando em elevação dos níveis plasmáticos de corticosterona (AXELROD; REISINE, 1984). Sabe-se que essas alterações podem levar a alterações na imunidade (ELENKOV, et al., 2000; PACIFICI et al., 2002, RIGHI & PALERMO-NETO, 2003; CONNOR, 2004, LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2004).

Situações indutoras de estresse ativam sistemas noradrenérgicos centrais e produzem aumento do *turnover* de noradrenalina medido através da análise dos níveis deste neurotransmissor e de seu principal metabólito no SNC (CHARNEY; HENINGER, 1985; GLAVIN et al, 1983; PARÉ; GLAVIN, 1993; ALVES et a., 2005). Em particular, 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 a estressores como, por exemplo, contenção e choque nas patas (TANAKA et al, 1982) e comunicação emocional (IIMORI et al, 1982; ALVES et al., 2005). Em animais de laboratório, mostrou-se que o estresse aumenta a atividade de células do *locus coeruleus* (SIMSON; WEISS, 1988; PAVCOVICH et al, 1990). De acordo com Abercrombie, Keller e Zigmond (1988) o incremento do *turnover* de noradrenalina induzido pelo estresse é consequência de um aumento na atividade da enzima tirosina hidroxilase. Neste contexto, a magnitude da depleção dos níveis de noradrenalina após um estímulo estressor já foi inversamente correlacionado com as alterações por ele produzidas em animais de laboratório; isto é, quanto menores os níveis de noradrenalina maiores foram às respostas ao estímulo estressor (GLAVIN, 1991). Assim, os resultados do presente trabalho em relação à noradrenalina são coerentes com os dados da literatura e permitem inferir presença de estresse nos animais sob efeito do MDMA.

Nossos resultados relacionados aos níveis de serotonina no hipotálamo e no estriato não apontaram diferenças entre animais controles e administrados com MDMA; é possível que a explicação deste fato esteja 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. Vale lembrar, no entanto, que Connor, et al., (1998) observaram depleção de 5-HT no córtex de ratos 30 minutos após a administração de MDMA e níveis aumentados de corticosterona plasmática. Com isso, a ausência de resultados, por nós encontrada nos níveis de 5-HT, não invalida a sugestão feita acima relacionada à presença de estresse em animais do grupo experimental. De fato, mostrou-se que situações estressoras induzidas por barulho ou contenção foram incapazes de alterar a atividade de neurônios serotoninérgicos no SNC (WILKINSON; JACOBS, 1998). Neste sentido, diversos experimentos têm mostrado que estressores ambientais ou psicológicos não alteram de forma significativa a atividade de neurônios serotoninérgicos centrais, embora produzam ativação comportamental e aumento da atividade catecolaminérgica central e do SNAS (JACOBS, 1990; JACOBS; FORNAL, 1995).

Em seu conjunto, nossos resultados demonstram que o MDMA produz alterações comportamentais (aumento da atividade locomotora), neuroquímicas (aumento do *turnover* de noradrenalina e dopamina no hipotálamo e aumento do *turnover* de dopamina no estriato) e neuroendócrinas (aumento dos níveis séricos de corticosterona). Sabendo-se que alterações neuroendócrinas podem levar a alterações na imunidade, pareceu-nos relevante buscar por efeitos neuroimunomodulatórios, após a administração de MDMA. Neste sentido, nossos achados mostraram que o tratamento com MDMA diminuiu a atividade de neutrófilos

sanguíneos, 60 minutos após a dose 10,0 mg/kg, avaliados tanto pelo *burst* oxidativo como pela fagocitose.

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 e de corticosterona, o que configurava ocorrência de uma ativação do eixo HHA; mostraram, também, que estes aumentos ocorriam de forma dose-dependente, e que os efeitos que observaram podiam ser prevenidos pela imunoneutralização do CRH. Neste contexto, Ligeiro-Oliveira et al. (2004) constataram que ratos tratados com anfetamina apresentaram um aumento na atividade locomotora total, na primeira hora após o tratamento, mas não 12 horas após; o efeito observado 1 hora após o tratamento foi coincidente com níveis aumentados de corticosterona sérica medida nos animais tratados, confirmando informações de que o tratamento com anfetamina induz não apenas alterações comportamentais indicativas de estresse, mas também que ativa o eixo HHA.

Estudos verificaram em ratos, que a administração de 20 mg/kg de MDMA 30 minutos antes dos testes, suprimiu a proliferação de linfócitos induzida por Con-A e reduziu a contagem total de leucócitos sanguíneos (CONNOR et. al., 1998, 2000); sendo essas alterações acompanhadas por um aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona que persistiram durante 6 horas (CONNOR et. al., 1998). Estes dados corroboram com os nossos uma vez que observamos diminuição do *burst* oxidativo e da fagocitose por neutrófilos 60 minutos após administração do fármaco quando os níveis de corticosterona estavam elevados, mas 24 horas após a administração do

fármaco a atividade de neutrófilos havia retornado aos valores normais dos animais controle; provavelmente, o mesmo deve ter ocorrido com os níveis de corticosterona.

A administração de 10 e 20 mg/kg de MDMA em ratos desafiados com LPS diminuiu a secreção de IL1 β e TNF α (CONNOR et. al., 2000), um efeito que não foi atribuído a um aumento de liberação de serotonina induzida pelo fármaco (CONNOR et. al., 2001). Em 2005, Connor et al., demonstraram que o MDMA (5,0 mg/kg) provocava aumento das concentrações de IL-10 e diminuição daquelas de TNF α em ratos desafiados com LPS; os autores atribuíram esses efeitos a uma ação do MDMA em receptores β - adrenérgicos e não à ativação do eixo HHA ou do SNAS. Em 2004, Connor et al.¹¹, mostraram que ratos tratados com 10mg/kg de MDMA apresentaram diminuição do burst oxidativo de neutrófilos em resposta ao zymosan opsonizado.

Fármacos com ação no SNC como, por exemplo, os benzodiazepínicos, carregam potencial para modificar a imunidade por alterar principalmente as atividades do eixo HHA e/ou a atividade do SNAS (CASTRO E PALERMO-NETO, 1989; WEIZMAN et al., 1997; RIGHI et al., 1999; DOMINGUES-JUNIOR et al., 2000; RIGHI E PALERMO-NETO, 2003; LAZZARINI et al., 2003; 2006), podem, também, agir diretamente em células imunes (RAMSEIER; LICHTENSTEIGER; SHULUMPF, 1993; MASSOCO E PALERMO-NETO, 1999; MARINO et al., 2001; MASSOCO E PALERMO-NETO, 2003; SILVA et al., 2003). Em nossos laboratórios Righi & Palermo-Neto (2003) constataram que a cialotrina, um praguicida do grupo dos piretróides, induz aumento dos níveis séricos de corticosterona e de ansiedade, semelhante ao que faz a picrotoxina, um ansiogênico clássico e induz diminuição da

¹¹ CONNOR, T.J. Methylenodioxymethamphetamine (MDMA-ECSTASY) suppresses zymosan-induced oxidative burst in neutrophils. Mensagem recebida por vivi_ferraz@terra.com.br em 08 agosto, 2006.

atividade de macrófagos peritoneais, caracterizado pela diminuição da fagocitose e da produção de óxido nítrico.

Por tudo quanto exposto, parece-nos que a diminuição da atividade de neutrófilos sanguíneos avaliados tanto pelo *burst* oxidativo como pela fagocitose após tratamento com MDMA, seja decorrente de uma ativação do eixo HHA, que resultou em aumento dos níveis séricos de corticosterona e que esta ativação possa estar, ao menos em parte, relacionada ao aumento de atividade do sistema noradrenérgico hipotalâmico, por nós observado.

Essa sugestão encontra apoio em dados de Song, Earley; Leonard, (1995) que mostraram ser a injeção intracerebroventricular de 0,5 e 1,0 micrograma de CRH, capaz de induzir aumento significativo na atividade do circuito neuronal de noradrenalina, dopamina e 5-HT no hipotálamo. Nesse trabalho, os autores também mostraram que a infusão de CRH produziu, de forma dose-dependente, um aumento dos níveis séricos de corticosterona causando claramente redução da proliferação e porcentagem de linfócitos e aumento na porcentagem de neutrófilos sanguíneos. Os neutrófilos tiveram sua atividade diminuída, o que foi caracterizado pela diminuição da fagocitose. Além disso, observou-se um aumento da agregação leucocitária.

Neste sentido, lembramos que diversos trabalhos de literatura confirmam o efeito imunossupressor dos glicocorticóides sobre a atividade de neutrófilos tanto em humanos como em animais de laboratório. Bekesi et. al., (2004), demonstraram que neutrófilos de voluntários sadios apresentaram uma significativa redução na produção de íons superóxido quando incubados com corticosterona e 18-hidroxi-deoxicorticosterona. Archana e Namasivayam (1999) mostraram que ratos estressados apresentavam aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona, acompanhados por diminuição do número total de leucócitos e diminuição da

fagocitose por neutrófilos induzida por *Candida* e *Nitroblue tetrazolium*. Nohmi et al., (1994) também demonstraram que concentrações fisiológicas de corticosterona suprimem *in vivo* a atividade de neutrófilos murinos induzida por *Candida*. Ainda, Harris, Flower e Perretti, (1995) mostraram que camundongos injetados com fator de ativação plaquetária (PAF) (i.v.) apresentaram uma rápida neutropenia (2 minutos) seguida por uma neutrofilia (2 horas) e que este efeito foi precedido por um aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona. Além disso, quando os camundongos foram adrenalectomizados ou pré-tratados com o antagonista de receptores esteróides (RU 486) a neutrofilia induzida por PAF foi reduzida em 50%; no entanto quando estes animais foram administrados com ACTH, eles apresentaram intensa neutrofilia, confirmando a ação dos glicocorticóides sobre os neutrófilos sanguíneos.

Stevenson e Taylor (1988) verificaram que camundongos tratados com hormônios tidos por eles como tendo efeitos “antiglicocorticóides” (progesterona e cortexolona) apresentaram efeitos opostos aos relatados anteriormente, isto é, aumento no número de linfócitos, monócitos, neutrófilos e leucócitos totais no sangue, aumento no número de células do exsudato peritoneal e aumento da resposta de células do baço induzida por fitohemaglutinina (PHA).

O número e proporção de leucócitos sanguíneos caracterizam uma representação importante do estado de ativação do sistema imune e do padrão de distribuição de células imunes no corpo. Sabe-se 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 adrenais de esteróides do tipo II (DHABHAR et al. 1996).

Em nossos experimentos, verificamos que o MDMA, 60 minutos após sua administração induziu diminuição do número total de células na medula óssea e aumento de leucócitos no baço. No sangue o número de leucócitos não foi alterado, mas houve diminuição na porcentagem de linfócitos e aumento de neutrófilos. Sabe-se que o tráfego de células imunes é crucial para o desempenho da resposta, bem como para as funções efetoras do sistema imune. Dados de literatura mostram que animais estressados apresentam níveis elevados de corticosterona no plasma, acompanhados por significativa diminuição no número e porcentagem de linfócitos (LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2004) e por um aumento no número e porcentagem de neutrófilos circulantes (OTTAWAY; HUSBAND, 1994; ENGLER et al., 2004); sendo estes efeitos reduzidos em animais adrenalectomizados. Sugere-se, assim, que fatores endócrinos liberados durante o estresse modulem o tráfego de leucócitos e resultem numa redistribuição desses entre o sangue e outros compartimentos imunes (OTTAWAY; HUSBAND, 1994; ENGLER et al., 2004 STEFANSKI, 2000).

Nesse contexto, parece-nos interessante destacar os trabalhos que analisaram os efeitos do tratamento *in vivo* com anfetamina e que registraram alterações de comportamento e/ou alterações endócrinas concomitantes com aquelas de parâmetros relacionados à atividade do sistema imune. Ligeiro-Oliveira et al., (2004) mostraram em nossos laboratórios, que ratos OVA-sensibilizados tratados com anfetamina apresentaram uma diminuição na população de neutrófilos, monócitos e linfócitos no sangue periférico e um aumento no número de células na medula óssea, um efeito que não se devia exclusivamente à ativação do eixo HHA e conseqüente liberação de corticosterona. De fato, o pré-tratamento com metirapona preveniu, em parte, a inibição da migração de células inflamatórias induzidas pela

anfetamina no modelo de inflamação alérgica pulmonar. Estes dados contrastam com aqueles de nossos resultados uma vez que verificamos diminuição no número de linfócitos sanguíneos e diminuição do número de células da medula óssea. A divergência entre os dados pode ser explicada, pelo menos em parte, ao fato de que em nosso trabalho os animais não foram desafiados imunologicamente, ou seja, são resultados advindos de níveis celulares basais, ao contrário do que aconteceu no trabalho de Ligeiro-Oliveira et al., (2004) onde os animais foram induzidos, com OVA, a produzir uma resposta alérgica pulmonar com maior recrutamento de células.

Dados de literatura tomados em conjunto com nossos resultados indicam que a redistribuição de células imune afeta a capacidade de resposta do sistema imune a um desafio potencial ou existente. É possível que o aumento da concentração de neutrófilos circulantes por nós observada seja de células imaturas liberadas pela medula óssea, o que poderia explicar a diminuição do *burst* oxidativo e fagocitose destas células; além de uma possível ação direta da corticosterrona sobre estas células suprimindo a atividade destas. Nesse sentido, as alterações encontradas em nosso trabalho poderiam explicar em parte a supressão da atividade de neutrófilos após MDMA.

Dados recentes no campo de estudo da neuroimunomodulação têm sugerido que existem várias vias, que a não a ativação do eixo HHA, pelos quais o estresse pode afetar o comportamento e a função imune (ALVES et al., 2006). As alterações entre o sistema nervoso e o sistema imune são extensas e podem incluir vários hormônios, as catecolaminas, outras aminas, neuropeptídeos e opióides. Assim, por exemplo, já se descreveu serem os estresses induzidos pela inalação de éter (VELLUCCI, 1977) pelo frio (RITTER; PELZER, 1978) e por imobilização

(NAKAGAWA et al., 1981) capazes de ativar o SNAS e os sistemas de neurotransmissão catecolaminérgica no SNC (IIMORE et al., 1982). O estresse psicogênico induzido em uma caixa de comunicação foi capaz de aumentar o *turnover* de noradrenalina no hipotálamo de maneira semelhante àquela descrita neste trabalho para os animais do grupo experimental. Neste sentido e, como comentado acima, o estresse ativa o *locus coeruleus* e a ativação deste núcleo é acompanhada por um aumento de atividade do SNAS. Esta ativação simpática responde por grande parte das modificações autonômicas periféricas induzidas pelo estresse como, por exemplo, aquelas detectadas no sistema cardiovascular e respiratório. Estas mudanças quando empreendidas de modo correto são importantes para o planejamento e execução de adaptações que podem ser relevantes para a sobrevivência dos organismos (SVENSSON, 1987).

Neste sentido, sabe-se que algumas fibras do SNAS inervam órgãos linfóides (MADDEN; FELTEN, 1995) entre eles o baço. Estudos realizados em modelos animais mostram que a administração local ou sistêmica de agonistas de receptor adrenérgico α_1 induzem constrição do baço com concomitante aumento dos níveis de hemoglobina, hematócrito e número de eritrócitos no sangue (OJIRI, et al., 1993). Fármacos simpatomiméticos, como a cocaína mimetizam estes efeitos em animais e humanos (SATO et al., 1995; SIEGEL et al., 1997, SHANNON; MANDERS; SHEN 1995; KAUFMAN et al., 1998). Esses dados vão de encontro aos nossos, uma vez que observamos diminuição do peso relativo do baço e aumento dos níveis de hemoglobina, hematócrito e número de eritrócitos no sangue.

Além disso, já se descreveu uma supressão da proliferação de linfócitos sanguíneos independente da atividade do eixo HHA, tendo sido ela atribuída a ações desencadeadas pelos sistemas catecolaminérgicos centrais e periféricos

(KELLER et al., 1988). Desta forma, parece-nos possível que as alterações imunes observadas em nosso trabalho também possam ser decorrentes em parte da ativação do SNAS. Além disso, é provável que a ativação do SNAS tenha sido responsável pela hipersensibilidade, piloericação e aumento de salivação por nós observadas nos camundongos após tratamento com MDMA. Essa hipótese pode ser explicada pelo fato que o MDMA também exerce ação direta sobre vários tipos de receptores, incluindo receptores serotoninérgicos 5-HT₂, muscarínicos M₁, adrenérgicos α_2 e β e receptores de histamina H₁ (COLE; SUMNALL, 2003; GREEN et al., 2003; CONNOR, 2004).

Alguns estudos têm demonstrado que os efeitos imunossupressores causados por MDMA não são mediados por ação direta do fármaco em células mononucleares do sangue periférico após desafio com LPS (CONNOR, 2004; CONNOR et al., 2000). Até então, nada havia sido relatado a respeito da ação direta deste fármaco sobre a atividade de neutrófilos. Em nosso trabalho verificamos que a exposição *in vitro* de neutrófilos ao MDMA não foi capaz de mimetizar os efeitos sobre a atividade destas células induzidos *in vivo*, sugerindo que estes efeitos não são mediados por uma ação direta do fármaco.

Diante dos achados podemos sugerir que o MDMA foi capaz de alterar diferentes parâmetros comportamentais, principalmente locomotores, devido a ativação da via nigroestriatal. Além disso, pode ser considerado como tendo atividade semelhante a um estressor químico, pois aumentou a liberação de corticosterona, que possivelmente induziu os efeitos observados sobre a atividade de neutrófilos, uma vez que não foram observados efeitos diretos do fármaco sobre estas células. Todavia, não podemos descartar que a diminuição da atividade de neutrófilos seja decorrente de uma ativação do SNAS.

Por fim é importante ressaltar que os efeitos por nós observados foram dependentes da dose de MDMA e do tempo decorrido após sua administração.

8. CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos é possível afirmar que as doses de 5,0; 8,0; 10,0 e 20,0 mg/kg de MDMA produziu 30 minutos após a administração i.p.:

- ✓ Aumento da atividade locomotora avaliada no campo aberto e no LCE;
- ✓ Diminuição do *burst* oxidativo de neutrófilos após indução por *Staphylococcus aureus* (doses de 8,0; 10,0 e 20,0 mg/kg);

Adicionalmente, 60 minutos após a administração i.p. de 10,0 mg/kg de MDMA observou-se:

- ✓ Aumento de atividade locomotora avaliada no campo aberto e no LCE;
- ✓ Diminuição do *burst* oxidativo após indução por SAPI e PMA e, também, da porcentagem e da intensidade de fagocitose por neutrófilos sanguíneos;
- ✓ Aumento dos níveis séricos de corticosterona;
- ✓ Diminuição dos níveis de noradrenalina e 5-HIAA e aumento daqueles de HVA; diminuição do *turnover* de serotonina e aumento daqueles de noradrenalina e de dopamina no hipotálamo;
- ✓ Aumento dos níveis de VMA, dopamina, DOPAC, HVA e 5-HIAA; e aumento do *turnover* de dopamina no estriato;
- ✓ Aumento do número de eritrócitos, da quantidade de hemoglobina e da porcentagem do hematócrito; e diminuição do número de linfócitos sanguíneos;
- ✓ Diminuição do número total de células na medula óssea; aumento do número de leucócitos no baço e aumento do peso relativo do baço.

O MDMA não produziu alterações *in vitro* quer do *burst* oxidativo quer da fagocitose por neutrófilos.

Em seu conjunto, esses resultados sugerem que o MDMA produza ao mesmo tempo alterações comportamentais (aumento da atividade locomotora), neuroquímicas, endócrinas e imunológicas em camundongos, provavelmente por atuar de forma análoga a um estressor químico. Os achados sugerem que a estimulação da atividade motora dos animais possa estar relacionada ao aumento induzido pelo fármaco na atividade catecolaminérgica central e, muito especialmente, naquela do sistema dopaminérgico estriatal. Também é possível sugerir que a alteração da atividade de neutrófilos após MDMA possa estar relacionada ao aumento da atividade noradrenérgica hipotalâmica e/ou ao aumento de atividade do eixo HHA e, conseqüentemente, dos níveis séricos de corticosterona. Não se descarta, porém, uma possível participação do SNAS nesse fenômeno.

Quer nos parecer, assim, sejam esses dados extremamente relevantes porque mostram ter o MDMA não apenas efeitos comportamentais (que levam o usuário à busca incessante pelo fármaco), mas também outros (não tão desejáveis e esperados) e que se manifestam, em curto espaço de tempo, sobre a esfera imunológica, em especial, sobre a atividade imune inata e que carregariam potencial para aumentar a susceptibilidade dos usuários a doenças infecciosas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹²

ABE, Y.; SERIYA, S.; YAMASHITA, T.; SENDO, F. Vascular hypermeability induce by tumor necrosis factor and it's augmentation by IL-1 and IFN-gama is inhibited by selective depletion of neutrophils with a monoclonal antibody. **Journal of Immunology.**, Nov 1; 145(9): 2902-07, 1990.

ABERCROMBIE. E. D.; KELLER, R.W.; ZIGMOND, M.J. Characterization of hippocampal norepinephrine release as measured by microdialysis perfusion: pharmacological and behavioral studies. **Neuroscience**, v. 27, 897-904, 1988.

ADAMEC, R.E.; SHALLOW, T. Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. **Physiology and Behaviour.** v. 54, p.101-109, 1993.

ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophages activation. **Annual Review Immunology**, v.2, p. 283-318, 1984.

ADER, R. On the development of psychoneuroimmunology. **European Journal of Pharmacology**, v. 405, p. 167-176, 2000.

ADER, R.; GROTA, L. J.; COHEN, N. Conditioning on immune responses. In: ADER, R.; FELTEN, D. L.; COHEN, N. (Eds). **Psychoneuroimmunology**. San Diego: Academic Press, p. 611-640, 1991.

ALLEN, R. C. Biochemiexcitation: chemiluminescence and study of biological oxygenation reactions. In: ADAM, W.; CILENTO, G. (Eds.) **Chemical and biological generation of excited states** New York: Academic Press, p. 309, 1982.

ALVES, G.J. **Coabitação com um parceiro doente: conseqüências sobre o comportamento, a atividade imune inata e o crescimento tumoral**. 2005. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

ALVES, G.J.; VISMARI, L.; FLORIO, J.C.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a sick cage mate: Effects on noradrenaline turnover and neutrophil activity. **Neuroscience Research**. Oct; 56 (2): 172-9, 2006.

ARCHANA, R.; NAMASIVAYAM, A. The effect of acute noise stress on neutrophil functions. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**. Oct; 43 (4): 491-5, 1999.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**. v. 21, p. 205-235, 1973.

¹² De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AUTELITANO, D. J.; LUNDBLAD, J. R.; BLUM, M.; ROBERTS, J. L. Hormonal regulation of POMC gene expression. **Annual Review of Physiology**, v. 51, p.715 - 726, 1989.

AXELROD, J. & REISINE, TD. Stress hormones: their interaction and regulation. **Science**, Review, May 4;224 (4648): 452-9, 1984.

BADWEY, J.A.; TAUBER, A.I.; KARNOVSKY, M.L. Properties of NADH-cytochrome-b5 reductase from human neutrophils. **Blood**, v. 62(1), p. 152-157, 1983.

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 Research**, v. 994, p.203-215, 2003.

BARNETT, S.A. Behaviour of wild rats in the laboratory. **Medicine and Biology Illustrate**, v. 6, p.104-111, 1956.

BARNETT, S.A. Exploratory behaviour. **British Journal of Psychology**, v. 49, p.289-310, 1958.

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

BASSO, A .S.; COSTA PINTO, F.A.; RUSSO, M.; BRITTO, L.R.G.; SÁ-ROCHA, L.C.; PALERMO NETO, J. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **Journal of Neuroimmunology**, v.140, 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 Research**, v. 1009, n. 1-2, p. 181 – 188, 2004.

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

BASSOE, C. F.; LAERUM, O. D.; SOLBERG, C. O.; HANEBERG, B. Phagocytosis of bacteria by human leucocytes measured by flow cytometry. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 174, p. 182-186, 1983a.

BEKESI, G.; RACZ, K.; HRABAK, A.; KAKUCS, R.; VARBIRO, S.; MAGYAR, Z.; FEHER, J.; DINYA, E.; PAZMANY, T.; PAKU, S.; SZEKACS, B. Systematic investigation of different steroid precursors with respect to their effect on superoxide anion production by human neutrophil granulocytes. **Hormonic and Metabolic Research**, Mar;36(3):155-63, 2004.

BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behavior Brain Research**, v. 125, p.141-149, 2001.

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

BERNARDI, M.M. **Haloperidol e Atividade Geral**. 1978. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1978.

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

BESEDOVSKY, H. O.; SORKIN, E.; FELIX, D.; HASS, H. Hypothalamic changes the during immune response. **European Journal of Immunology**, v.7, p. 323-325, 1977.

BIRGEL, E. H. **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, p.260, 1982.

BRINES, R. Neuroendocrine Immunology Today. **Immunology Today**, v.15, n.11, p. 503, 1994.

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**, v. 173, p. 326-36, 2004.

CABRAL, G.A.; DOVE PETTIT, D.A. Drugs and immunity: cannabinoids and their role in decreased resistance to infectious disease. **Journal of Neuroimmunology**, v.83, p. 116-123, 1998.

CALLAWAY, C.W.; WING, L.L.E.; GEYER, M.A. Serotonin release contributes to the locomotor stimulant effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in rats. **The Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, v.254, n.2, p.456-64. 1990.

CASSATELA, M.A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunology Today**, v.16, p. 21-6, 1995.

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

CHARNEY, D.S.; HENINGER, G.R. Noradrenergic function and the mechanism of action of antianxiety treatment. I. The effect of long-term alprazolam treatment. **Archives of General Psychiatry**, May;42(5):458-67, 1985.

CHESON, B.D.; CHRISTENSEN, R.L.; SPERLING, R.; KOHLER, B.E.; BABIOR, B.M. The origin of the chemiluminescence of phagocytosing granulocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v.58, p. 789-96, 1976.

COLE, J.C.E.; SUMNALL, H.R. Altered states: the clinical effects of Ecstasy. **Pharmacology and Therapeutics**, v.98, n.1, p.35-58. 2003.

CONNOR, T.J.; HARKIN, A.; KELLY, J.P. Methylenedioxymethamphetamine suppresses production of the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α independent of a beta-adrenoceptor-mediated increase in interleukin-10. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Jan, 312(1), p.134-143, 2005.

CONNOR, T.J. Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'Ecstasy'): a stressor on the immune system. **Immunology**, v.111, p.357-67, 2004.

CONNOR, T.J.; DENNEDY, M.C.; HARKIN, A.; KELLY, J.P. Methylenedioxymethamphetamine-induced suppression of interleukin-1 β and tumour necrosis factor- α is not mediated by serotonin. **European Journal of Pharmacology**, Apr 20;418(1-2):147-52, 2001.

CONNOR, T.J.; KELLY, J.P.; MCGEE, M.E.; LEONARD, B.E. Methylenedioxymethamphetamine (MDMA; Ecstasy) suppresses IL-1 β and TNF- α secretion following an in vivo lipopolysaccharide challenge. **Life Science**, v.67, n.13, p.1601-12. 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.253-60. 1998.

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

COSTA, F. G.; FRUSSA-FILHO, R.; FELICIO, L. F. The neurotensin receptor antagonist, SR48692, attenuates the expression of amphetamine-induced behavioural sensitisation in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 428, p. 97-103, 2001.

DAWSON, G.R.; CRAWFORD, S.P.; COLLINSON, N.; IVERSEN, S.D.; TRICKLEBANK, M.D. Evidence that the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze are confounded by increases in locomotor activity. **Psychopharmacology**, v. 118, p. 316-23, 1995.

DE LA TORRE, R.; FARRE, M. Neurotoxicity of MDMA (ecstasy): the limitations of scaling from animals to humans. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.25, n.10, p.505-8. 2004.

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**, Aug 15;157(4):1638-44, 1996.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1 and interleukin antagonism. **Blood**, v. 77, p. 1627-52, 1991.

DOMINGUES-JUNIOR, M.; PINHEIRO, S.R.; GUERRA, J.L.; PALERMO-NETO, J. Effects of treatment with amphetamine and diazepam on Mycobacterium bovis-induced infection in hamsters. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v.22, n.3, p.555-74. 2000.

DUBRAVEC, D.B.; SPRIGGS, D.R.; MANNICK, J.A.; RODRICK, M.L. Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 6758-61, 1990.

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 Research**, v.987, n.2, p.144-54. 2003.

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**, Dec;52(4):595-638, 2000.

ENGLER, H., BAILEY, M.T., ENGLER, A., SHERIDAN, J.F. Effects of repeated social stress on leukocyte distribution in bone marrow peripheral blood and spleen. **Journal of Neuroimmunology**, v.148, p.106-115, 2004.

FELICIO, L.F.; FLORIO, J.C.; SIDER, L.H.; CRUZ-CASALLAS, P.E.; BRIDGES, R.S. Reproductive Experience Increases Striatal And Hypotalamic Dopamine Levels In Pregnant Rats. **Brain Research Bulletin**, v.40, n. 4, p. 253-256, 1996.

FILE, S.E. The rat corticosterone response: habituation and modification by chlordiazepoxide. **Physiology and Behavior**, v. 29, p. 91-95, 1982.

FILE, S.E. Tolerance to the behavioral actions of benzodiazepines **Neuroscience Biobehavior Reviews**, v. 9, p. 113-121, 1985.

FILE, S.E.; BRILEY, M. **New concepts in anxiety**. McMillan Press, London, UK. 1991.

FLORIO, J.C.; SAKATE, M.; PALERMO-NETO, J. Effects of amitraz on motor function. **Pharmacology and Toxicology**, v. 73, p.109-114, 1993.

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

FONSECA, E.S.; SAKAI, M.; CARVALHO-FREITAS, M.I.; PALERMO-NETO, J. Naloxonetreatment prevents prenatal stress effects on peritoneal macrophage activity in mice offspring. **Neuroendocrinology**, 81(5):322-8, 2005.

FRIEDMAN, H.; NEWTON, C.; KLEIN, T.W. Microbial infections, immunomodulation, and drugs of abuse. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, p. 209-219, 2003.

GAVRILIN, M.A.; MATHES, L.E.; PODELL, M. Methamphetamine enhances cell-associated feline immunodeficiency virus replication in astrocytes. **Journal of Neurovirology**, v. 8, p. 240-249, 2002.

GLAVIN, G. Intramesolimbic dopamine D1 receptor activation reduced stress gastric lesions and gastric acid secretion. **Int. J. Exp. Clin. Gastroenterol.**, v.1, p.55-60, 1991.

GLAVIN, G.B.; TANAKA, M.; TSUDA, A.; KOHNO, Y.; HOAKI, Y.; NAGASAKI, N. Regional rat brain noradrenaline turnover in response to restraint stress. **Pharmacol Biochemistry and Behavior**, Aug;19(2):287-90, 1983.

GOH, K.; FURUSAWA, S.; KAWA, Y.; NEGISHI-OKITSU, S.; MIZOGUSHI, M. Production of interleukin-1-alpha and beta by human peripheral polymorphonuclear neutrophils. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v.88, p. 297-303, 1989.

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"). **Pharmacology Reviews**, v.55, n.3, p.463-508. 2003.

GROSSEN, N.E.; KELLEY, M.J. Species-specific behavior and acquisition of avoidance behavior in rats. **Journal Comparative and Physiological Psychology**, v.81, p. 307-310, 1972.

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 Research**, v. 87, p. 21-7, 1999.

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

HALLER, C.A. St John's wort, depression, and catecholamines. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v.76, p.393-395, 2004.

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

HAMMOND B.; HESS M.L., The oxygen free radical system: potential mediator of myocardial injury. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 6(1), p. 215-220. 1985.

HARKIN, A.; SHANAHAN, E.; KELLY, J.P.; CONNOR, T.J. Methylenedioxymphetamine produces serotonin nerve terminal loss and diminished behavioural and neurochemical responses to the antidepressant fluoxetine. **The European Journal of Neuroscience**, v.18, n.4, p.1021-7. 2003.

HARRIS, J.G.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Endogenous corticosteroids mediate the neutrophilia caused by platelet-activating factor in the mouse. **The European Journal of Pharmacology**, Sep 5; 283 (1-3): 9-18, 1995.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 117, p. 53-58, 1985.

HEGADOREN, K.M.; BAKER, G.B.; BOURIN, M. 3,4-Methylenedioxy analogues of amphetamine: defining the risks to humans. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v.23, n.4, p.539-53. 1999.

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

HUETHER, G.; ZHOU, D.; RUTHER, E. Causes and consequences of the loss of serotonergic presynapses elicited by the consumption of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") and its congeners. **Journal of Neural Transmission**, v.104, n.8-9, p.771-94. 1997a.

HUETHER, G.; ZHOU, D.; RUTHER, 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. **Journal of Neural Transmission**, v.104, n.10, p.993-1004. 1997b.

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.

IZAKOVIC, V.; LUKAC, J. Tetrasomy X (karyotype 48, XXXX) in a 2 and one-half year old girl. **Ceskoslovenska Pediatrie**, v. 28, n. 2 p. 77 – 79, 1973.

JACKSON, E.A.; KELLY, P.H. Role of nigral dopamine in amphetamine-induced locomotor activity. **Brain Research**, v. 278, p. 366-369, 1983.

JACOBS, B. L. Locus coeruleus neuronal activity in behaving animals. In: Heal, D. J. Marsden, C. A. (Eds.). **The pharmacology of noradrenaline in the central nervous system**. New York: Oxford University Press, p. 248-265, 1990.

JACOBS, B. L.; FORNAL, C. A. Serotonin and Behavior. In: BLOOM, F. E.; KUPFER, D. J. **Psychofarmacology the Fourth Generation of the Progress**. 4. ed. Raven, p. 461-469, 1995.

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. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, 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, p.1393-5, 1979.

JOHANNISSON, A.; GRONDAHL, G.; DEMMERS, S.; JENSEN-WAERN, M. Flow-cytometric studies on the phagocytic capacities of equine neutrophils. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 36, p. 553-562, 1995.

KANKAANPAA, A.; MERIRINNE, E.; LILLSUNDE, P.; SEPPALA, T. The acute effects of amphetamine derivatives on extracellular serotonin and dopamine levels in rat nucleus accumbens. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 59, p. 1003-1009, 1998.

KAUFMAN, M.J.; SIEGEL, A.J.; MENDELSON, J.H.; ROSE, S.L.; KUKES, T.J.; SHOLAR, M.B.; LUKAS, S.E.; RENSHAW, P.F. Cocaine administration induces human splenic constriction and altered hematologic parameters. **Journal of Applied Physiology**, v.85, p. 1877-18883, 1998.

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, A. E. Locomotor activity and exploration. In: VAN HAAREN, F. **Methods in behavioral pharmacology**, Elsevier Science Publishers B. V. p.499-518, 1993.

KLEIN, T.W.; FRIEDMAN, H.; SPECTER, S. Marijuana, immunity and infection. **Journal of Neuroimmunology**, v.83, p. 102-115, 1998.

KOCH, S.; GALLOWAY, M.P. MDMA induced dopamine release in vivo: role of endogenous serotonin. **Journal of Neural Transmission**, v.104, n.2-3, p.135-46. 1997.

KUT, J. .; 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. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v.14, n.4, p.783-96. 1992.

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 Science**, v. 78, p. 3027-3034, 2006.

LAZZARINI, R.; MALUCELLI, B.E.; MUSCARA, M.N.; DE NUCCI, G.; PALERMO-NETO, J. Reduction of inflammation in rats by diazepam: tolerance development. **Life Science**, Apr 11;72(21):2361-8, 2003.

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

LEHRER, R.; GANZ, T.; SELSTED, M.E.; BABIOR, B.M.; CURNUTTE, J.T. Neutrophils and host defense. **Annals of Internal Medicine**, v. 109, p. 127-42, 1988.

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

LIGEIRO-OLIVEIRA, A.P.; FIALHO DE ARAUJO, A.M.; LAZZARINI, R.; SILVA, Z.L.; DE NUCCI, G.; MUSCARA, M.N.; TAVARES DE LIMA, W.; PALERMO-NETO, J. Effects of amphetamine on immune-mediated lung inflammatory response in rats. **Neuroimmunomodulation**, v.11, n.3, p.181-90. 2004.

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

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, 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. **Immunology Today**, v. 13, p. 169-172, 1992.

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

LUPARELLO, T. J.; STEIN, M.; PARK, C. D. Effect of hypothalamic lesions on rat anaphylaxis. **The American Journal of Physiology**, v. 207, p. 911 – 914, 1964.

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

MALDONADO, E.; NAVARRO, J.F. MDMA ("ecstasy") exhibits an anxiogenic-like activity in social encounters between male mice. **Pharmacology Research**, v.44, p. 27-31, 2001.

MALDONADO, E.; NAVARRO, J.F. Effects of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) on anxiety in mice tested in the light-dark box. **Progress in Neuropsychopharmacology Biological Psychiatry**, V.24, p. 463-472, 2000.

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

MARONA-LEWICKA, D.; RHEE, G.S.; SPRAGUE, J.E.; NICHOLS, D.E. Reinforcing effects of certain serotonin-releasing amphetamine derivatives. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.53, n.1, p.99-105. 1996.

MASSOCO, C.O.; PALERMO-NETO, J. Effects of midazolan on equine innate immune response: A flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Sep 15; 95 (1-2): 11-9, 2003.

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

MAURER, H.H.; BICKEBOELLER-FRIEDRICH, J.; KRAEMER, T.; PETERS, F.T. Toxicokinetics and analytical toxicology of amphetamine-derived designer drugs (ecstasy). **Toxicology Letters**, p. 112-113:133-142, 2000.

MCCLAIN, H.; JR.; SAPIENZA, F. The role of abuse liability testing in drug control procedures. **NIDA Research Monograph**, v.92, p.21-42. 1989.

MCEWEN, B.S. Effects of adverse experiences for brain structure and function. **Biological Psychiatry**, v.48, p. 721–731, 2000a.

MCEWEN, B.S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Research**, 886, p. 172–189, 2000b.

MCEWEN, B.S. Protective and damaging effects of stress mediators. **The New England Journal of Medicine**, 338, p. 171–179, 1998.

MCEWEN, B.S.; BIRON, C.A.; BRUNSON, K.W.; BULLOCH, 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, endocrine and immune interactions. **Brain Research, Brain Research Reviews**, V.23, p. 79-133, 1997.

MCKENNA, D.J.; PEROUTKA, S.J. Neurochemistry and neurotoxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). **Journal of Neurochemistry**, v.54, n.1, p.14-22. 1990.

McNAMARA, M.G.; KELLY, J.P.; LEONARD, B.E. Some Behavioural Neurochemical Aspects of subacute ($\pm$)3,4-methylenedioxymethamphetamine administration in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v 52, n3, pp 479-484, 1995.

MECHAN, A.O.; MORAN, P.M.; ELLIOTT, M.; YOUNG, A.J.; JOSEPH, M.H.; GREEN, R. A study of the effect of a single neurotoxic dose of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; "ecstasy") on the subsequent long-term behaviour of rats in the plus maze and open field. **Psychopharmacology**, v.159, p.167-175, 2002.

MELLON, R.D.; BAYER, B.M.; Evidence for central opioid receptors in the immunomodulatory effects of morphine: review of potencial mechanisms of actions. **Journal of Neuroimmunology**, v.83, p 19-28, 1998.

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.; MCGREGOR, I.S. (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'Ecstasy') increases social interaction in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 408, p.41-49, 2000.

NAKAGAWA, R.; TANAKA, M.; KOHONO, Y.; NODA, Y.; NAGASAKI, N. Regional responses to rat brain noradrenergic neurons to acute intense stress. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, 41, 729-732, 1981.

NASH, J.F.; MELTZER, H.Y.; GUDELSKY, G.A. Elevation of serum prolactin and corticosterone concentrations in the rat after the administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 245, p.873-879, 1988.

NATHAN, C. F.; ROOT, R.K. Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages. Dependence on sequential activation and triggering. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 146, p. 1648-1662, 1977.

NAVARRO, J.F.; MALDONADO, E. Acute and subchronic effects of MDMA ("ecstasy") on anxiety in male mice tested in the elevated plus-maze. **Progress in Neuropsychopharmacology Biological Psychiatry**, v.26, p. 1151-1154, 2002.

NAVARRO, J.F.; MALDONADO, E. Behavioral profile of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in agonistic encounters between male mice. **Progress in Neuropsychopharmacology Biological Psychiatry**, v.23, p. 327-334, 1999.

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*. **The International Journal of Neuroscience**, v. 68, p. 283 - 287, 1993.

NOHMI, T.; ABE, S.; TANSO, S.; YAMAGUCHI, H. Suppression of anti-*Candida* activity of murine and human neutrophils by glucocorticoids. **Microbiology and Immunology**, 38(12):977-82, 1994.

NUNEZ-IGLESIAS, M.J.; CASTRO-BOLANO, C.; LOSADA, C. Effects of amphetamine on cell-mediated immune response in mice. **Life Science**, v. 58, p. 29-33, 1996.

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

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 Physiology Scandinavica**, v.149, 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**, v. 145, p. 237-250, 1999.

OTTAWAY, C.A., HUSBAND, A.J. The influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration. **Immunology. Today**, v.15, p. 511 –517, 1994.

PACIFICI, R.; ZUCCARO, P.; FARRE, M.; PICHINI, S.; DI CARLO, S.; ROSET, P.N.; PALMI, I.; ORTUNO, 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. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.965, p.421-433, 2002.

PALENICEK, T.; VOTAVA, M.; BUBENIKOVA, V.; HORACEK, J. Increased sensitivity to the acute effects of MDMA ("ecstasy") in female rats. **Physiology and Behavior**, v. 86, p. 546-553, 2005.

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

PALERMO-NETO, J.; GUIMARÃES, R. Pavlovian conditioning of a lung anaphilatic response. **Life Science**, 68, 611-623, 2000.

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, p. 413-441, 1993.

PAVCOVICH, L. A.; CANCELA, L. M.; VOLOSIN, M.; MOLINA, V. A.; RAMIREZ, O.A. Chronic stress-induced changes in locus coeruleus neuronal activity. **Brain Research Bulletin**, v. 24, p. 293-296, 1990.

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

PELLEGRINO, T.; BAYER, B.M.; In vivo effects of cocaine on immune cell function. **Journal of Neuroimmunology**, v83, p. 139-147, 1998.

PELLOW, S.; CHOPIN, 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. **Journal of Neuroscience Methods**, V.14, p. 149-167, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.24, p. 525-529, 1986.

PEREIRA, B.; COSTA ROSA, L.F.B.P.; SAFI, D.A.; BECHARA, E. J. H.; CURI, R. Hormonal regulation of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in rat macrophages. **Biochemistry and Pharmacology**, v.50, p. 2093-8, 1995.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassay for measurement of superoxide and hydrogen peroxide by macrophages in culture, using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods**, v.49, p. 211-26, 1981.

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

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

RAISUDDIN, S.; SINGH, K. P.; ZAIDI, S.I.A.; SAXENA. A.K.; RAY, P.K. Effects of aflatoxin on lymphoid cells of weaning rats. **Journal of Applied Toxicology**, v.10, n.4, p.245-250, 1990.

RAMSEIER, H.; LICHTENSTEIGER, W.; SCHULUMPF, M. In vitro inhibition of cellular immune responses by benzodiazepine and PK 11195. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 15, p. 557-582, 1993.

REHM, S. R.; GROSS, G. N.; PIERCE, A. K. Early bacterial clearance from murine lungs. Species-dependent phagocyte response. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 66, p. 194-199, 1980.

RICAURTE, G.A.; YUAN, J.; HATZIDIMITRIOU, G.; CORD, B.J.; McCANN, U.D. Severe dopaminergic neurotoxicity in primates after a common recreational dose regimen of MDMA (ecstasy). **Science**, Sep 27;297(5590) p. 2260-2263, 2002.

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.

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

RISDAHL, J. M.; KHANNA, K.V.; PETERSON, P.K.; MOLITOR, T.W. Opiates and infection. **Journal of Neuroimmunology**, v. 83, p. 4-18, 1998.

RITTER, S.; PELZER, N. L. Magnitude of stress-induced brain norepinephrine depletion varies with age. **Brain Research**, v.15, p. 170-175, 1978.

ROBINSON, J. M.; BADWEY, J. A. Production of active oxygen species by phagocytic leukocytes. **Immunology Series**, v. 60, p. 159-178, 1994.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: COOPER, S. J.; HENDRIE, C. A. **Ethology and Psychopharmacology**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, p. 9-44, 1994.

ROOT, R. K.; METCALF, J.; OSHINO, N.; CHANCE, B. H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 55, p. 945, 1975.

ROTHER, G.; VALET, G. Phagocytosis, intracellular pH, and cell volume in the multifunctional analysis of granulocytes by flow cytometry. **Cytometry**, v.9,n.4, p.316-324, 1988.

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

SAKAI, M.; FONSECA, E.S.; OLORIS, S.C.; MATSUZAKI, P.; OTAKE, A.H.; LEITE, K.R.; MASSOCO, C.O.; DAGLI, M.L.; PALERMO-NETO, J. Effects of peripheral-type benzodiazepine receptor ligands on Ehrlich tumor cell proliferation. **European Journal of Pharmacology**, Nov 21;550(1-3):8-14, 2006.

SAMS-DOSS, F. Distinct effects of d-amphetamine and phencyclidine on the social behaviour of rats. **Behavioural Pharmacology**. v.6, p.55-65, 1995.

SANDERS, V.M.; KAVELAARS, A. Adrenergic regulation of immunity. In: ADER, R. Psychoneuroimmunology. San Diego: Elsevier Academic Press. 4th Edition. p. 63-84, 2007.

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

SATO, N.; SHEN, Y.T.; KIUCHI, K.; SHANNON, R.P.; VATNER, S.F. Splenic contraction-induced increases in arterial O₂ reduce requirement for CBF in conscious dogs. **American Journal of Physiology**, 269 (Heart Circ. Physiol, 38), p.H491-H503, 1995.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse noxious agents. **Nature**, p.32. 1936.
SHANNON, R.P.; MANDERS, W.T.; SHEN, Y.T. Role of blood doping in the coronary vasoconstrictor response to cocaine. *Circulation*, v.92, p.96-105, 1995.

SIEGEL, A.J.; SHOLAR, M.B.; KAUFFMAN, M.J.; RENSHAW, P.F.; KUKES, T.J.; McDONALD, J.C.; MENDELSON, J.H. Erythrocythemia ("blood doping") due to splenic contraction after intravenous cocaine (Abstract). **Problems of drug dependence. Proceedings of the 59th Annual Scientific Meeting**. The College on Problems of Drug Dependence. Inc. Washington. DC: US Dept. of Health and Human Services, p. 210 (NIH Publ. N. 98-4305), 1998.

SILVA, F. R.; LAZZARINI, R.; DE SA-ROCHA, L. C.; MORGULIS, M. S.; OLIVEIRA MASSOCO, C.; PALERMO-NETO, J. Effects of acute and long-term diazepam

administrations on neutrophil activity: a flow cytometric study. **European Journal of Pharmacology**, v. 478, n. 2-3, p.97-104, 2003.

SIMSON, P. E.; WEISS, J. M. Altered activity of the locus coeruleus in an animal model of depression. **Neuropsychopharmacology**, v.1, p. 287-295, 1988.

SONG, C.; EARLEY, B.; LEONARD, B.E. Behavioral, neurochemical, and immunological responses to CRF administration. Is CRF a mediator of stress? **Annals of the New York Academy of Sciences**, Dec 29; 771: 55-72, 1995.

STANKEVICIUS, D. “Ansiedade induzida pela picrotoxina: reflexos comportamentais, bioquímicos e sobre a atividade de macrófagos peritoneais.” 2004. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2004.

STEFANSKI, V.,. Social stress in laboratory rats: hormonal responses and immune cell distribution. **Psychoneuroendocrinology**, v. 25, p. 389– 406, 2000.

STEVENSON, J.R.; TAYLOR, R. Effects of glucocorticoid and antiglucocorticoid hormones on leukocyte numbers and function. **International Journal of Immunopharmacology**, 10(1):1-6, 1988.

STONE, D.M.; HANSON, G.R.; GIBB, J.W. Differences in the central serotonergic effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in mice and rats. **Neuropharmacology**, v.26, n.11, p.1657-61. 1987.

STONE, D.M.; STAHL, D.C.; HANSON, G.R.; GIBB, J.W. The effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) on monoaminergic systems in the rat brain. **European Journal of Pharmacology**, v.128, n.1-2, p.41-8. 1986.

SVENSSON, T.H. Peripheral, autonomic regulation of locus coeruleus coeruleus noradrenergic neurons in brain. Putative implications for psychiatry and psychopharmacology. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 1-10, 1987.

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.

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.

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

TREIT, D.; FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.31, p. 959-962, 1988.

TUCKER, G.T.; LENNARD, M.S.; ELLIS, S.W.; WOODS, H.F.; CHO, A.K.; LIN, L.Y.; HIRATSUKA, A.; SCHMITZ, D.A.; CHU, T.Y. The demethylation of methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) by debrisoquine hydroxylase (CYP2D6). **Biochemistry and Pharmacology**, v. 47, p. 1151-1156, 1994.

VELLUCCI, S. V. The effects of ether stress of bethasone treatment on the concentration of noradrenaline and dopamine in various regions of the rat brain. **British Journal of Pharmacology**, v. 60, p. 601-615, 1977.

VENTURA, R.; ALCARO, A.; CABIB, S.; CONVERSI, D.; MANDOLESI, L.; PUGLISI-ALLEGRA, S. Dopamine in the medial prefrontal cortex controls genotype-dependent effects of amphetamine on mesoaccumbens dopamine release and locomotion. **Neuropsychopharmacology**, v.29, p.72-80, 2004.

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

WEISS, S.M.; WADSWORTH, G.; FLETCHER, A.; DOURISH, C.T. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 265-271, 1998.

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

WILKINSON, L. O.; JACOBS, B.L. Lack of responses of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of freely moving cats to stressful stimuli. **Experimental Neurology**, v. 101, p. 445-457, 1988.

YU, Q.; ZHANG, D.; WALSTON, M.; ZHANG, J.; LIU, Y.; WATSON, R.R. Chronic methamphetamine exposure alters immune function in normal and retrovirus-infected mice. **International Immunopharmacology**, v.2, p. 951-962, 2002.

ZANGROSSI, H.; JR.; FILE, S.E. Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor. **Brain Research Bulletin**, v.29, p. 381-388, 1992.

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

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

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