UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA

VIVIANE FERRAZ DE PAULA

N-metil-3,4 metilenodioximetanfetamina (MDMA – *Ecstasy*) diminui a resposta imune inata e a resistência à *Listeria monocytogenes*: papel do eixo HPA e do Sistema Nervoso Simpático

São Paulo
2011

VIVIANE FERRAZ DE PAULA

N-metil-3,4 metilenodioximetanfetamina (MDMA – *Ecstasy*) diminui a resposta imune inata e a resistência à *Listeria monocytogenes*: papel do eixo HPA e do Sistema Nervoso Simpático

Tese apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor 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
2011

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.

Catalogação na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Paula, Viviane Ferraz de.
N-metil-3,4 metilenodioximetanfetamina (MDMA – Ecstasy) diminui a resposta imune inata e a resistência à listeria monocytogeneses: papel do eixo HPA e do sistema nervoso simpático / Viviane Ferraz de Paula; orientador João Palermo Neto. -- São Paulo, 2011.
163 f.
Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Êxtase (Droga) 2. Neuroimunomodulação 3. Neutrófilos 4. Sistema hipófise-suprarrenal 5. Sistema nervoso simpático 6. Infecção experimental animal I. Título.

RM666.M35

Nome: Viviane Ferraz de Paula

Título: N-metil-3,4 metilenodioximetanfetamina (MDMA – *Ecstasy*) diminui a resposta imune inata e a resistência à *Listeria monocytogenes*: papel do eixo HPA e do Sistema Nervoso Simpático.

Tese apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Aprovado em: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Ao Prof. Dr. João Palermo Neto

Não sei o que combina mais com você, uma boa música, um livro ou uma pintura. Às vezes penso o que poderia dar à alguém que prefere dividir o conhecimento que possui, do que tê-lo somente para si. Acredito que meras palavras não possam recompensar todo o aprendizado e a passagem de experiência que me foi oferecida. Você abriu um caminho que tem sido trilhado por muitos de seus orientados e tenho muito orgulho de fazer parte deste grupo. Obrigada por sua obstinação incontida, pela orientação neste trabalho e pelos ensinamentos ao longo destes seis anos e meio, me mostrando sempre o melhor caminho a seguir para alcançar meus objetivos. Espero que receba esta singela homenagem com muito carinho e saiba que mesmo distante lembrarei de você com muito afeto, pois foi você que me guiou pelos caminhos para ser a pesquisadora/professora que hoje sou.

Agradecimentos

À Deus por permitir mais uma conquista em minha vida.

Confia no Senhor de todo o teu coração, e não te estribes no teu próprio entendimento. Reconhece-o em todos os teus caminhos, e ele endireitará as tuas veredas (Pv 3, 5-7).

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido, pela bolsa de doutorado (07/57614-0) e pelos projetos temáticos (04/14128-0 e 09/51886-3) do qual este trabalho faz parte.

Ao Banco Santander, pela bolsa Mobilidade Internacional para o estágio Sanduíche no laboratório de Fisiologia e Biologia Molecular da Universidade de Buenos Aires.

À 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.

À Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz do laboratório de CFU do Hemocentro da UNICAMP por abrir as portas de seu laboratório para realização dos experimentos de infecção experimental.

Aos colegas do laboratório de CFU do Hemocentro da UNICAMP pela ajuda nos experimentos, em especial à pós-graduanda Julia de Souza Queiroz, pelo auxílio e a discussão dos resultados obtidos nos experimentos de infecção experimental.

Ao Dr. Fábio Ribeiro da Silva e à Dra. Carolina Guilherme Prestes Beyrodt, pela confiança que depositaram em mim durante a minha graduação e pelo incentivo a iniciar a pós-graduação.

À médica veterinária responsável do biotério, Dra. Claudia Madalena Cabrera Mori, por nunca ter poupado esforços para manter um ótimo biotério e por disponibilizar os animais para a realização desta tese.

Aos técnicos do laboratório Ricardo (Jibóia), Priscila, Herculano e Vagner e aos técnicos do biotério Idalina, Rosires, Luciana, Nelsinho e Mauro, pela colaboração neste trabalho e pela agradável convivência.

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

À minha mãe Vilma e meu meu irmão Silvio por compreenderem minha ausência e pelo carinho e atenção.

Ao meu esposo Alison Ribeiro pela paciência, compreensão, 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 mais prazerosa e inesquecível com a sua presença.

Ao amigo Rodrigo Vieira pelo auxílio em assuntos burocráticos durante toda esta fase e pela agradável convivência e amizade.

Às amigas Domenica Palomaris e Monica Sakai pela ajuda que deram no início deste trabalho e pela convivência que deixou saudades e boas lembranças.

E por fim não poderia deixar de agradecer a todo o grupo de Neuroimunomodulação e aos grandes amigos que fiz aqui que serão lembrados com muito carinho: Adriana Tiemi Akamine, André Vinicius Siqueira Gomes, Bruno Bueno Honda, Carolina Costola, Denise Kinoshita, Eduardo Zarzana, Emily Baskerville, Luciana Cunha, Luciana Lippi, Luciana Vismari, Milena Lobão Pinheiro, Poliana Ferreira, Renato Couto Moraes, Thiago P. Arrais Aloia, Vinícius Izídio de Almeida e Wanderley M. Quinteiro Filho.

“The mind has great influence over the body, and maladies

often have their origin there."

Molière (1622–1673)

RESUMO

Paula, V. F. **N-metil-3,4 metilenodioximetanfetamina (MDMA – *Ecstasy*) diminui a resposta imune inata e a resistência à *Listeria monocytogenes*: papel do eixo HPA e do Sistema Nervoso Simpático**. 2011. 163f. Tese (Doutorado) – Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2011.

Ecstasy é o nome popular do 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), uma droga de abuso utilizada por adultos jovens. Diversos relatos têm mostrado existência de correlações positivas entre o abuso do *Ecstasy* e o aparecimento de doenças infecciosas. Muitos estudos em modelos animais mostram que o MDMA induz alterações de imunidade inata e adquirida; entretanto pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais estes efeitos ocorrem. Desta forma, buscamos neste trabalho os mecanismos neuroimunes pelos quais o MDMA diminui a atividade de neutrófilos e altera a distribuição de leucócitos nos diferentes compartimentos imunes. Além disso, avaliamos se os efeitos induzidos pelo MDMA afetam a resposta a uma infecção experimental induzida por *Listeria monocytogenes*. Nossos resultados mostram que 60 minutos após a administração de MDMA na dose 10mg/kg, houve 1) diminuição do *burst* oxidativo de neutrófilos induzido por SAPI e PMA e, também, da porcentagem e da intensidade da fagocitose dos neutrófilos sanguíneos; 2) diminuição da celularidade total da medula óssea e aumento da mesma no baço, além de diminuição do peso relativo do baço; 3) aumento na porcentagem de neutrófilos e diminuição na porcentagem de linfócitos sanguíneos; e 4) diminuição da expressão de NFκB de neutrófilos sanguíneos. O tratamento com metirapona ou RU-486 prévio ao tratamento com MDMA foi capaz de inibir 5) os efeitos observados em todos os parâmetros avaliados na diminuição da atividade de neutrófilos; 6) as alterações das porcentagens de neutrófilos e linfócitos sanguíneos e 7) a diminuição da expressão de NFκB. Observamos, ainda, que o tratamento com 6-OHDA ou ICI-118,551 prévio ao tratamento com MDMA 8) não foram capazes de inibir os efeitos induzidos pelo MDMA na atividade de neutrófilos e na contagem diferencial de leucócitos sanguíneos; no entanto, 9) preveniram as alterações de celularidade induzidas por MDMA na medula óssea e no baço, e 10) a diminuição do peso relativo do baço. Por fim, observamos em um modelo de infecção experimental por LM que o MDMA 11) induziu mielosupressão (diminuição do CFU na medula óssea e aumento no baço); 12) diminuiu o número de leucócitos sanguíneos e a celularidade da medula óssea; 13) aumentou a celularidade do baço; 14) diminuiu a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12p70, TNF, IFN-γ, IL-6) e quimiocina (MCP-1) nas primeiras 24 h; e 15) aumentou a produção das mesmas citocinas e quimiocina após 72 h da indução da infecção. Desta forma, concluímos que os efeitos induzidos pelo MDMA sobre a atividade de neutrófilos foram provavelmente mediados pela diminuição da expressão de NFκB induzido pela ação da corticosterona e que a corticosterona, também está envolvida com as alterações na contagem diferencial de neutrófilos e linfócitos. As catecolaminas periféricas responderam pelas alterações na distribuição de leucócitos entre baço e medula óssea, e diminuição do peso relativo do baço. Além disso, o MDMA pode ser considerado uma droga imunossupressora visto que diminuiu a resistência a uma infecção por LM por mecanismos neuroimunes.

Palavras-Chave: MDMA, *Ecstasy*, neuroimunomodulação, neutrófilos, Sistema hipófise-suprarrenal, sistema nervoso simpático, infecção.

ABSTRACT

Paula, V. F. **N-metyl-3,4 methylendioxymethamphetamine (MDMA – Ecstasy) decreases innate immunity response and host resistence to *Listeria monocytogenes*: role for HPA axis and Sympathetic Nervous System**. 2011. 163f. Tese (Doutorado) – Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2011.

Ecstasy is the popular name of 3,4-metylendioxymetamphetamine (MDMA), a drug of abuse mainly used by young adults. Several reports have shown the existence of a positive correlation between *Ecstasy* abuse and increased susceptibility to infectious diseases. Some studies using animal models report that MDMA induces alterations in both innate and adaptive immunity, however little is known about the mechanisms that generate such alterations. Therefore, we sought for neuroimmune mechanisms that could be involved in the previously reported decreasing on neutrophil activity and alteration in the leukocyte distribution. Moreover, we analyzed the host resistance to *Listeria monocytogenes* after MDMA treatment. We show that MDMA (10 mg/kg), 60 min after administration: 1) decreases SAPI and PMA-induced oxidative burst and percentage/intensity of phagocytosis of circulating neutrophils; 2) decreases bone marrow cellularity while increases it in the spleen, and also decreases spleen relative weight; 3) increases neutrophil percentage while decreases lymphocyte percentage in the blood; and 4) decreases NFκB expression on circulating neutrophils. Metyrapone or RU-486 prior to MDMA treatment abrogates 5) the MDMA effects previously reported on neutrophil activity; 6) alterations in the percentage of circulating neutrophils and lymphocytes, and 7) decreasing of NFκB expression. We also show that 6-OHDA or ICI-118,551 prior to MDMA treatment were not able to 8) abrogated the MDMA effects previously reported on neutrophil activity and blood leukocyte differential counts; nevertheless, 9) they abrogated the previously reported alterations on bone marrow and spleen cellularity, and 10) reduction on spleen relative weight. Finally, in a model of host resistance to *Listeria monocytogenes* we show that MDMA: 11) induces myelosuppression by decreasing CFU on bone marrow while increasing it on spleen; 12) decreases circulating leukocytes and bone marrow cellularity; 13) increases spleen cellularity; 14) decreases pro-inflammatory cytokines production (IL-12p70, TNF, IFN-γ, IL-6) and chemokine (MCP-1) after 24h of the infection; and 15) increases the production of the pro-inflammatory cytokines and chemokines previously reported after 72h of the infection. Thus, we conclude that the MDMA effects on neutrophil activity were mediated by the reduction of NFκB expression, and this effect was induced by corticosterone elevation in the serum. Corticosterone is also involved in the alterations on neutrophil and lymphocyte counts. Catecholamines were shown to be involved in the alterations on leukocyte distribution in the bone marrow and spleen, and in the reduction of relative weight of spleen. Additionally, MDMA reduced the host resistance to Listeria monocytogenes. Therefore, MDMA can be considered an immunosuppressive drug and those effects are mediated by neuroimmune mechanisms.

Keywords: MDMA, *Ecstasy*, neuroimmunomodulation, neutrophils, Pituitary-Adrenal System, sympathetic nervous system, infection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (A) Citograma de leucócitos circulantes incubados com PBS de animais do grupo controle. R1=linfócitos; R2=monócitos; R3=neutrófilos. (B) Histograma dos neutrófilos incubados com DCFH. (C) Histograma dos neutrófilos incubados com *S.aureus* realizando fagocitose. 61

Figura 2 – (A) Citograma representando o *gate* na população de neutrófilos sanguíneos. (B) Citograma representando a população de neutrófilos que expressam CD-11b. (C) Citograma representando população de neutrófilos que expressam NFkB p65. (D) Citograma representando população de neutrófilos com dupla marcação: CD11b e NFkB..... 62

Figura 3 – (A) Citograma que ilustra as populações de nanobeads da curva padrão para as diferentes citocinas na concentração de 625 pg/mL. (B) Histograma que ilustra os picos de intensidade de fluorescência para os diferentes populações de nanobeads. Figura adaptada do manual do usuário do CBA mouse inflammation kit – BD Biosciences..... 64

Figura 4 – Esquema de tratamento empregado para manipular os níveis de glicocorticóides previamente à avaliação dos efeitos do MDMA sobre a atividade de neutrófilos de camundongos Balb/C..... 69

Figura 5 – Dosagens dos níveis séricos de corticosterona de animais tratados com metirapona previamente ao tratamento com MDMA. *p<0,05 em relaçãoaos grupos MDMA e Met 100+MDMA e não diferem entre si, #p<0,05 em relação a todos os grupos e não diferem entre si, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=5 animais/grupo. 69

Figura 7 - A administração prévia de metirapona (200mg/kg) impede a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg). A - intensidade de fagocitose, B –. porcentagem de fagocitose. * p<0,05 em relação a todos os grupos, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo. 72

Figura 6 - A administração prévia de metirapona (200mg/kg) impede a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg). A - *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. * p<0,05 em relação a todos os grupos, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo. 72

Figura 8 - Esquema de tratamento empregado para manipular os receptores de glicocorticóides previamente à avaliação dos efeitos do MDMA sobre a atividade de neutrófilos de camundongos Balb/C. 74

Figura 9 - A administração prévia de RU-486 (25mg/kg) impede a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg). A - *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. * p<0,05 em relação a todos os grupos, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=5 animais/grupo. 76

Figura 10 - A administração prévia de RU-486 (25mg/kg) impede a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg). A - intensidade de fagocitose, B –.

porcentagem de fagocitose. * p<0,05 em relação a todos os grupos, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=5 animais/grupo. 76

Figura 11 – A administração de MDMA (10mg/kg) aumenta os níveis de noradrenalina e adrenalina no plasma. A - noradrenalina, B –. adrenalina. * p<0,05 em relação ao grupo salina, Teste t de student. n=10 animais/grupo 78

Figura 12 - Esquema de tratamento para manipulação dos níveis de catecolaminas previamente à avaliação dos efeitos do MDMA sobre a atividade de neutrófilos em camundongos Balb/C..... 79

Figura 13 - A administração prévia de 6-OHDA (200mg/kg) não impede a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg). A - *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. *p<0,05 em relação aos grupos salina, salina+VitC e 6-OHDA e não são diferentes entre si, #p<0,05 em relação aos grupos salina, salina+VitC e 6-OHDA, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo. 81

Figura 14 - A administração prévia de 6-OHDA (200mg/kg) não impede a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg). A - intensidade de fagocitose, B –. porcentagem de fagocitose. *p<0,05 em relação aos grupos salina, salina+vitC e 6-OHDA e não são diferentes entre si, **p<0,05 em relação a todos os grupos, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo. 81

Figura 15 - Esquema de tratamento para manipulação dos níveis de catecolaminas previamente à avaliação dos efeitos do MDMA sobre a atividade de neutrófilos em camundongos Balb/C..... 83

Figura 16 - A administração prévia de 6-OHDA (200mg/kg) não impede a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg). A - *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. *p<0,05 em relação aos grupos salina e 6-OHDA e não são diferentes entre si, #p<0,05 em relação aos grupos salina e 6-OHDA, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo. 85

Figura 17 - A administração prévia de 6-OHDA (200mg/kg) não impede a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg). A - intensidade de fagocitose, B –. porcentagem de fagocitose. *p<0,05 em relação aos grupos salina e 6-OHDA e não são diferentes entre si, #p<0,05 em relação aos grupos salina e 6-OHDA, **p<0,05 em relação ao grupo 6-OHDA, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo. 85

Figura 18 - Esquema de tratamento empregado para manipulação dos receptores de catecolaminas previamente à avaliação dos efeitos do MDMA sobre a atividade de neutrófilos de camundongos Balb/C. 86

Figura 19- Administração prévia de propranolol (20mg/kg) impede a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg). A - *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. *p<0,05 em relação aos grupos salina e Propranolol+MDMA, **p<0,05 em relação a todos os grupos, #p<0,05 em relação ao

grupo salina, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=5 animais/grupo. 88

Figura 20 - A administração prévia de propranolol (20mg/kg) impede a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg). A - intensidade de fagocitose, B –. porcentagem de fagocitose. ** p<0,05 em relação a todos os grupos, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=5 animais/grupo. 88

Figura 21 – Dosagens dos níveis séricos de corticosterona de animais tratados com propranolol previamente ao tratamento com MDMA. *p<0,05 em relação aos grupos salina e propranolol e são diferentes entre si, Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns de múltiplas comparações. n=9 animais/grupo. 90

Figura 22 – Esquema de tratamento empregado para o antagonismo dos receptores β2-adrenérgicos previamente à avaliação dos efeitos do MDMA sobre a atividade de neutrófilos de camundongos Balb/C. 91

Figura 23 - A administração prévia de ICI-118,551 (15mg/kg) não impede a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg). A - *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. * p<0,05 em relação ao grupo controle e não diferem entre si, #p<0,05 em relação ao grupo ICI, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo. 93

Figura 24 - A administração prévia de ICI-118,551 (15mg/kg) não impede a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg). A - intensidade de fagocitose, B –. porcentagem de fagocitose. * p<0,05 em relação ao grupo salina e não diferem entre si, #p<0,05 em relação ao grupo ICI, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo. 94

Figura 25 – A diminuição da expressão de NFκB p65 induzida por MDMA (10mg/kg) é inibida pelo pré-tratamento com metirapona (200mg/kg). *p<0,05 em relação aos demais grupos, dentro do mesmo parâmetro, Teste t-Student, n=7 animais/grupo. (MIF)=média de intensidade de fluorescência. 96

Figura 26 - A administração prévia de metirapona (200mg/kg) não impede os efeitos do MDMA (10mg/kg) sobre a celularidade na medula óssea (A) e no baço (B) e não previne os efeitos do MDMA sobre o peso relativo do baço (C).* p<0,05 em relação aos demais grupos e não diferem entre si. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo. 98

Figura 27 - A administração prévia de RU-486 (25mg/kg) não impede os efeitos do MDMA (10mg/kg) sobre a celularidade na medula óssea (A) e no baço (B) e não previne os efeitos do MDMA sobre o peso relativo do baço (C).#p<0,05 em relação aos grupos salina e RU-486, *****p<0,05 em relação aos demais grupos e não diferem entre si, dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo. 100

Figura 28 – Contagem diferencial de leucócitos sanguíneos. (A) Porcentagem de neutrófilos e (B) porcentagem de linfócitos. . *****p<0,05 em relação ao grupo salina, ** em relação ao grupo MDMA, dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo. 103

Figura 29 - A administração prévia de 6-OHDA (200mg/kg) não impede os efeitos do MDMA (10mg/kg) sobre a celularidade na medula óssea (A) e no baço (B) e não previne os efeitos do MDMA sobre o peso relativo do baço (C).* p<0,05 em relação a todos os grupos, **p<0,05 em relação aos outros grupos e não diferem entre si, #p<0,05 em relação ao grupo controle e não diferem entre si dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo. 105

Figura 30 – A administração prévia de ICI (15mg/kg) previne os efeitos do MDMA (10mg/kg) sobre a celularidade na medula óssea (A) e no baço (B) e previne os efeitos do MDMA sobre o peso relativo do baço (C). *p<0,05 em relação a todos os grupos dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo. 107

Figura 31 - Contagem diferencial de leucócitos sanguíneos. (A) Porcentagem de neutrófilos e (B) porcentagem de linfócitos. . *p<0,05 em relação ao grupo salina e não diferem entre si, dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo. 110

Figura 32 - Esquema de tratamento empregado para avaliar os efeitos da infecção por *Listeria monocytogenes* em camundongos Balb/C tratados com MDMA (10,0mg/kg)..... 112

Figura 33 - Efeitos produzidos pela administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número de CFU-GM da medula óssea de animais não infectados e infectados com dose subletal de LM. * p<0,05 em relação ao grupo salina e não diferem entre si, #p<0,05 em relação ao grupo salina e diferem entre si, dentro do mesmo período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo. Representação gráfica como porcentagem em relação ao grupo controle (salina). 114

Figura 34 - Efeitos produzidos pela administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número de CFU-GM do baço de animais não infectados e infectados com dose subletal de LM. * p<0,05 em relação a todos os grupos, #p<0,05 em relação aos demais grupos e diferem entre si, dentro do mesmo período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo. Representação gráfica como porcentagem em relação ao grupo controle (salina). 114

Figura 35 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a atividade estimuladora de colônias (CSA) no soro de animais não infectados e infectados com dose subletal de LM. *p<0,05 em relação aos demais grupos, #p<0,05 em relação aos grupos salina e MDMA e são diferentes entre si, dentro do mesmo período de tempo. Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo. 117

Figura 36 – Efeitos do tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) sobre a contagem de leucócitos totais no sangue de animais não infectados e infectados com dose subletal de LM. ** p<0,05 em relação ao grupo LM, dentro do memso período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações ou o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo. 121

Figura 37 - Efeitos do tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) sobre a contagem de leucócitos totais no baço de animais não infectados e infectados com dose subletal de LM. #p<0,05 em

relação ao grupo MDMA e não diferem entre si, dentro do mesmo período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações ou o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo. 121

Figura 38 - Efeitos do tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) sobre a contagem de leucócitos totais na medula óssea de animais não infectados e infectados com dose subletal de LM. *****p<0,05 em relação ao grupo salina, #p<0,05 em relação ao grupo MDMA e não diferem entre si, dentro do mesmo período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações ou o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo. 122

Figura 39 - Efeitos do tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) sobre o peso relativo do baço de animais não infectados e infectados com dose subletal de LM. *****p<0,05 em relação ao grupo salina, #p<0,05 em relação ao grupo MDMA e não diferem entre si, dentro do mesmo período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações ou o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo. 122

Figura 40 - Efeitos do tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) sobre a expressão de IL12p70 no soro de animais infectados e não infectados com LM. *p<0,05 em relação ao grupo salina e MDMA não infectados, dentro do mesmo período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo. 126

Figura 41 - Efeitos do tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) sobre a expressão de TNF no soro de animais infectados e não infectados com LM. *p<0,05 em relação ao grupo salina e MDMA não infectados, dentro do mesmo período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo. 126

Figura 42 - Efeitos do tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) sobre a expressão de IFNγ no soro de animais infectados e não infectados com LM. *p<0,05 em relação ao grupo salina e MDMA não infectados, #p<0,05 em relação ao grupo LM, dentro do mesmo período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo. 127

Figura 43 - Efeitos do tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) sobre a expressão de MCP-1 no soro de animais infectados e não infectados com LM. *p<0,05 em relação ao grupo salina e MDMA não infectados, #p<0,05 em relação ao grupo LM, dentro do mesmo período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo. 127

Figura 44 - Efeitos do tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) sobre a expressão de IL-6 no soro de animais infectados e não infectados com LM. *p<0,05 em relação ao grupo salina e MDMA não infectados, #p<0,05 em relação ao grupo LM, dentro do mesmo período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo. 128

Figura 45 - Efeitos do tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) sobre a expressão de IL-10 no soro de animais infectados e não infectados com LM. *p<0,05 em relação ao grupo salina e MDMA não infectados, #p<0,05 em relação ao grupo LM, dentro do mesmo período de

tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo. 128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Efeitos da administração prévia de metirapona (200mg/kg) sobre a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg) 71

Tabela 2 – Efeitos da administração prévia de RU-486 (25 mg/kg) sobre a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg) 75

Tabela 3 – Efeitos da administração de MDMA (10mg/kg) sobre os níveis plasmáticos de noradrenalina e adrenalina de camundongos. 77

Tabela 4 – Efeitos da administração prévia de 6-OHDA (200mg/kg) sobre a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg) 80

Tabela 5 – Efeitos da administração prévia de 6-OHDA (200mg/kg) sobre a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg) 84

Tabela 6 - Efeitos da administração prévia de propranolol (20 mg/kg) sobre a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg) 87

Tabela 7- Efeitos da administração prévia de ICI-118,551 (15mg/kg) sobre a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg) 93

Tabela 8 - Efeitos da administração prévia de metirapona (200mg/kg) sobre a diminuição da expressão de NFκB p65 em neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg) 96

Tabela 9 - Efeitos da administração prévia de metirapona (200mg/kg) sobre as alterações na distribuição de leucócitos induzida por MDMA (10mg/kg) e sobre a alteração induzida no peso do baço 98

Tabela 10 - Efeitos da administração prévia de RU-486 (25mg/kg) sobre as alterações na distribuição de leucócitos induzida por MDMA (10mg/kg) e sobre a alteração induzida no peso relativo do baço..... 100

Tabela 11 - Efeitos da administração prévia de metirapona (200mg/kg) sobre as alterações nas porcentagens de leucócitos sanguíneos induzida por MDMA (10mg/kg)..... 102

Tabela 12 - Efeitos da administração prévia de 6-OHDA (200mg/kg) sobre as alterações na distribuição de leucócitos induzida por MDMA (10mg/kg) e sobre a alteração induzida no peso relativo do baço..... 105

Tabela 13 - Efeitos da administração prévia de ICI 118,551 (15mg/kg) sobre as alterações na distribuição de leucócitos induzida por MDMA (10mg/kg) e sobre a alteração induzida no peso relativo do baço..... 107

Tabela 14 - Efeitos da administração prévia de metirapona (200mg/kg) sobre as alterações nas porcentagens de leucócitos sanguíneos induzida por MDMA (10mg/kg)..... 109

Tabela 15 - Efeitos induzidos pela administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número de CFU-GM da medula óssea e baço de animais não infectados e infectados com dose subletal de LM. 113

Tabela 16 - Efeitos induzidos pela administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a atividade estimuladora de colônias no soro de animais não infectados e infectados com dose subletal de LM. 116

Tabela 17 – Efeitos do tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) sobre a distribuição de leucócitos totais no sangue, baço e medula óssea de animais não infectados e infectados com dose subletal de LM. 120

Tabela 18 - Efeitos do tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) sobre a dosagem de citocinas e quimiocina no soro de animais não infectados e infectados com dose subletal de LM..... 125

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20

2 REVISÃO DE LITERATURA 22

2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO 22
2.2 NEUTRÓFILOS 36
2.3 MODELO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *LISTERIA MONOCYTOGENES* 41

3 OBJETIVOS 49

3.1 OBJETIVO GERAL 49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 49

4 MATERIAIS E MÉTODOS 51

4.1 ANIMAIS: 51
4.2 FÁRMACOS, REAGENTES, CORANTES E SUBSTÂNCIAS BIOLÓGICAS: 52
4.3 MANIPULAÇÃO DA CORTICOSTERONA 55
4.4 MANIPULAÇÃO DAS CATECOLAMINAS NA PERIFERIA 55
4.5 DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA 55
4.6 DOSAGEM DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ADRENALINA E NORADRENALINA 57
4.7 AVALIAÇÃO DA CELULARIDADE DO BAÇO E DA MEDULA ÓSSEA 58
4.8 CONTAGEM DE LEUCÓCITOS TOTAIS E DIFERENCIAL NO SANGUE 59
4.9 CITOMETRIA DE FLUXO 59
4.10 LISTERIA MONOCYTOGENES (LM) 64
4.11 METODOLOGIA DA CULTURA CLONAL DE PRECURSORES HEMATOPOÉTICOS (CFU) DA MEDULA ÓSSEA E DO BAÇO DE CAMUNDONGOS 65
4.12 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESTIMULADORA DE COLÔNIAS (CSA) PARA PRECURSORES DA MEDULA ÓSSEA NO SORO 65

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA 67

6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS 68

6.1 EXPERIMENTO 1 – A METIRAPONA PREVINE OS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE MDMA SOBRE A ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS 68
6.2 EXPERIMENTO 2 – O RU-486 PREVINE OS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE MDMA SOBRE A ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS 73
6.3 EXPERIMENTO 3 – A 6-OHDA NÃO PREVINE OS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE MDMA SOBRE A ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS 77
6.4 EXPERIMENTO 4 – O PROPRANOLOL PREVINE OS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE MDMA SOBRE A ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS 86
6.5 EXPERIMENTO 5 – O ICI-118,551 NÃO PREVINE OS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE MDMA SOBRE A ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS 91
6.6 EXPERIMENTO 6 – A METIRAPONA PREVINE A DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE NFκB P65 INDUZIDA POR MDMA EM NEUTRÓFILOS 95
6.7 EXPERIMENTO 7 – A METIRAPONA NÃO PREVINE OS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE MDMA SOBRE A DISTRIBUIÇÃO DE LEUCÓCITOS E SOBRE O PESO RELATIVO DO BAÇO 97
6.8 EXPERIMENTO 8 – O RU-486 NÃO PREVINE OS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE MDMA SOBRE A DISTRIBUIÇÃO DE LEUCÓCITOS E SOBRE O PESO RELATIVO DO BAÇO 99
6.9 EXPERIMENTO 9 – A METIRAPONA PREVINE A ALTERAÇÃO NA CONTAGEM DIFERENCIAL DOS LEUCÓCITOS SANGUÍNEOS INDUZIDA POR MDMA 101
6.10 EXPERIMENTO 10 – A 6-OHDA NÃO PREVINE OS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE MDMA SOBRE A DISTRIBUIÇÃO DE LEUCÓCITOS E SOBRE O PESO RELATIVO DO BAÇO 104

6.11 EXPERIMENTO 11 - O ICI 118,551 PREVINE OS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE MDMA SOBRE A DISTRIBUIÇÃO DE LEUCÓCITOS E SOBRE O PESO RELATIVO DO BAÇO 106
6.12 EXPERIMENTO 12 – O ICI 118,551 NÃO PREVINE A ALTERAÇÃO NA CONTAGEM DIFERENCIAL DOS LEUCÓCITOS SANGUÍNEOS INDUZIDA POR MDMA 108
6.13 EXPERIMENTO 13 - O MDMA INDUZ MIELOSSUPRESSÃO EM ANIMAIS INFECTADOS COM *LISTERIA MONOCYTOGENES* 111
6.14 EXPERIMENTO 14 – O MDMA NÃO ALTERA A ATIVIDADE ESTIMULADORA DE COLÔNIAS (CSA) DE PROGENITORES DA MEDULA ÓSSEA EM ANIMAIS INFECTADOS COM *LISTERIA MONOCYTOGENES* 115
6.15 EXPERIMENTO 15 – O MDMA INDUZ ALTERAÇÃO NA DISTRIBUIÇÃO DE LEUCÓCITOS NO SANGUE, BAÇO E MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS INFECTADOS COM *LISTERIA MONOCYTOGENES* 118
6.16 EXPERIMENTO 16 – DOSAGEM DE CITOCINAS NO SORO DE ANIMAIS TRATADOS COM MDMA E INFECTADOS COM *LISTERIA MONOCYTOGENES* 123

7 DISCUSSÃO 129

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 147

1 INTRODUÇÃO

O 3,4 metilenodioximetanfetamina (MDMA) foi desenvolvido em 1914 pela Merck Pharmaceuticals como um fármaco inibidor do apetite; no entanto, nunca foi utilizado para este fim. O MDMA é classificado como uma anfetamina alucinógena e, devido às suas propriedades alucinógenas e estimulantes, passou a ser utilizado de forma ilegal por jovens adultos a partir da década de 80, como uma droga de uso recreacional, tornando-se popularmente conhecido como *Ecstasy*. Um relatório técnico da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2003 mostrou a existência de um crescimento no consumo do *Ecstasy* em todo o mundo; dados mais recentes dessa agência 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 a 80 mil. Dados como estes mostram que a situação no Brasil não difere daquela registrada no mundo. De fato, um relatório da Organização das Nações Unidas (ONU) em 2005, classificou o Brasil como o terceiro colocado no ranking de consumo de *Ecstasy* de toda a América do Sul. Em 2007 foram apreendidos em um único dia no aeroporto de Congonhas, em São Paulo, mais de 50.000 comprimidos de *Ecstasy* vindos da Holanda. Dados mais recentes do relatório da ONU 2009, indicam um aumento importante do número de comprimidos apreendidos no Brasil entre os anos de 2007 e 2008; o valor diferencial foi de aproximadamente, 210.000 comprimidos. Segundo a ONU, este aumento está relacionado à descoberta do primeiro laboratório clandestino de Ecstasy no Brasil em 2008.

Diferentes relatos têm mostrado a existência de correlações positivas entre o abuso do *Ecstasy* e a incidência de doenças infecciosas. 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.

Uma variedade de modelos experimentais têm evidenciado a existência de interações bidirecionais entre os sistemas nervoso central e imune. Estas relações constituem o pilar mestre de um ramo da ciência conhecido como neuroimunomodulação ou psiconeuroimunologia. Neste sentido, estudos *in vivo* têm relatado que estados emocionais, como estresse, ansiedade e depressão, bem como fármacos de ação central, como o diazepam e psicoestimulantes, entre eles a anfetamina e o Ecstasy, 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, têm a capacidade de alterar funções imunes, atuando diretamente em células ou órgãos imunes e/ou indiretamente através de vias neuroimunes.

Desta forma, sendo o MDMA uma droga de relevância toxicológica e social, que tem (1) envolvimento com a atividade do sistema nervoso central e com a imunidade e (2) apresentado correlações positivas com incidência de infecções em seus usuários, pareceu-nos relevante buscar pelos mecanismos neuroimunomodulatórios envolvidos com os eventos por nós observados e relacionados à atividade de neutrófilos e redistribuição de células imunes em diferentes compartimentos orgânicos, e avaliar também se estas alterações representariam um efeito imunossupressor, utilizando, para tal, um modelo de infecção experimental por *Listeria monocytogenes.*

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neuroimunomodulação

Há muito tempo se conhecia a existência de uma integração entre o corpo e a mente. Aristóteles, já afirmava que a “psique” (alma) e o corpo reagiam complementariamente 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. Neste sentido, em 1936 Selye, em um trabalho pioneiro, demonstrou que o estresse causava alterações no tamanho do timo, do baço e dos linfonodos (Selye, 1998). No entanto, somente em 1977 foram relatadas as primeiras evidências realmente diretas das relações neuroimunes, entre outros, por Besedovsky et al. que demonstraram ser a ativação do sistema imune capaz de aumentar a razão de disparo de neurônios hipotalâmicos, sugerindo este fato que o cérebro estaria envolvido com a resposta imune (Besedovsky e Sorkin, 1977).

Nos últimos 30 anos a autonomia funcional dos sistemas nervoso e imune tem sido desafiada. As relevantes interações bidirecionais entre esses sistemas acabaram por constituir o pilar mestre de um ramo da ciência conhecido como neuroimunomodulação ou psiconeuroimunologia. Há um tempo não muito distante, quando se introduzia em um trabalho científico noções de neuroimunomodulação era difícil convencer alguns especialistas em imunologia ou em neurociência, que os sistemas imune e nervoso se relacionavam de forma recíproca, isto é, que não funcionavam como sistemas independentes. Nos dias atuais esse descrédito não mais se justifica e vem caindo sistematicamente; a área de neuroimunomodulação estabeleceu-se de forma sólida e tem apresentado muitos e relevantes avanços.

De fato, diversos trabalhos tem demonstrado que o sistema nervoso central (SNC) e o sistema imune (SI) estão intimamente ligados, podendo o SNC exercer efeitos sobre o SI a partir de uma ativação, entre outros, do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Mais especificamente, a ligação ocorre através de hormônios hipotalâmicos e pituitários, como hormônio liberador de corticotrofina (CRH), hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), e glicocorticóides (GC); também, acontece através da inervação simpática e parassimpática dos órgãos linfóides e células imunes (Wrona, 2006). Assim, após um estímulo estressor como, choque nas patas (Fonseca,Massoco e Palermo-Neto, 2002), convivência com companheiro doente (Alves *et al.*, 2006; Alves,Vismari e Palermo-Neto, 2007; Palermo-Neto *et al.*, 2008), restrição de movimento (Cao,Hudson e Lawrence, 2003b) e confronto sociais (Sa-Rocha,Sa-Rocha e Palermo-Neto, 2006); ou estressores químicos, tais como, anfetamina (Ligeiro-Oliveira *et al.*, 2004), picrotoxina (Stankevicius *et al.*, 2008) e MDMA (De Paula *et al.*, 2009), os GC liberados do córtex da adrenal exercem potentes efeitos nas esferas imune/inflamatória.

Por outro lado, sabe-se que a ativação do sistema nervoso simpático (SNS), em resposta a um estímulo estressor afeta de forma direta o sistema imune. De fato, os tecidos linfóides primários e secundários estão inervados por fibras simpáticas pós-ganglionares noradrenérgicas (Felten *et al.*, 1987; Madden,Sanders e Felten, 1995) que mantém íntimo contato com células linfóides possibilitando assim, conexões “sinápticas” da noradrenalina com os leucócitos uma vez que, essas células imunes expressam receptores adrenérgicos em sua superfície. Desta forma, a liberação de catecolaminas pode aumentar (Schedlowski *et al.*, 1993; Madden,Felten *et al.*, 1994; Benschop,Rodriguez-Feuerhahn e Schedlowski, 1996; Dhabhar e Mcewen, 1999; Kohm e Sanders, 1999) ou diminuir (Koff e Dunegan,

1986; Cunnick *et al.*, 1990; Dobbs *et al.*, 1993; Alves *et al.*, 2006) a atividade de células do sistema imune. Adicionalmente, recentes evidências têm demonstrado, também, um importante papel das vias colinérgicas parassimpáticas na comunicação bidirecional entre o cérebro e sistema imune, a denominada Via Colinérgica Antiinflamatória que controla a resposta inflamatória de forma reflexa e não consciente (Borovikova,Ivanova,Nardi *et al.*, 2000; Borovikova,Ivanova,Zhang *et al.*, 2000; Tracey, 2002).

Em contrapartida, o sistema imune é capaz de se comunicar com o SNC através de substâncias produzidas durante processos imune/inflamatórios principalmente citocinas (Berkenbosch *et al.*, 1987; Sapolsky *et al.*, 1987). Algumas destas citocinas, como por exemplo, a IL-1, atuam diretamente no SNC em receptores próprios ou induzindo a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células da glia. Blalock *et al*., em 1985 já haviam descrito que as células do sistema imune eram capazes de sintetizar e secretar hormônios, neurotransmissores e neuropeptídios, similares aos liberados pelo SNC, os quais interagiam com receptores comuns presentes em células do SNC e SI (Blalock, 1985; Blalock,Bost e Smith, 1985).

O núcleo do SNC envolvido com a regulação do eixo HPA é o núcleo paraventricular (NPV) do hipotálamo, a principal fonte de CRH no SNC. Os neurônios hipofisários do NPV projetam-se para a zona externa da eminência mediana, liberando CRH dentro dos capilares do sistema porta hipofisário que vascularizam a pituitária anterior; o CRH liberado liga-se a receptores específicos acoplados à proteína G presentes na superfície dos corticotrofos resultando, esse fato, na estimulação da síntese de ACTH. Uma vez na circulação o ACTH irá induzir a secreção de glicocorticóides pela zona fasciculada do córtex da adrenal (Elenkov

et al., 2000). Esta secreção aumenta na vigência de estímulos estressores de diferentes naturezas e após a administração de análogos sintéticos de GC.

Os GC liberados pelo córtex da adrenal são compostos lipofílicos capazes de atravessar livremente as membranas celulares; seus receptores em sua forma inativada localizam-se no citosol (Ashwell,Lu e Vacchio, 2000; Sapolsky,Romero e Munck, 2000). Os receptores de glicocorticóides (GR) são fatores de transcrição que, uma vez ativados por ligantes, regulam positivamente ou negativamente a expressão de genes alvos (Ashwell,Lu e Vacchio, 2000; De Bosscher,Vanden Berghe e Haegeman, 2000; 2003). A regulação positiva freqüentemente envolve a ligação de homodímeros de GR para elementos de resposta a glicocorticóides (GREs) encontrados em seqüências promotoras de genes alvos de GC. A regulação negativa é independente de uma interação direta dos GR com o DNA, e é exercida através de interferência ou reação cruzada com a atividade de outros reguladores transcricionais. Dentre esses, destacam-se o, NFkB, AP-1 ou membros da família de STAT; que atuam por mecanismos de interações proteína-proteína, um evento chamado transrepressão, onde os GC são capazes de reprimir indiretamente a ativação de genes (Drouin *et al.*, 1993).

As ações imunossupressoras e antiinflamatórias dos GC envolvem a inibição da expressão de genes para citocinas e suas ações pleiotrópicas sobre as células alvo (Liberman,Refojo *et al.*, 2007). De forma geral, a interface neuro-imuno-endócrina é mediada por citocinas que são substâncias sintetizadas e secretadas por diferentes tipos de células e que constituem um componente importante na comunicação entre o sistema imune e os tecidos periféricos, auxiliando as respostas imune inata e adquirida (Dinarello e Mier, 1987; Paul e Seder, 1994; Abbas,Murphy e Sher, 1996). Após um desafio microbiano, por exemplo, um padrão particular de

citocinas induzirá macrófagos residentes a destruir e erradicar patógenos do local da infecção. Por outro lado, a resposta imune adaptativa irá atuar recrutando células T helper (Th) direcionando-as para uma resposta imune celular (Th1) ou humoral (Th2) (Romagnani, 1997; Glimcher e Murphy, 2000). Células Th1 são associadas com a síntese e secreção de IL-2 e IFN-γ (citocinas pró-inflamatórias), já as células Th2 são associadas com secreção de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (citocinas antiinflamatórias). O microambiente gerado pela presença de um padrão característico de citocinas pode influenciar a geração e/ou diferenciação de subtipos distintos de células dendríticas, as quais, mais tarde, iniciarão uma resposta imune específica contra o patógeno (Kovalovsky *et al.*, 2000; Liberman,Refojo e Arzt, 2003; Refojo *et al.*, 2003).

É importante ressaltar que os genes envolvidos na inflamação e ativação imune, tais como, aqueles de citocinas, de receptores para citocinas, de proteínas quimioatraentes e de moléculas de adesão são regulados por AP-1, NFkB e STATs (Jonat *et al.*, 1990; Biola *et al.*, 2000; Nissen e Yamamoto, 2000; De Bosscher,Vanden Berghe e Haegeman, 2003). Neste sentido, sabe-se que o antagonismo exercido pelos GR sobre estes fatores de transcrição é considerado explicativo para as ações imunossupressivas e antiinflamatórias dos GC (Reichardt *et al.*, 2001). O NFkB está presente na maioria das células do sistema imune, incluindo-se aqui os neutrófilos, onde regulam um grande repertório de genes de citocinas inflamatórias. Assim, a inibição do NFkB é importante para a ação antiinflamatória mediada pelos GR (Scheinman *et al.*, 1995). De fato, os GC inibem a produção aguda de citocinas de perfil Th1 e Th2 mas, em última instância, o que fazem é favorecer uma mudança para um padrão de diferenciação de perfil Th2 (Liberman,Druker *et al.*, 2007). Acredita-se que este desbalanço aconteça porque os

GC ativam os GR que bloqueiam a atividade transcricional de T-bet, o principal fator de transcrição envolvido na imunidade celular (Th1), pelo mecanismo de transrepressão, descrito acima (Liberman,Refojo *et al.*, 2007). Além disso, os GC inibem o RNAm, a expressão de proteínas e a ativação transcricional de GATA-3, o fator de transcrição chave envolvido na resposta imune humoral (Th2). Esses efeitos ocorrem através de uma inibição da fosforilação de GATA-3 via PKA/p38 MAPK induzida por AMPc (Liberman *et al.*, 2009). A maior sensibilidade de inibição de T-bet com relação à GATA-3 ajuda a entender a indução do perfil Th-2 exercido pelos GC, principalmente após um estresse crônico ou tratamentos prolongados com GC exógenos (Liberman *et al.*, 2009).

Neste contexto e nos estágios iniciais de uma resposta imune, as células *naive* seriam ativadas e se diferenciariam para fenótipos Th1 ou Th2 conforme o antígeno e o microambiente de citocinas; essa diferenciação seria suprimida na presença de GC, fato que seria consistente com sua ação imunossupressiva geral (Arzt *et al.*, 2000). Portanto, o resultado final de uma resposta adaptativa depende da adequada integração de várias informações em nível intracelular, isto é, das diferenciadas interações moleculares entre citocinas e sinalização por GR.

Do ponto de vista dos efeitos neuroimunes induzidos pela ativação do eixo HPA frente a um estressor, diversos trabalhos já demonstraram que substâncias que atuam no SNC têm a capacidade de influenciar as respostas imunes (Massoco e Palermo-Neto, 1999; Ligeiro-Oliveira *et al.*, 2004; Sakai *et al.*, 2006; Stankevicius *et al.*, 2008; De Paula *et al.*, 2009). Destacam-se, assim, trabalhos que analisaram os efeitos de um tratamento *in vivo* com anfetamina, e que registraram alterações de comportamento e/ou alterações endócrinas concomitantes com alterações produzidas pelo fármaco em parâmetros relacionados à atividade do sistema imune.

Em nosso grupo, Ligeiro-Oliveira et al, (2004) mostraram que ratos sensibilizados com OVA (ovalbumina), uma proteína obtida da clara do ovo, e 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, em decorrência de uma ativação do eixo HPA com conseqüente liberação de corticosterona (Ligeiro-Oliveira *et al.*, 2004). De fato, o pré-tratamento dos animais sensibilizados 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.

Em nosso trabalho desenvolvido durante o mestrado, mostramos que o MDMA (3,4-metilenodioximetanfetamina), uma substância classificada como anfetamina alucinógena e popularmente conhecida como *Ecstasy*, foi capaz de alterar diferentes parâmetros comportamentais, principalmente os locomotores, por atuar na via dopaminérgica nigroestriatal, como observado pelo aumento da atividade dopaminérgica medida no estriato (Ferraz-De-Paula *et al.*, 2011). Além disso, a droga foi considerada como tendo atividade semelhante àquela de um estressor químico, pois aumentou a atividade noradrenérgica no hipotálamo com conseqüente aumento da liberação de corticosterona. Esses fatos, possivelmente, provocaram a diminuição observada da atividade de neutrófilos, células responsáveis pela primeira linha de defesa contra microorganismos. De fato, não observamos efeitos diretos do fármaco sobre estas células em teste realizado *in vitro*, quando incubadas com 667 ng/mL de MDMA, a mesma concentração de MDMA encontrada no plasma dos animais 60 minutos após a administração *in vivo* com 10,0 mg/kg da droga (De Paula *et al.*, 2009).

Diversos trabalhos na literatura demonstraram ser o MDMA capaz de modificar o balanço de citocinas Th1/Th2, favorecendo uma mudança para o perfil Th2 (antiinflamatório) em diferentes modelos experimentais (Connor, 2004); estes dados de literatura podem ser correlacionados com os nossos uma vez que encontramos uma diminuição da atividade de neutrófilos estimulados *in vitro*. Quando ativadas, 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 e Oppenheim, 1992) e a produção e liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio. Desta forma, sabe-se que os neutrófilos possuem duas funções relacionadas à resposta imune-inflamatória: uma função ligada à fagocitose e à destruição dos patógenos, e outra relacionada à liberação de citocinas imunomodulatórias que junto com os macrófagos criam um microambiente favorável para o desenvolvimento de uma adequada resposta imune adquirida.

No contexto da presente revisão em que se analisaram as ações dos GC numa perspectiva neuroimune, faz-se necessário lembrar que um estímulo estressor agudo induz grande, rápida e reversível mudança na distribuição de subpopulações de leucócitos do sangue periférico de ratos, sendo a corticosterona o maior mediador dessas mudanças, por atuar, principalmente, em receptores para esteróides do tipo II (Dhabhar *et al.*, 1996). De fato, o número e a proporção de leucócitos sanguíneos representam uma importante característica do estado de ativação do sistema imune e do padrão de distribuição de células imunes no corpo. Dados de literatura tomados em conjunto com os resultados obtidos em nosso mestrado indicam que a redistribuição de células imunes afeta a capacidade de resposta do sistema imune a um desafio potencial ou já existente.

Como salientamos anteriormente, diversos trabalhos já demonstraram que substâncias que atuam no SNC possuem a capacidade de influenciar as respostas imunes, sendo considerados estressores químicos. De fato, a exposição de animais ao MDMA e seus análogos ativa o eixo HPA (Connor, 2004) e, conseqüentemente, altera alguns parâmetros do sistema imune (Connor *et al.*, 1998; Pacifici *et al.*, 2002; Connor, 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 significante aumento da concentração de corticosterona no plasma. Em 2000, Connor et al., mostraram que a administração aguda de MDMA diminuiu significantemente a secreção de IL-1β e de TNF-α induzida *in vivo* e *in vitro* pelo LPS, uma endotoxina da parede celular bacteriana (Connor *et al.*, 2000). 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].

Diferentes relatos mostraram a existência de correlações positivas entre o abuso do *Ecstasy* e a incidência de doenças infecciosas (Zwick,Fischer e Flanagan, 2005). Estudos em modelos animais mostraram também que o MDMA induz alterações de imunidade inata e adquirida (Pacifici *et al.*, 2002; Connor, 2004); entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais estes efeitos ocorrem. Acreditamos que estes efeitos sejam consequência da ativação de GR após interação com seu ligante, a corticosterona, que assim induziria seus efeitos imunossupressores. Neste sentido, um dos objetivos desse nosso trabalho de doutorado é determinar se o antagonismo farmacológico dos receptores de

[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.

glicocorticóides ou a inibição farmacológica da síntese de corticosterona modificariam os efeitos imunossupressores do MDMA sobre a atividade de neutrófilos e sobre as alterações na redistruição de leucócitos nos diferentes compartimentos orgânicos.

Todavia, não se pode descartar a participação do SNS na diminuição da atividade de neutrófilos e na alteração da distribuição de células imunes entre sangue, baço e medula óssea induzidas pelo MDMA como observado em nosso trabalho de mestrado. Neste sentido, outro objetivo desse trabalho de doutorado é determinar se o antagonismo farmacológico dos receptores adrenérgicos ou a inibição farmacológica da liberação de noradrenalina previnem estes efeitos do MDMA.

Neste contexto, parece-nos relevante discorrer agora sobre a segunda via mais relevante de comunicação entre o SNC e o SI, o SNS. No entanto, segundo Del Rey & Besedovsky, 2008, não podemos nos esquecer nunca que as atividades do eixo HPA e do SNS estão profundamente interconectadas, e também, que o SNS embora chamado “autônomo” é controlado pelo SNC. Assim, não é possível compreender as ações desses sistemas quando tomados isoladamente do resto do corpo (Del Rey e Besedovsky, 2008).

O SNS é um neuromodulador chave das funções cardiovasculares, metabólicas e imunes em resposta ao estresse (Stoddard *et al.*, 1986b; a). Apresenta um papel importante na manutenção da homeostase durante mudanças agudas ou crônicas no estado fisiológico, estas alterações observadas em condições normais ou patofisiológicas, ao longo da vida, incluem a regulação da homeostase do sistema imune (Elenkov *et al.*, 2000). O mensageiro químico do SNS, a noradrenalina (NA), foi originalmente caracterizado pela sua contribuição relevante

na resposta orgânica de “luta ou fuga”. Hoje, sabemos que a NA também atua em células imunes. Nos últimos 30 anos as catecolaminas, adrenalina (A) e NA, têm sido descritas na literatura como importantes imunomoduladores após exposição a um estímulo estressor; por atuarem em adrenoceptores α e β (Kohm e Sanders, 2000; Nance e Sanders, 2007), induzem aumento ou supressão da atividade de células imunes, incluindo-se aqui proliferação celular, produção de citocinas e de anticorpos, atividade lítica e migração celular (Felten *et al.*, 1988; Madden *et al.*, 1989; Madden,Felten *et al.*, 1994; Madden,Moynihan *et al.*, 1994; Madden,Sanders e Felten, 1995; Kelley *et al.*, 1996).

A ativação do SNS em resposta a um estímulo estressor resulta em liberação de catecolaminas da medula da glândula adrenal e dos terminais de inervações simpáticas. Nos anos 80, Felten e colaboradores fizeram a primeira descrição da inervação catecolaminérgica em órgãos linfóides como o timo e o baço de camundongos; mais tarde, suas análises mostraram que as inervações simpáticas também estavam presentes nos linfonodos, na medula óssea e no intestino. Mais que isso, eles descreveram as inervações catecolaminérgicas localizadas em justaposição com células ligadas à imunidade inata e adquirida, formando verdadeiras conexões “sinápticas” com leucócitos individuais (Felten *et al.*, 1987).

As catecolaminas estimulam, com afinidades diferentes, os receptores α e β adrenérgicos presentes na superfície de células imunes (Sanders *et al.*, 1997). Estas interações resultam, de forma geral, em uma inibição da atividade de células associadas com a imunidade inata, tais como, de macrófagos, neutrófilos ou células NK; produzem, ainda, aumento ou inibição da atividade de células associadas com a imunidade adquirida, sendo que a direção do efeito depende do tempo de interação com o antígeno e do estado de ativação das células Th1 (Ramer-Quinn,Baker e

Sanders, 1997; Kohm e Sanders, 2000). Esses efeitos ocorrem porque a NA é capaz de mudar o nível de atividade das células imunes, através de alterações nos níveis de expressão de genes para anticorpos e citocinas. De fato, foi possível observar que em cultura de linfócitos a NA diminuiu a produção das citocinas pró-inflamatórias TNFα, IFNγ, IL-2 e IL-12 (Ramer-Quinn *et al.*, 2000) e, também, que estes efeitos estavam muito provavelmente ligados à inibição da ativação e translocação do fator de transcrição NFκB, via receptor β2 adrenérgico (Farmer e Pugin, 2000). Entretanto, pesquisadores do grupo liderado por Virginia Sanders demonstraram que a NA foi capaz de promover a diferenciação de células T CD4+ naive em células Th1 efetoras, produtoras de IFNγ, mediadas por IL-12 (Kohm e Sanders, 2000).

Com algumas exceções, o SNS tem sido frequentemente considerado como um sistema que exerce principalmente efeitos imunossupressores. Neste sentido, muitos trabalhos de literatura têm descrito resultados contraditórios, não esclarecendo os mecanismos pelos quais os efeitos descritos acontecem. De qualquer forma, estudos *in vivo* e *in vitro*, demonstraram que a NA pode inibir ou estimular uma resposta imune dependendo de inúmeras variáveis, como: o tipo de receptor adrenérgico envolvido, a dose de agonista empregada, o tipo de antígeno para iniciar a resposta imune e os subtipos de células afetadas (Del Rey e Besedovsky, 2008). Por exemplo, mostrou-se que células B expressam duas vezes mais receptores β2 adrenérgicos do que as células T CD4+ ; receptores β2 adrenérgicos estão presentes em quase todas as células do sistema imune, inclusive nos neutrófilos, com exceção dos clones tipo Th2. Já os receptores α2 adrenérgicos somente são expressos em linfócitos T e B, durante estados específicos de doenças (De Blasi,Parruti e Sallese, 1995). Assim, por exemplo, já foram observadas mudanças na expressão de receptores adrenérgicos em linfócitos

em casos de doenças auto-imunes de humanos. Heijnen et al, 1996 identificaram receptores α1 adrenérgicos em linfócitos do sangue periférico de crianças com uma forma severa de artrite reumatóide juvenil (Heijnen *et al.*, 1996). Entretanto, o mecanismo responsável pela expressão diferencial de receptores adrenérgicos em células imunes é também desconhecido. De fato, mostrou-se que várias citocinas e, entre elas, o TNF-α, influenciam a expressão e a sinalização de subtipos de receptores adrenérgicos em células não imunes (Hadri *et al.*, 1997); desta forma, especula-se que o microambiente de citocinas necessário para dirigir uma diferenciação de células em um perfil Th1 ou Th2, influenciaria também os níveis de expressão de receptores adrenérgicos em células do sistema imune.

Sabe-se que os receptores adrenérgicos estão acoplados à proteína G que, após estimulação pela NA, induzem um acúmulo intracelular de AMPc e, consequentemente, uma ativação da PKA (Bylund *et al.*, 1994). Outros estudos têm revelado que a estimulação dos receptores β2 adrenérgicos também ativam mediadores de sinalização intracelular, tais como, PLC, PI-3K, PKC, Btk e MAPK; estes sinalizadores são também ativados por receptores relacionados às células imunes como, receptores de citocinas, receptores de células B (BCRs) e CD40 (Kohm e Sanders, 2000). Neste sentido, alguns estudos têm demonstrado que a estimulação simultânea de receptores adrenérgicos e receptores de células T (TCR) afetam vias de sinalização intracelular comuns (Nance e Sanders, 2007); esse fato explicaria o motivo pelo qual os agonistas adrenérgicos interferem em muitos dos mecanismos envolvidos com as respostas imunes.

O bloqueio farmacológico da inervação simpática em camundongos prolonga a sobrevida destes animais quando infectados com *Staphylococcus aureus*; porém, o tratamento com agonistas adrenérgicos aumenta a mortalidade durante infecções

com bactérias gram-negativas. Rice et al, 2002, demonstraram que a simpatectomia química por 6- hidroxidopamina (6-OHDA), uma substância que destrói terminações nervosas noradrenérgicas, aumentou a porcentagem de neutrófilos no baço e o número de macrófagos peritoneais em camundongos (Rice *et al.*, 2002b; a). Rice et al. 2001, mostraram que a administração de 6-OHDA em camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* diminuiu o número de unidades formadoras de colônias (CFU), aumentou o número de neutrófilos durante a resposta inata e diminuiu o número de linfócitos do baço e a secreção de IL-2 e IFNγ por estas células induzindo, uma diminuição da resposta imune adquirida para a infecção (Rice *et al.*, 2001).

O microambiente de diferentes mediadores em órgãos linfóides como o baço, tem um papel importante nas inter-relações neuroimunes. Citocinas e neurotransmissores liberados de células imunes, exercem efeitos sobre terminais nervosos em um mecanismo de feedback, determinando uma regulação recíproca entre resposta do SI e do SNS. Neste sentido, estudos mostraram que as citocinas produzidas por macrófagos e linfócitos como IL-1, IL-2, IL-6 e TNFα (Straub *et al.*, 1996; Straub,Linde *et al.*, 2000) podem inibir a liberação de NA de terminais pré-sinápticos. Entretanto, outros mediadores como o neuropeptídio Y (NPY) (Straub,Schaller *et al.*, 2000), os opióides endógenos, a β-endorfina, o ATP e a adenosina (Straub *et al.*, 1997; Straub *et al.*, 1998; Straub *et al.*, 2002), estão envolvidos na fina regulação da função das células imunes; o envolvimento destes neurotransmissores, que não serão abordados nesta revisão, reflete a complexidade das vias de interconexões neuroimunes.

Diante de tudo quanto exposto, há solidas evidências que suportam a hipótese de haver uma comunicação direta e bidirecional entre os sistemas

neuroendócrino e imune e, também de que substâncias que atuem no SNC por serem estressores químicos tenham a capacidade de influenciar as respostas imunes. Portanto sendo o MDMA uma droga de relevância toxicológica e social, que tem (1) envolvimento com a atividade do sistema nervoso central e com a imunidade e (2) apresentado correlações positivas com incidência de infecções em seus usuários, pareceu-nos relevante buscar pelos mecanismos neuroimunomodulatórios envolvidos com os eventos por nós observados e relacionados à atividade de neutrófilos e redistribuição de células imunes pelos compartimentos orgânicos. Pareceu-nos também importante avaliar se estas alterações representariam um efeito imunossupressor, utilizando, para tal, um modelo de infecção experimental por *Listeria monocytogenes.*

2.2 Neutrófilos

O sistema imune inato é formado por vários tipos celulares, como por exemplo, monócitos, macrófagos, mastócitos, células NK, células dendríticas e neutrófilos, assim como por vários mediadores solúveis secretados por estas células e pelo sistema complemento. Estas células e mediadores interagem e trabalham juntos para manter um sistema de defesa eficiente contra microorganismos e xenobióticos (Macedo *et al.*, 2007; Kumar e Sharma, 2010; Hebeda,Bolonheis *et al.*, 2011; Hebeda,Pinedo *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2011). Os neutrófilos foram descobertos pelo ganhador do prêmio Nobel de 1908, Ellie Metchnikoff, considerado o pai da imunidade inata celular (Kaufmann, 2008). Desde sua descoberta os neutrófilos são considerados células fagocíticas profissionais e representam a primeira linha de defesa do sistema imune inato contra doenças infecciosas. Eles correspondem a aproximadamente metade dos leucócitos circulantes em muitas

espécies animais e são diferenciados de outros polimorfonucleares por apresentarem núcleos multilobulados e grânulos citoplasmáticos distintos. Estes incluem grânulos primários ou azurófilos, que contém mieloperoxidase (MPO); grânulos secundários ou específicos que não contém MPO; e grânulos terciários, os quais contêm enzimas, proteínas e glicosaminoglicanos que se acredita participem de muitas das funções desta célula (Bainton e Farquhar, 1968b; a).

Os neutrófilos são gerados em grande quantidade na medula óssea, 1- $2x10^{11}$ células por dia em um humano adulto normal, a partir de células tronco mielóides que se proliferam e diferenciam em neutrófilos maduros contendo um arsenal de grânulos (Borregaard, 2010). O fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF) é essencial para a produção de neutrófilos, principalmente durante infecções quando há necessidade de aumento de neutrófilos circulantes, e essa produção é regulada por uma alta taxa de apoptose nos tecidos (Lieschke *et al.*, 1994). O receptor de quimiocina CXCR4 tem um papel importante em manter os neutrófilos na medula óssea durante o estágio de maturação, e é a deleção deste receptor que promove a saída dos neutrófilos da medula óssea para a circulaçao sem afetar o tempo de vida dos neutrófilos circulantes (Lapidot e Kollet, 2002).

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 em pacientes que possuem uma deficiência na adesão de leucócitos, apresentando recorrentes infecções bacterianas e menor expectativa de vida (Anderson e Springer, 1987), devido à uma resposta inflamatória inapropriada para a injúria ou infecção. Os neutrófilos são recrutados rapidamente do sangue circulante para locais de dano

tecidual, por uma cascata de eventos. Para alcançarem o local de entrada do microorganismo os neutrófilos necessitam atravessar a parede vascular (Farsky *et al.*, 2004; Woodfin,Voisin e Nourshargh, 2010); desta forma, as células endoteliais dos vasos sanguíneos são ativadas por estímulos infalamatórios como, TNFα, IL-1β e IL-17 e passam a expressar selectinas (P-selectina, E-selectina) e integrinas (ICAM e VCAM) na superfície luminal dos vasos, que se ligam em seus receptores expressos constutivamente na membrana de neutrófilos (P-selectina ligante 1, E-selectina ligante 1 e L-selectina) promovendo o rolamento e o primeiro contato dos neutrófilos com as células endoteliais (Farsky e Mello, 1995; Farsky,Sannomiya e Garcia-Leme, 1995; Bruehl *et al.*, 1997; Steegmaier *et al.*, 1997; Buscher *et al.*, 2010). Durante este contato inicial ocorre a ativação de vias de sinalização nos neutrófilos que regulam uma forte adesão entre as moléculas de adesão expressas nos neutrófilos (LFA-1 e Mac-1) e os seus ligantes (ICAM-1 e ICAM-2) expressos no endotélio ativado, diminuindo a velocidade de rolamento e permitindo a transmigração destas células até o foco inflamatório (Bunting *et al.*, 2002). Além disso, a células endoteliais ativadas produzem IL-8 e MIP-2 que ativam os neutrófilos (Borregaard, 2010) aumentando a capacidade de espraiamento e fagocitose destas células, passando estes a serem denominados de neutrófilos ativados (Adams e Hamilton, 1984; Farsky e Mello, 1995).

Neste estado de ativação, os neutrófilos são capazes de fagocitar e eliminar microorganismos através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio e através da liberação de proteínas antibacterianas, proteases e outras moléculas com potente atividade antimicrobiana (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). É de amplo conhecimento que os neutrófilos ativados produzem EROs como peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, ânion superóxido e o oxigênio *singlet* (Weiss *et al.*,

1981), que 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 (Witko-Sarsat *et al.*, 2000; Alves *et al.*, 2006; De Paula *et al.*, 2009). 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; Palermo Neto,Massoco e Favare, 2001; Massoco e Palermo-Neto, 2003). O ânion superóxido produzido sob estímulo de neutrófilos é rapidamente convertido em peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, 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 (Allen, 1982). Contudo, a enzima MPO produzida nos grânulos azurofílicos quando combinada com o peróxido de hidrogênio gera hipoclorito que apresenta uma atividade antimicrobiana mais eficaz contra bactérias, fungos e parasitas quando comparada á ação dos radicais livres sozinhos (Oda *et al.*, 1995). É importante salientar que para proteger-se das ações das EROs os neutrófilos produzem enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase e glutationa peroxidase (Pereira *et al.*, 1995).

Embora os neutrófilos tenham uma vida curta de 8 a 20 horas, a exposição destas células a mediadores inflamatórios presentes no meio extracelular como citocinas (IFN-γ, GM-CSF, G,-CSF, TNF-α) ou produtos derivados de bactérias como o LPS ou DNAs bacterianos, podem extender sua vida de maneira significante (Luo e Loison, 2008), permitindo que os neutrófilos apresentem uma sofisticada e

prolongada função regulatória. Além disso, os neutrófilos estimulados estão envolvidos com a síntese e a liberação de citocinas (IL-1, IL-6 e TNF-α) e quimiocinas, em quantidades menores do que as produzidas por macrófagos, monócitos e células dendríticas; mas certamente são uma fonte importante de citocinas em tecidos inflamados (Cassatella, 1999; Yin e Ferguson, 2009), uma vez que os neutrófilos representam o principal tipo celular presente num infiltrado inflamatório agudo. Neste sentido, não nos causa surpresa observar que diversas outras funções além de fagocitose e morte de patógenos, são correntemente atribuídas aos neutrófilos. De fato, 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 de granulócito e macrófago) (Dinarello, 1991). A produção de TNF-α e de IL-1 pelos neutrófilos pode ter funções regulatórias, principalmente na formação do edema inflamatório, devido ao aumento da permeabilidade vascular induzido por essas citocinas (Abe *et al.*, 1990). Além disso, foi demonstrado que sob certas condições inflamatórias neutrófilos humanos (Iking-Konert *et al.*, 2005) e murinos (Oehler *et al.*, 1998) expressam moléculas de MHC classe II (Culshaw *et al.*, 2008) e moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, características de células apresentadoras de antígenos profissionais e são capazes de induzir proliferação de células Th1 e Th17 (Abi Abdallah *et al.*, 2011).

A função dos macrófagos e neutrófilos é sabidamente regulada pela atividade do eixo HPA, tendo este fato recebido considerável atenção (Fonseca,Massoco e Palermo-Neto, 2002; Sa-Rocha,Sa-Rocha e Palermo-Neto, 2006; Stankevicius *et al.*, 2008; De Paula *et al.*, 2009). O eixo HPA regula a função dos fagócitos através da

produção de uma cascata de hormônios em resposta a uma variedade de estímulos, dentre os quais os estímulos estressantes, que resultam, entre outros efeitos, em um aumento da produção de GC pelas adrenais, como descrito anteriormente. Esta resposta fisiológica ao estresse, no entanto, é mediada também pelo SNAS (Ader,Grota e Cohen, 1991; Alves *et al.*, 2006). 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 alterando-se desta forma a capacidade funcional de macrófagos e neutrófilos, que apresentam receptores β-adrenérgicos (Madden,Sanders e Felten, 1995; Kohm e Sanders, 2000).

Portanto, diante da importância da atividade dos neutrófilos na resposta imune inata, do envolvimento do MDMA com a atividade do SNC e dos neutrófilos, pareceu-nos relevante abordar de forma mais aprofundada, aspectos neuroimunológicos do MDMA envolvidos na diminuição da atividade neutrófilos e na resistência a um modelo de infecção experimental.

2.3 Modelo de infecção experimental por *Listeria monocytogenes*

Os primeiros indícios da existência da *Listeria monocytogenes* são muito pobres e antigos. O primeiro relato conhecido é de 1926, quando foi identificado em Cambrigde no Reino Unido, uma bactéria gram-positiva como sendo a causadora de uma doença letal em uma colônia de coelhos que desenvolveram monocitose, ficando a bactéria conhecida como *Bacterium monocytogenes*. Na mesma época, na África do Sul, descreveram uma bactéria gram-positiva como causadora de uma doença letal em gerbil selvagem, que apresentaram uma infecção hepática necrosante; em homenagem a um cirurgião britânico chamado Joseph Lister, o

microorganismo foi denominado *Listeria hepatolítica* (Pamer, 2004). Posteriormente, foi descoberto que os dois microorganismos descritos anteriormente eram idênticos e finalmente o denominaram *Listeria monocytogenes* (Cossart, 2007).

A *Listeria monocytogenes* (LM) é uma bactéria gram-positiva, de replicação intracelular, que está presente no solo e na água, e pode ser encontrada de forma assintomática no trato gastrointestinal de animais e do homem (Gellin e Broome, 1989). A infecção por LM ocorre pela ingestão de alimentos contaminados como laticínios não pasteurizados ou carnes mal cozidas (Cossart e Toledo-Arana, 2008). Os primeiros surtos de infecção humana com LM através de alimentos contaminados aconteceram na década de 80, tornando esta bactéria um dos mais importantes patógenos da época (Ramaswamy *et al.*, 2007). A incidência de listeriose em indivíduos imunocompetentes é menos frequente, podendo causar sintomas de gripe e efeitos gastrintestinais brandos, tais como vômitos e diarréias. Entretanto, em indivíduos imunocomprometidos pode causar infecções severas como septicemia, meningite e meningoencefalite, resultando em morte em aproximadamente 25-30 por cento dos casos (Hamon,Bierne e Cossart, 2006; Ramaswamy *et al.*, 2007). Gestantes são particularmente vulneráveis a infecção por LM, pois podem desenvolver coroamnionite e infecção do feto causando aborto (Bakardjiev,Theriot e Portnoy, 2006; Cossart, 2007). Desta forma, a bactéria é capaz de atravessar as três barreiras do hospedeiro: a barreira intestinal, a barreira hematoencefálica e a barreira materno-fetal.

O modelo experimental de listeriose murina foi desenvolvido por Mackaness (1962), e é considerado altamente reprodutível, tendo sido extensamente utilizado por imunologistas e microbiologistas por se tratar de um modelo muito bem caracterizado e fácil para se estudar os mecanismos celulares envolvidos na defesa

do organismo. O processo envolvido na resistência a esta bactéria é caracterizado inicialmente pela imunidade inata do hospedeiro, com a participação de macrófagos residentes do fígado (células de Kupffer), neutrófilos e células *natural killers* (NK), bem como a produção de IFN-γ e TNF-α, que são essenciais para a ativação da resposta necessária ao controle da replicação bacteriana (Pamer, 2004), seguida por uma resposta específica, garantindo a erradicação do patógeno (Pamer, 2004; Zenewicz e Shen, 2007).

A via natural de infecção por LM é o trato gastrointestinal. A LM invade o organismo após infectar células epiteliais intestinais, através de um processo que requer a interação entre a internalina A, expressa na superfície bacteriana, com a caderina epitelial (E-caderina), expressa na superfície de células epiteliais (Gaillard *et al.*, 1991). A bactéria atravessa a barreira intestinal e se dissemina pela corrente sanguínea atingindo órgãos alvo, como fígado e baço, onde são fagocitadas pelos macrófagos residentes (Lecuit *et al.*, 2001). No fígado, a LM invade os hepatócitos através da expressão de uma outra proteína de superfície, a internalina B, que se liga aos receptores gC1qR/p32 e Met/HGFR, que são receptores de fatores de crescimento presentes nos hepatócitos (Shen *et al.*, 2000; Cossart e Toledo-Arana, 2008). Após a invasão celular, a LM fica aprisionada em um vacúolo e secreta um fator de virulência chamado listeriolisina-O (LLO), que destrói a membrana fagossomal facilitando o escape dos fagossomas para o citoplasma após 30 minutos da invasão (Cossart e Toledo-Arana, 2008). Livre no citosol, dá-se início sua replicação e recrutamento de actina A (ActA), uma proteína de superfície que confere mobilidade à LM e promove a consequente migração da bactéria para as células adjacentes dando início a uma resposta inflamatória inata (Bielecki *et al.*, 1990). A mobilidade da LM no citosol da célula hospedeira, promovida pelos

polímeros de ActA, permite a propulsão da bactéria através do citoplasma até alcançar células vizinhas (Domann *et al.*, 1992; Kocks *et al.*, 1992) e contribui para a virulência da LM; uma vez que bactérias deficientes em Act-A são altamente atenuadas, apesar de induzirem resposta imune inata e resposta adaptativa mediada por células T (Goossens e Milon, 1992). Apesar da via natural de infecção por LM ser a ingestão por via oral e consequente transporte através da barreira intestinal, a maioria dos estudos em laboratório são caracterizados pela indução da resposta imune iniciada pela infecção sistêmica após inoculação de LM pela via intravenosa ou intraperitoneal.

Após a inoculação da LM, 60% das bactérias chegam ao fígado em apenas 10 minutos e os hepatócitos são o principal local de replicação (Mackaness, 1962; Gregory,Sagnimeni e Wing, 1996), sendo que mais de 90% dos hepatócitos são invadidos por LM até 6 horas após a infecção, mantendo-se assim por até 4 dias; declinado-se progressivamente com o aparecimento de uma resposta imune específica (Gregory,Barczynski e Wing, 1992). Múltiplos componentes da resposta imune estão envolvidos na proteção contra a infecção por LM e a resposta imune inata é rapidamente iniciada e essencial para a sobrevivência do hospedeiro infectado, pois controla a replicação do patógeno nos 2-3 primeiros dias da infecção, impedindo seu crescimento (Gregory,Barczynski e Wing, 1992), o que previne a sepse e contribui para a eliminação do patógeno através de uma resposta imune especifícia mediada por células T.

Em camundongos, os neutrófilos representam aproximadamente 15% dos leucócitos circulantes e 1-2% das células não parenquimais no fígado. Durante infecções bacterianas, o efluxo de neutrófilos da medula óssea para a corrente sanguínea e fígado aumenta, sendo que 2 horas após a infecção, 30-50% dos

leucócitos circulantes e 20-45% das células não parenquimais do fígado são neutrófilos. Os neutrófilos são os primeiros tipos celulares a migrarem para o sítio da infecção, através da sinalização de quiomiocinas e expressão de moléculas de adesão que os atraem e retém no sítio da infecção (Drevets, 1997). A correlação entre a magnitude de infiltrado de neutrófilos e o declínio de LM no fígado no estágio inicial da infecção suportam o papel dos neutrófilos na resposta efetora contra a LM extracelular; uma vez que na ausência de infiltrado neutrofílico o número de LM extracelular é maior (Cousens e Wing, 2000). Os neutrófilos contribuem para a resistência anti-bacteriana por secretar citocinas que suprimem a replicação da LM dentro dos hepatócitos, por estimular apoptose dos hepatócitos e por promover a lise de células infectadas impedindo a disseminação da bactéria no fígado (Edelson e Unanue, 2000). A destruição dos hepatócitos infectados permite a exposição da LM para o meio extracelular tornando-a susceptível ao ataque de neutrófilos e macrófagos (Unanue, 1997). Além dos neutrófilos representarem a principal célula efetora na fase inicial da infecção por LM eles também são fonte de IL-12, que estimula as células NK a produzirem e secretarem IFN-γ, sendo essencial para a eliminação da LM, ação esta resultante da polarização do sistema imune para uma resposta adaptativa do tipo Th1 (Emoto *et al.*, 2003). As células de Kupffer também produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-1β, IL-6, IL-12, TNF-α e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), estimulando células NK a secretarem IFN-γ e desenvolverem atividade citotóxica contra as células infectadas (Braun e Cossart, 2000; Cossart e Bierne, 2001; Carryn *et al.*, 2004).

O papel importante da imunidade inata na sobrevivência do hospedeiro infectado por LM já foi demonstrado em estudos utilizando camundongos *knockout*

para IFN-γ (Buchmeier e Schreiber, 1985; Harty e Bevan, 1995) e TNF-α (Havell, 1989) ou para os receptores destas citocinas (Pfeffer *et al.*, 1993; Rothe *et al.*, 1993), que rapidamente sucumbiram à infecção . Além disso, foi demonstrado que camundongos SCID (Bancroft,Schreiber e Unanue, 1991) e NUDE (Nickol e Bonventre, 1977) foram resistentes nos estágios iniciais da doença, mas não eliminaram a bactéria pela falha de imunidade celular e humoral característica destes camundongos. Neutrófilos e macrófagos são considerados os principais mediadores celulares na destruição da LM (Rogers e Unanue, 1993; Conlan e North, 1994), e a depleção de granulócitos utilizando anticorpos específicos anti-GR1 (Czuprynski *et al.*, 1994) aumenta substancialmente a susceptibilidade à infecção por LM . Embora os mecanismos envolvidos na destruição bacteriana pelo recrutamento de granulócitos ou monócitos ainda não estejam completamente definidos, o *burst* oxidativo e a produção de óxido nítrico (NO) pareceu contribuir para a clearance da LM *in vivo;* de fato, segundo Shiloh, et al. (1999) camundongos deficientes em NO sintase induzível (iNOS) apresentam uma diminuição na resistência à infecção por LM.

Altas concentracões de IFN-γ promovem a ativação de macrófagos aumentando suas propriedades antimicrobianas e uma maior expressão das moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC). Isto induz a apresentação de antígenos às células T, as quais promovem uma resposta imune específica e relevante para eliminar a infecção (Pamer, 2004; Zenewicz e Shen, 2007). Os primeiros eventos são essenciais para a sobrevivência de um organismo infectado porque na sua ausência, o crescimento bacteriano acontece de forma muito rápida; por exemplo, camundongos em que estes eventos não aconteceram, morrem dentro de 72 a 96 horas (Braun e Cossart, 2000; Pamer, 2004). No entanto, a resposta que

ocorre nos estágios iniciais da infecção envolvendo neutrófilos, macrófagos e células NK não é suficiente para eliminar a infecção *per se*, sendo necessária a participação dos linfócitos T auxiliares (CD4+) e T citotóxicos (CD8+) (Lara-Tejero e Pamer, 2004). Embora as células Tγδ controlem a resposta inflamatória na infecção por LM (Egan e Carding, 2000), as células T αβ apresentam papel principal no clearance bacteriano e na imunidade protetora a longo prazo. Entre as células T αβ, as células T citotóxicas são as mais importantes para mediar a imunidade protetora, pois promovem a lise das células infectadas, liberando a bactéria para o ambiente extracelular (Harty e Bevan, 1992; Harty,Schreiber e Bevan, 1992), favorecendo sua fagocitose (Portnoy *et al.*, 1989). Estas células exercem esta função através de dois mecanismos sinérgicos: (1) liberação das enzimas perforina e granzima contra a célula alvo, e (2) secreção de IFN-γ para a ativação de macrófagos (Unanue, 1996; 1997; Edelson e Unanue, 2000). As células T auxiliares em um microambiente de IL-12 secretada por macrófagos e IFN-γ secretado pelas células NK podem diferenciar-se em células Th1 (Guleria e Pollard, 2001) que sintetizam mais IFN-γ, amplificando a resposta dos macrófagos (North,Dunn e Conlan, 1997). As citocinas IL-4 (Iizawa,Brown e Czuprynski, 1992) e IL-10 (Flesch e Kaufmann, 1994; Biswas *et al.*, 2007) apresentam um papel supressor nos estágios iniciais da listeriose. A administração do anticorpo monoclonal anti-IL-4 antes da infecção com LM produz aumento da resistência dos animais (Haak-Frendscho *et al.*, 1992). Em relação à citocina IL-10, estudos têm demonstrado que o tratamento com IL-10 desativa a função fagocítica e inibe células T citotóxicas, desencadeando a disseminação da infecção e morte do animal, por indução do perfil antiinflamatório Th2 (Carrero,Calderon e Unanue, 2006; Biswas *et al.*, 2007).

Desta forma, considerando que o estudo da resistência do hospedeiro a infecção por LM constitui um modelo bastante apropriado para a investigação de mecanismos envolvidos na defesa do organismo contra este patógeno, decidimos investigar se os efeitos causados pelo MDMA, diminuição da atividade de neutrófilos e alterações na distribuição de leucócitos, provocariam uma diminuição da resistência orgânica de camundongos a uma infecção experimental por *Listeria monocytogenes*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os mecanismos neuroimunes através dos quais a 3,4 metilenodioximetanfetamina (MDMA ou *Ecstasy*) produz diminuição da atividade de neutrófilos e alterações na distribuição de leucócitos bem como o possível envolvimento desses processos com a diminuição da resistência orgânica a uma infecção experimental por *Listeria monocytogenes* em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Avaliar a participação do eixo HPA e do SNS nos efeitos induzidos pelo tratamento agudo com MDMA (10,0mg/kg) sobre:

- a atividade de *burst* oxidativo e fagocitose por neutrófilos sanguíneos;
- o peso relativo do baço, contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos e contagem de celularidade total do baço e da medula óssea.

3.2.2 Avaliar os efeitos induzidos pelo tratamento agudo com MDMA (10,0mg/kg) sobre:

- a ativação do SNS através de dosagens de noradrenalina e adrenalina plasmáticas;
- a ativação do fator de transcrição NFκB em neutrófilos ciculantes;
- o crescimento de progenitores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na medula óssea e no baço de animais infectados com LM;

- a presença de atividade estimuladora de colônias (CSA) no soro de animais infectados com LM;
- a contagem de leucócitos do sangue e celularidade total da medula óssea e do baço de animais infectados com LM;
- a dosagem de citocinas (TNF-α, IL-6, IFN-γ, IL-12p70 e IL-10) e quimiocinas (MCP-1) no soro de animais infectados com LM.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Neuroimunomodulação do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) e os experimentos de infecção com LM foram realizados no laboratório de CFU do Hemocentro da UNICAMP.

4.1 Animais:

Foram utilizados camundongos machos adultos da linhagem Balb/C, com 8-10 semanas de idade, provenientes de proles obtidas no Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ - USP. Os animais foram utilizados seguindo-se as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório do Comitê de Ética da FMVZ – USP (Protocolo nº 1224/2007).

Antes do início dos experimentos, os animais foram alojados por um período mínimo de 7 dias, em gaiolas de propileno (28 x 17 x 12cm) e em número de no máximo 5 animais por gaiola para adaptação às condições do biotério experimental. Estas gaiolas foram devidamente acondicionadas em salas cuja temperatura ambiente (24 a 26℃) e umidade (65 a 70%) foram man tidas 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. Após um período de adaptação de no mínimo 7 dias, foram realizados os experimentos descritos abaixo.

4.2 Fármacos, reagentes, corantes e substâncias biológicas:

MDMA – Foi extraído e purificado de comprimidos apreendidos pelo Departamento de Investigações sobre Narcóticos (DENARC) da Polícia Civil após autorização judicial, no laboratório de Análises Toxicológicas, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF – USP), com grau de pureza de 99%.O MDMA foi diluído em solução salina (0,9%) e injetado por via intra-peritoneal (i.p.).

RU-486 (Mifepristone) (Sigma®, St Louis, MO, USA) – antagonista dos receptores de glicocorticóides que foi diluído em PEG 400 (polietilenoglicol).

Metirapona (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) – bloqueador da síntese de corticosterona diluído em solução de NaCl 0,9%.

Propranolol (Sigma®, St Louis, MO, USA) – antagonista β-adrenérgico não seletivo que foi diluído em solução de NaCl 0,9%.

ICI-118,551 (Tocris®, Ellisville, MO, USA) – antagonista seletivo β2-adrenérgico que foi diluído em solução de NaCl 0,9%.

6-OHDA (2,4,5 trihydroxyphenethylamine) (Sigma®, St Louis, MO, USA) – neurotoxina que degenera os terminais noradrenérgicos, “depletando” os níveis de noradrenalina, que foi diluída em solução de NaCl 0,9% e ácido ascórbico 0,01%.

LPS (lipopolissarídeo - sorotipo 055:B5) (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) – diluído em RPMI1640 na concentração de 100 ug/mL para estimular a expressão de NFκB em neutrófilos sanguíneos.

Listeria monocytogenes – foi obtida do Laboratório de Microbiologia (Departamento de Patologia Clínica, Hospital das Clínicas, UNICAMP), utilizada para

infectar os animais. As colônias foram diluídas em solução de NaCl 0,9% para obter-se as concentrações apropriadas a serem inoculadas nos animais.

CEPA de Staphylococcus aureus ATCC 25923 (DIFCO®) - Bactéria marcada com iodeto de propídeo utilizada para avaliar a atividade fagocítica realizada por neutrófilos.

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;

Diacetato 2`7`Diclorofluoresceína (DCFH-DA/ Molecular Probes, Eugene, OR, USA) - responsável pela emissão de fluorescência verde após reagir com espécies reativas de oxigênio produzidas pelos neutrófilos . Este reagente foi mantido congelado (-20º C), e protegido da luz, sendo dissolvido em PBS no momento de uso;

PMA - Miristato-acetato de forbol - (Calbiochem®, San Diego, CA, USA) - utilizado como estímulo para desencadear o *burst* oxidativo de neutrófilos.

EDTA (Sigma®, St Louis, MO, USA) - utilizado na técnica de fagocitose, na concentração de 3 mM, com o objetivo de interromper a reação de fagocitose após o período de incubação das amostras;

Solução de NaCl 0,9% - Solução utilizada na diluição dos fármacos empregados nos experimentos;

Solução de NaCl 0,9%+Ácido ascórbico (Vitamina C) – solução antioxidante utilizada como veículo para 6-OHDA;

Soluções de NaCl 0,2% e 1,6% - Soluções utilizadas com o objetivo de realizar a hemólise nas amostras de sangue analisadas no citômetro de fluxo;

Heparina (Liquemine®-Roche, São Paulo, SP, Brasil) – anticoagulante utilizado nas coletas de amostras de sangue;

PBS (Phosfate-buffered saline, pH=7,2-7,4) - Solução utilizada nas técnicas de *burst* oxidativo e fagocitose;

Solução de meio de cultura RPMI – 1641 (Gibco®, Grand Island, NY, USA) – utilizada na coleta do baço e da medula óssea do fêmur dos camundongos;

BHI (Brain heart infusion, Merck®, Darmstadt, Germany) **–** meio de cultura onde são mantidas as alíquotas de *Listeria monocytogenes* em freezer -20° antes de serem cultivadas em ágar sangue.

Ágar-sangue (BioCen do Brasil®, Campinas, SP, Brasil) **–** meio de cultura utilizado para fazer os repiques de *Listeria monocytogenes*.

Bacto-ágar (Difco®) - concentração final 0,6%, utilizado para cultura clonal de precurssores hematopoéticos (CFU) da medula óssea e do baço.

DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium, Sigma®, St Louis, MO, USA) – meio de cultura utilizado para a cultura clonal de precursores hematopoéticos (CFU) da medula óssea e do baço.

Soro Fetal Bovino (Cultilab® – Campinas, SP, Brasil) **–** utilizado para suplementar a cultura de clonal de precursores hematopoéticos (CFU) da medula óssea e do baço.

Azul de TRIPAN (Merck®, Darmstadt, Germany) a 0,1 % - Utilizado para corar as células do baço e medula óssea, para realizar contagem e teste de viabilidade celular.

4.3 Manipulação da corticosterona

Com a finalidade de manipular os níveis séricos e os efeitos da corticosterona administrou-se uma única dose de metirapona (200 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.), e uma única dose de RU-486 (25mg/kg) por via subcutânea, 2 e 1 hora antes do tratamento com MDMA, respectivamente (Cao,Filipov e Lawrence, 2002; Newton *et al.*, 2004).

4.4 Manipulação das catecolaminas na periferia

Com a finalidade de manipular os níveis periféricos de catecolaminas (noradrenalina e adrenalina) administrou-se uma única dose de 6-OHDA (200mg/kg) por via i.p., 3 dias antes do tratamento com MDMA ou, uma dose/dia de 6-OHDA (200mg/kg) por via subcutânea, durante 3 dias consecutivos antes do tratamento com MDMA. Também foi realizado o bloqueio dos receptores β-adrenérgicos através da administração de propranolol (20mg/kg) por via i.p. (Rice *et al.*, 2001; Cao,Hudson e Lawrence, 2003a), 30 minutos antes do tratamento com MDMA; o bloqueio dos receptores β2-adrenérgicos foi feito através da administração de ICI-118,551 (15 mg/kg) por via i.p. (Rice *et al.*, 2001; Cao,Hudson e Lawrence, 2003a), 1 hora antes do tratamento com MDMA.

4.5 Dosagem dos níveis séricos de corticosterona

Os animais foram decaptados para a coleta de sangue e posterior obtenção do soro para a dosagem dos níveis séricos de corticosterona. O sangue foi coletado em

eppendorfs secos e deixado à temperatura ambiente para a retração do coágulo. Então foi centrifugado sob refrigeração a 1000 x g por 20 minutos para obtenção do soro. Este soro foi armazenado em *eppendorfs* no freezer a -80ºC até o momento da realização das dosagens hormonais. As amostras foram coletadas à mesma hora do dia (entre 08:00 e 09:00 h) para minimizar os efeitos do ritmo circadiano sobre os níveis séricos de corticosterona.

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, com sensibilidade de 2,87 ng/mL e coeficiente de variação intra-ensaio de 5,48%.

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).

4.6 Dosagem dos níveis plasmáticos de adrenalina e noradrenalina

Os animais foram decaptados e o sangue coletado em *eppendorfs* de 1,5 mL contendo 10 µL de EDTA 10%. As amostras foram colocadas imediatamente em banho de gelo por no máximo 15 minutos, centrifugadas a 1000 x g por 20 minutos e o plasma foi coletado e estocado em freezer -80ºC até o momento da análise.

As catecolaminas foram extraídas do plasma utilizando-se um sistema de separação por óxido de alumínio, que consiste da ligação das catecolaminas no óxido de alumínio quando em pH básico, após a adição de tampão Tris-HCl (pH 8,6) e da recuperação das catecolaminas, após processos de lavagem com água destilada, pela adição de ácido perclórico 0,1 M. Ao final desse processo o sobrenadante foi coletado e injetado (20 µl) no aparelho de *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) acoplado a um detector eletroquímico (HPLC-ED, (SHIMATZU, Modelo 10A e Antec) conforme descrito por Del Rey *et al*. (2009) para a quantificação de adrenalina e noradrenalina. As amostras ficaram no gelo ou na geladeira (4ºC) até o momento da injeção no equipamento.

Foi utilizada a técnica de cromatografia em fase reversa com pareamento iônico. Esta técnica fundamenta-se na cromatografia de partição ou absorção. A fase móvel utilizada na quantificação das catecolaminas era constituída de hidrogenofostado dissódico dihidratado (0,05 M), ácido cítrico (0,05 M), octilsulfato de sódio e EDTA, juntamente com acetonitrila (10%), com pH 4,0 após adição de ácido cítrico. A fase móvel foi utilizada em um sistema isocrático e fluxo de 0,5 mL/min. 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, no mínimo, uma noite circulando em um sistema fechado, de modo a permitir a estabilização do aparelho,

com fluxo constante de 0,3 mL/min. O detector eletroquímico foi mantido com potencial de +0,8 V no eletrodo de trabalho.

Os padrões de adrenalina e noradrenalina nas concentrações de 10^{-3} M foram diluídos até uma concentração de 10^{-7} M em água destilada e passaram pelo mesmo processo de extração descrito acima. A cada amostra proveniente dos animais foram adicionadas concentrações de padrão interno, DHBA 10^{-7}M, e os valores obtidos foram utilizados para efetivação dos devidos ajustes nas medidas das concentrações das catecolaminas.

Os analitos foram reconhecidos 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 aproximadamente 15 min. Para todas as dosagens foram estabelecidas curvas de calibração, calculados os coeficientes de correlação linear (r^2) sendo considerados adequados valores r^2 superiores 0,8. Para o estabelecimento da precisão intra-ensaio do método cromatográfico foram calculados os coeficientes de variação (CV%) das diferentes concentrações das catecolaminas analisadas e foram considerados adequados valores com CV% inferiores a 15%.

4.7 Avaliação da celularidade do baço e da medula óssea

A celularidade do baço foi determinada após fricção destes órgãos por meio de RPMI-1640 a 4℃, com auxílio de lâminas de microscopia Perfecta®. A seguir, esta suspensão de células foi centrifugada a 250 x g por 8 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Em seguida foi realizada a lise hipotônica com soluções de NaCl 02% e 1,6% e as amostras foram submetidas a centrifugação novamente, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 10 mL de PBS. A contagem foi

realizada em câmara de Neubauer (diluição 1:40), sendo a viabilidade celular das mesmas observada pela coloração com azul de tripan, aceitando-se um valor mínimo de 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 15,0 mL (falcon), dentro de banho de gelo. Imediatamente após, a contagem foi realizada em câmara de Neubauer (diluição 1:20), sendo a viabilidade celular das mesmas observada pela coloração com azul de tripan, aceitando-se um valor mínimo de 95% de viabilidade.

4.8 Contagem de leucócitos totais e diferencial no sangue

O sangue foi coletado em tubos de polipropileno contendo EDTA 10%. A contagem total de leucócitos sanguíneos foi realizada em um contador de células ABC-Vet (Horiba ABX®) de uso veterinário. A contagem diferencial dos leucócitos sangüíneos foi realizada em extensão sanguínea após coloração com May Grunwald-Giensa modificado.

4.9 Citometria de Fluxo

Foi utilizado um citômetro de fluxo (FACScalibur Immunocytometry System, San Jose, Ca, USA) conectado com um computador (Macintosh Apple, CA, USA) para análise da atividade e da expressão do fator de transcrição NFκB em neutrófilos circulantes e para as dosagens de citocinas por Cytometric Beads Array - CBA Mouse Inflammation kit (BD Biosciences). Foram analisados 10.000 eventos utilizando-se o software Cell Quest Pro (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA).

4.9.1 Medida da atividade de neutrófilos sanguíneos

O sangue foi coletado por decaptação em tubos *eppendorfs* de 1,5 mL contendo 10µL de heparina, que foram colocados imediatamente em banho de gelo. Foram utilizadas amostras sangüíneas de 100 µl para a análise do *burst* oxidativo e da atividade fagocítica, conforme descrito por Hasui, Hirabayashi *et al* (1989). As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades *FSC Forward Scatte*r e *SSC - Side Scatter* do aparelho que avaliam o tamanho e a complexidade interna das mesmas, respectivamente, como ilustrado na **figura 1 A**. 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 (PI) mensurada a 585±42 nm (detector FL2), como ilustado nas figuras **1 B** e **1C**. 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 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® foi analisada a população de 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 (sem estímulo algum) usado como controle de fluorescência basal da célula a ser analisada.

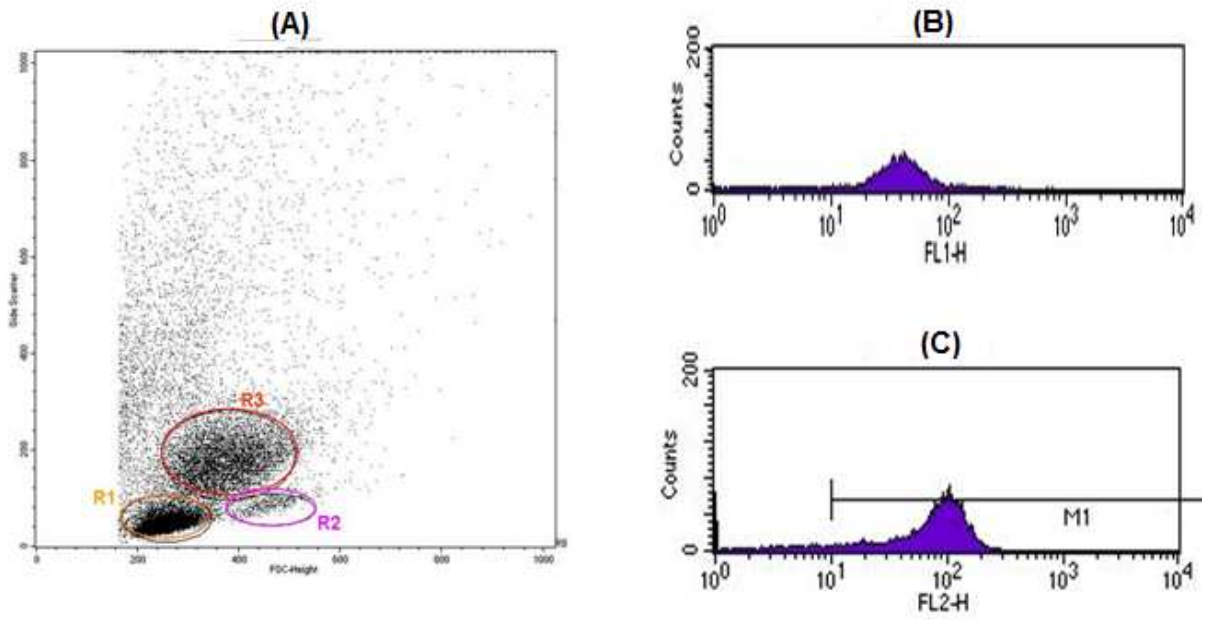

Figura 1 – (A) Citograma de leucócitos circulantes incubados com PBS de animais do grupo controle. R1=linfócitos; R2=monócitos; R3=neutrófilos. (B) Histograma dos neutrófilos incubados com DCFH. (C) Histograma dos neutrófilos incubados com *S.aureus* realizando fagocitose.

4.9.2 Determinação da expressão de NFκB em neutrófilos sanguíneos

Os animais foram decaptados e o sangue foi coletado em *eppendorfs* contendo 10µL de heparina. Em seguida, 200µL da amostra de sangue foi transferida para tudos de citometria e diluída em uma proporção igual de RPMI-1640. As amostras foram estimuladas com LPS na concentração de 1µg/mL por 15 min em estufa a 37℃ a 5% CO_2. Após o período de incubação as amostras foram submetidas a lise hipotônica com soluções de NaCl 0,2% e 1,6%, em seguida centrifugadas por 5 minutos a 250 x g. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram incubadas com anticorpo anti-CD11b-PercP por 1 hora no escuro para marcação da membrana dos neutrófilos, como ilustram as **figuras 2 A** e **B**. Após a marcação da membrana as células foram fixadas, permeabilizadas e incubadas com anticorpo anti-NFkB p65-PE por 30 minutos no escuro para marcação intracelular do fator de transcrição NFκB p65, como ilustrado nas **figuras 2 C** e **D** . Por fim, as células foram lavadas e submetidas a centrifugação e ressuspendidas para leitura

no citômetro de fluxo, para determinação da intensidade de fluorescência de PE (detector FL2) e PercP (detector FL3).

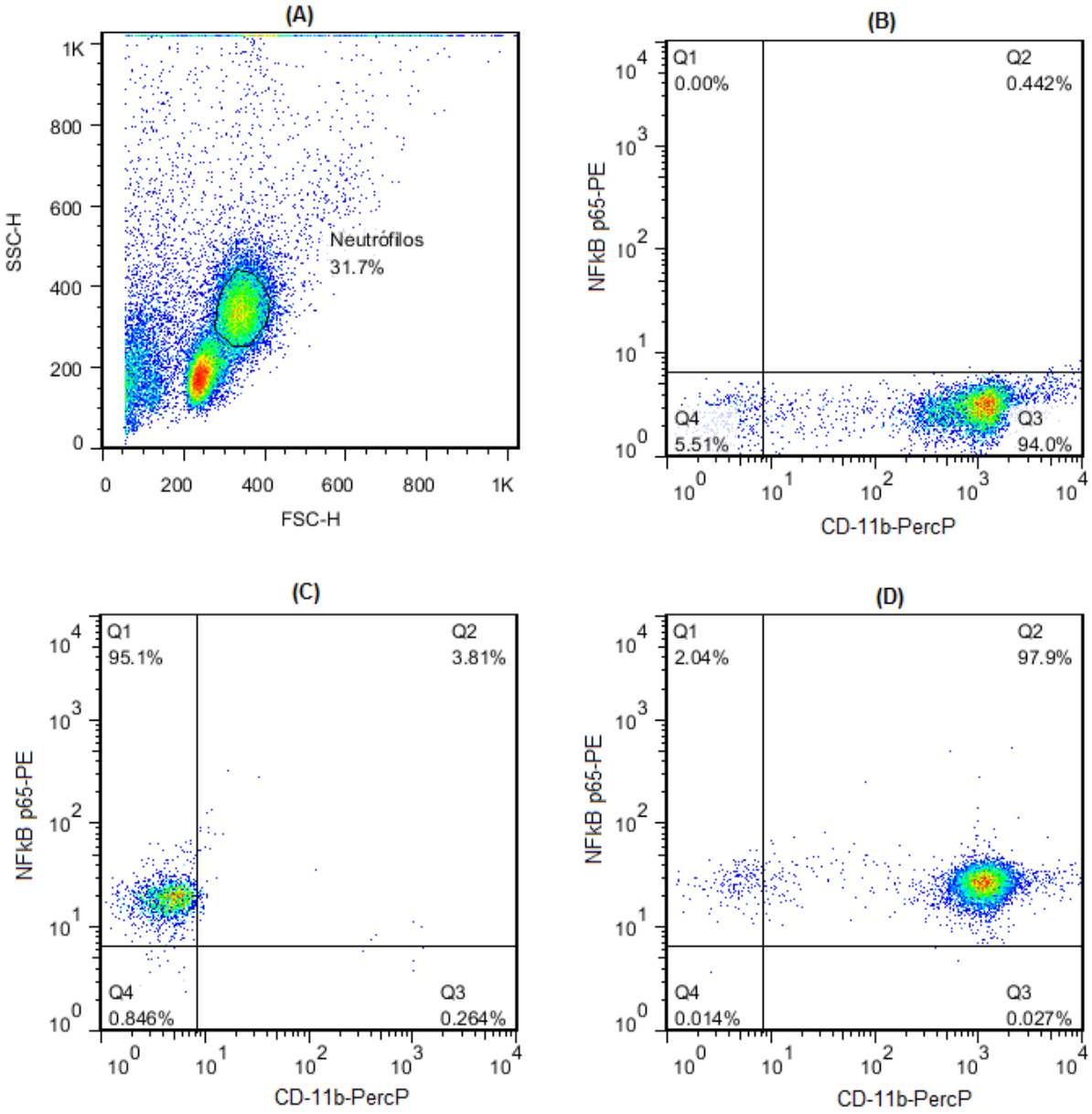

Figura 2 – (A) Citograma representando o *gate* na população de neutrófilos sanguíneos. (B) Citograma representando a população de neutrófilos que expressam CD-11b. (C) Citograma representando população de neutrófilos que expressam NFkB p65. (D) Citograma representando população de neutrófilos com dupla marcação: CD11b e NFkB.

4.9.3 Dosagem de citocinas e quimiocinas

Os animais foram decapatados e o sangue foi coletado em tubos *eppendorfs* de 1,5 mL contendo 10 µL de EDTA 10%. O sangue foi centrifugado a 1000 x g por

20 minutos e o plasma coletado e armazenado em freezer -80℃ até o momento das análises. A dosagem de citocinas e quimiocinas foi realizada utilizando-se CBA mouse inflammation kit que pode ser utilizado para medir quantitativamente TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-12 p70, IL-10 e MCP-1 em uma única amostra de plasma. O CBA pode ser comparado ao método de ELISA sanduíche e o protocolo de análise foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. De forma resumida, os *nanobeads* de captura, de detecção e as citocinas recombinantes da curva padrão específicos para cada citocina foram diluídas nas concentrações recomendadas. Cada *nanobead* está ligado a anticorpos específicos para a citocina/quimiocina a ser quantificada e apresenta tamanhos diferentes, o que permite a diferenciação de cada citocina, em diferentes picos de intensidade de fluorescência, como demonstrado na **figura 3**.

Os reagentes foram adicionados aos tubos de citometria relativos aos padrões e as amostras na seguinte ordem: suspensão de *nanobeads* de captura (50µL), padrões nas diferentes diluições e amostras (50µL) e os *nanobeads* de detecção (50µL); essa mistura ficou sob incubação por 2 horas em temperatura ambiente no escuro. Após o período de incubação os tubos contendo os padrões e as amostras foram centrifugados a 250 x g por 5 minutos, lavados, centrifugados novamente e ressupensos para leitura no citômetro de fluxo, e deteminação da intensidade de fluorescência de PE (detector FL3).

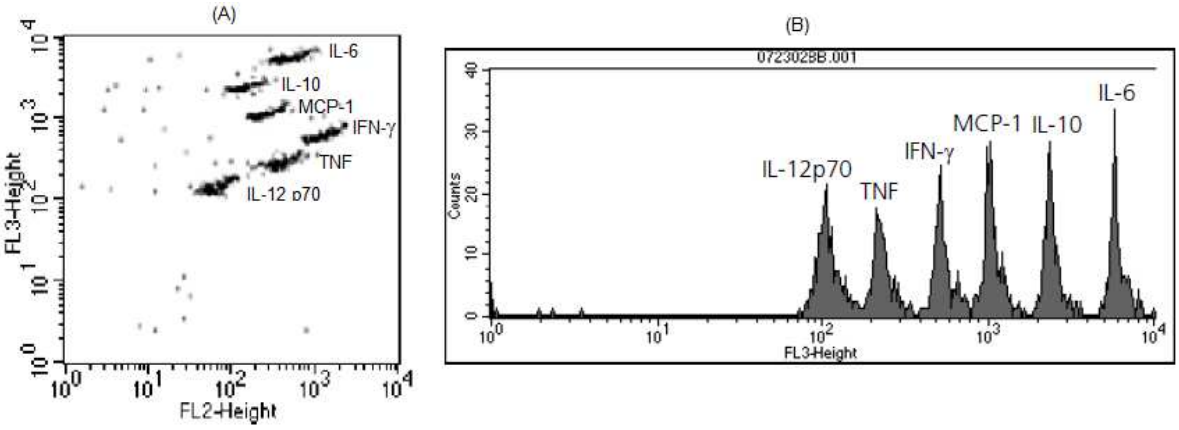

Figura 3 – (A) Citograma que ilustra as populações de nanobeads da curva padrão para as diferentes citocinas na concentração de 625 pg/mL. (B) Histograma que ilustra os picos de intensidade de fluorescência para os diferentes populações de nanobeads. Figura adaptada do manual do usuário do CBA mouse inflammation kit – BD Biosciences.

4.10 Listeria monocytogenes (LM)

A cepa de LM foi gentilmente cedida pelo Laboratorio de Microbiologia do Departamento de Patologia Clinica (Hospital das Clinicas-UNICAMP) e todos os experimentos referentes à infecção experimental foram realizados no laboratório de CFU do Hemocentro da UNICAMP. A LM foi mantida em meio de cultura BHI e incubada por 24-48 horas a 37℃. Os repiques foram feitos em ágar-sangue, e novamente incubados a 37℃ por 24 horas. As colônia s obtidas foram diluídas em solução de NaCl 0,9% e as concentracões foram determinadas por espectrofotometria através da escala de McFarland (Vitek Colorimeter).

Para a padronizacão da dose subletal, foi determinado o número ideal de microorganismos a ser inoculado em cada animal, realizando-se um estudo de sobrevida utilizando-se diferentes concentrações da bactéria. Para o estudo dos parâmetros imunológicos e hematopoéticos utilizamos a dose subletal de $5x10^3$ microrganismos/animal. Ambas as concentrações foram inoculadas i.p. diluídas em solução de NaCl 0,9%.

4.11 Metodologia da cultura clonal de precursores hematopoéticos (CFU) da medula óssea e do baço de camundongos

Os animais foram decaptados e colocados em decúbito ventral para assepsia com álcool 70%. O fêmur direito foi retirado e as epífises foram cortadas; com o auxílio de uma agulha e seringa contendo meio RPMI-1640, a medula foi transferida para um tubo falcon de 15 mL. Os baços foram removidos assepticamente, lavados com solução de NaCl 0,9% estéril e com o auxílio de um macerador foram obtidas suspensões celulares em meio RPMI. As suspensões foram mantidas no gelo e o número de células foi contado em câmara de Neubauer após diluição em solução de azul de tripan. Preparou-se o meio, conforme descrito abaixo:

- 30% de meio DMEM duas vezes concentrado;
- 20% de soro fetal bovino;
- 50% de ágar.

Em seguida, $1x10^5$ células/mL da medula ou $2x10^5$ células/mL do baço foram adicionadas em 2 mL do meio preparado e homogeneizados em placas de Petri (35mm), as quais já continham o estímulo apropriado (100µL do fator estimulador de colonias GM-CSF na concentração final 0,5 ng/mL - Sigma). As placas foram incubadas por sete dias em estufa a 37℃ na presenç a de 5% de CO_2. O número de colônias foi determinado em microscópio de dissecção com aumento de 40X.

4.12 Avaliação da atividade estimuladora de colônias (CSA) para precursores da medula óssea no soro

O sangue dos animais foi coletado por decaptação e centrifugado para obtenção do soro e armazenado a – 20℃. A atividade estimuladora de colônias no soro dos animais tratados foi avaliada pela capacidade promotora do crescimento e

diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de animais *naive*. De acordo com van den Engh e Bol (1975), a menor concentração capaz de estimular o crescimento de colônias é considerada como 1 unidade de CSF/mL. A capacidade de estimular a formação de colônias de granulócitos e macrófagos foi testada em cultura semi-sólida como descrito no item 4.11. Os valores foram expressos em unidades por mL e determinados a partir da curva de titulação do fator estimulador de colônias (GM-CSF). De acordo com a curva de titulação, a menor concentração capaz de estimular o crescimento de colônias foi 0,125ng/mL.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados pelo teste de Bartlet para determinação da homogeneidade das variâncias. Os dados paramétricos foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de 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 $p \leq 0,05$.

Todas as análises estatísticas foram feitas com o auxílio do programa estatístico denominado GraphPad Prism para Windows, versão 5 (2007).

6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

6.1 Experimento 1 – A metirapona previne os efeitos da administração de MDMA sobre a atividade de neutrófilos

Para manipular os níveis séricos de corticosterona foram testadas duas doses de metirapona, um inibidor da enzima 11β-hidroxilase, que converte 11-dioxicorticosterona em corticosterona, causando diminuição dos níveis séricos de corticosterona. Trinta e cinco camundongos foram separados ao acaso em 6 grupos. Os animais foram tratados pela via i.p. com um volume 0,1 mL das soluções usadas para cada 10g de peso corporal. Os animais do grupo controle receberam duas injeções de solução de NaCl 0,9% (salina). Os animais dos grupos metirapona receberam uma injeção de metirapona na concentração de 100 ou 200mg/kg e uma injeção de solução salina. Os animais do grupo MDMA receberam uma injeção de solução salina e uma injeção de MDMA na concentração 10mg/kg. Por fim, os animais do grupo Metirapona+MDMA receberam uma injeção de metirapona (100 ou 200mg/kg) e uma injeção de MDMA (10mg/kg). Os animais receberam a primeira injeção 3 horas antes da eutanásia e a segunda injeção 1 hora antes da eutanásia. Todos os animais em estudo receberam duas injeções para eliminar possíveis efeitos do estresse da injeção. A **figura 4** ilustra este esquema de tratamento e os resultados das dosagens de corticosterona são ilustrados na **figura 5.**

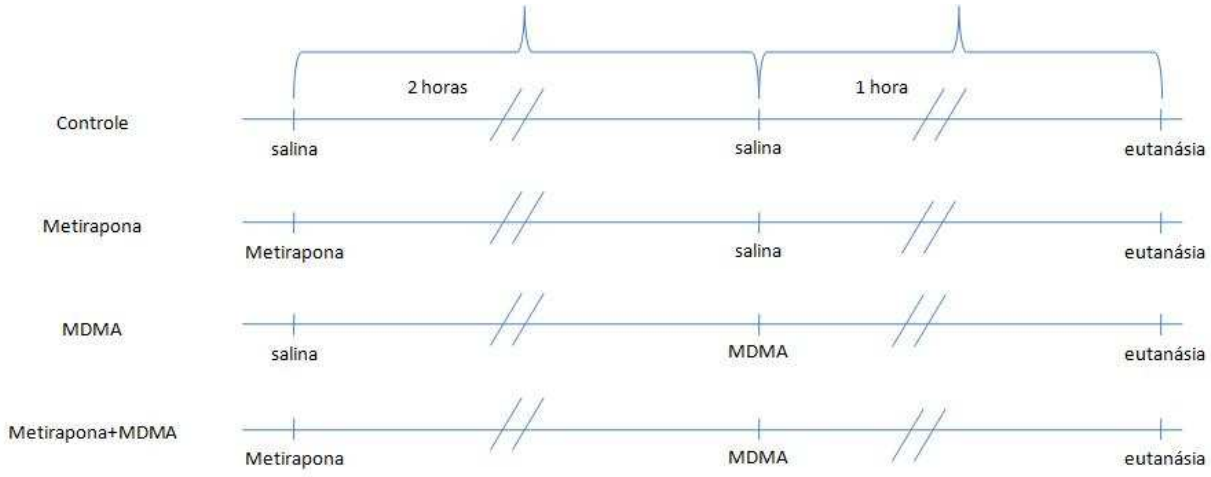

Figura 4 – Esquema de tratamento empregado para manipular os níveis de glicocorticóides previamente à avaliação dos efeitos do MDMA sobre a atividade de neutrófilos de camundongos Balb/C.

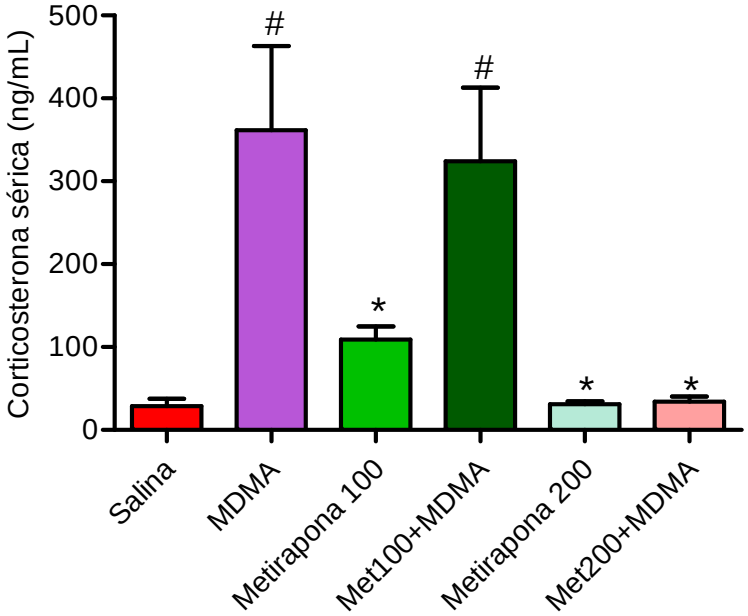

Figura 5 – Dosagens dos níveis séricos de corticosterona de animais tratados com metirapona previamente ao tratamento com MDMA. *p<0,05 em relaçãoaos grupos MDMA e Met 100+MDMA e não diferem entre si, #p<0,05 em relação a todos os grupos e não diferem entre si, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=5 animais/grupo.

Como observamos na figura 5, a dose de 200 mg/kg de metirapona foi capaz de prevenir o aumento dos níveis séricos de corticosterona ($F(5,29)=33,54$; $p<0,0001$) induzido por MDMA; esta dose foi, então, utilizada nos experimentos posteriores.

Desta forma, trinta e dois camundongos foram separados ao acaso em 4 grupos. Os animais foram tratados pela via i.p. com de volume 0,1 mL de solução para cada 10g de peso de cada animal. Os animais do grupo controle receberam 2 injeções de solução salina. Os animais do grupo metirapona receberam uma injeção de metirapona na concentração de 200mg/kg e uma injeção de solução salina. Os animais do grupo MDMA receberam uma injeção de solução salina e uma injeção de MDMA na concentração 10mg/kg. Por fim, os animais do grupo Metirapona+MDMA receberam uma injeção de metirapona (200mg/kg) e uma injeção de MDMA (10mg/kg). Os animais receberam a primeira injeção 3 horas antes da eutanásia e a segunda injeção 1 hora antes da eutanásia. Todos os animais em estudo receberam duas injeções para eliminar possíveis efeitos do estresse da injeção. A **figura 4** ilustra este esquema de tratamento.

RESULTADOS

A **tabela 1** mostra que os efeitos produzidos pela administração de MDMA sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos foram prevenidos pela administração prévia de metirapona. A análise estatística dos dados mostrou uma redução tanto do *burst* induzido por SAPI e PMA como da intensidade e porcentagem de fagocitose nos animais tratados com MDMA em relação aos animais do grupo controle tratados com solução salina; replicando-se assim, os dados obtidos com o MDMA durante o mestrado. Entretanto, no grupo dos animais tratados com metirapona previamente ao tratamento com MDMA estes efeitos foram prevenidos tanto no que diz respeito

ao *burst* induzido por SAPI (F(3,28)=23,32; p<0,0001) e PMA (F(3,28)=6,25; p=0,0022) como no relativo à intensidade (F(3,28)=36,80; p<0,0001) e porcentagem (F(3,28)=35,51; p<0,0001) de fagocitose em relação aos animais do grupo tratado com salina previamente ao MDMA.

O *burst* basal dos neutrófilos não foi alterado por qualquer um dos tratamentos, e o tratamento com metirapona não alterou nenhum dos parâmetros avaliados em relação ao grupo controle tratado com salina. As **figuras 6 e 7** ilustram estes resultados.

Tabela 1- Efeitos da administração prévia de metirapona (200mg/kg) sobre a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg)

	Grupos			
Parâmetros[A]	Salina	Metirapona	MDMA	Metirapona+MDMA
Burst basal	50,51±11,59	45,09±7,34	51,07±18,78	46,64±12,67
Burst SAPI	45,90±6,29	51,41±3,44	33,66±5,83*	51,05±2.94
Burst PMA	73.98±13,48	69,86±13,42	56,46±12,68*	82,08±7,93
Int Fagocitose	48,78±1,84	50,73±2.89	38,82±5,04*	61,76±6,30
% Fagocitose	93,74±0,79	98,54±0,29	79,68±8,20*	97,97±1,30

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

[A]**Porcentagem de Fagocitose**: porcentagem de neutrófilos que fagocitaram partículas de SAPI. **Intensidade de Fagocitose**: quantidade de bactérias fagocitadas pela população de neutrófilos.

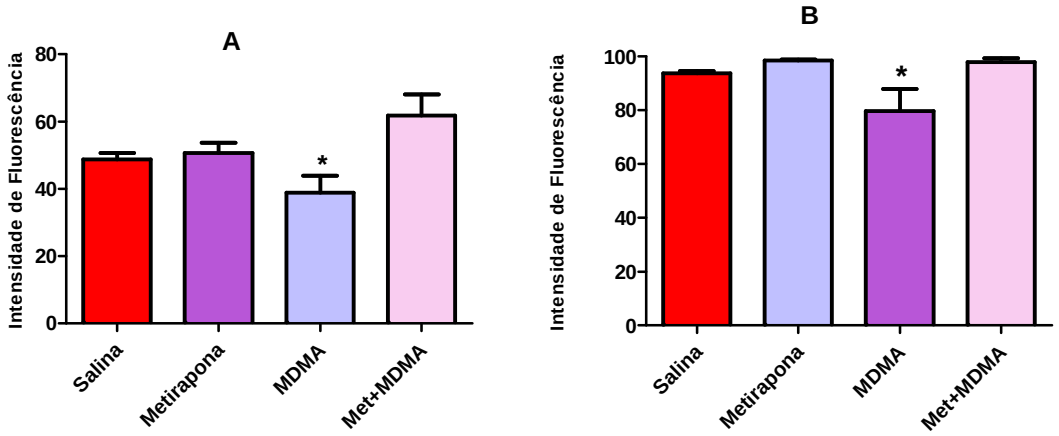

Figura 6 - A administração prévia de metirapona (200mg/kg) impede a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg). A - *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. ***** p<0,05 em relação a todos os grupos, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo.

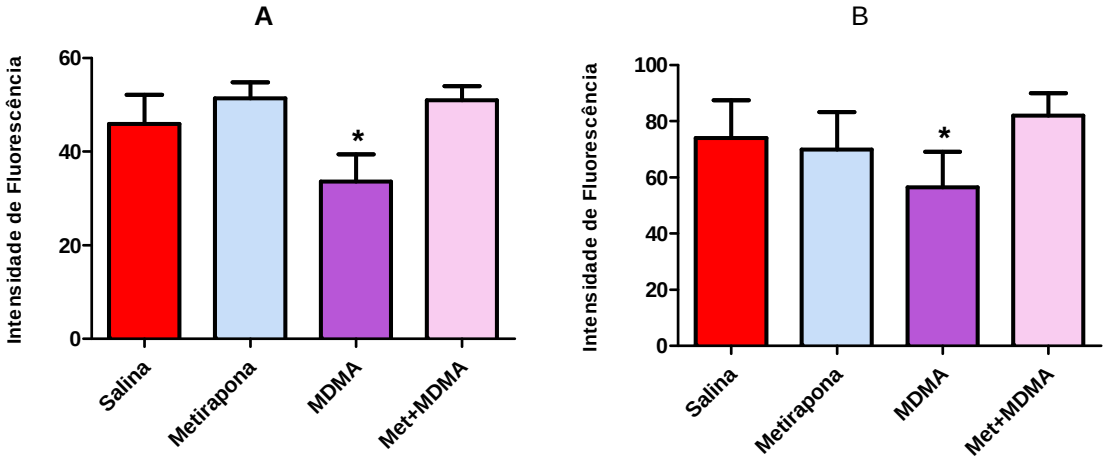

Figura 7 - A administração prévia de metirapona (200mg/kg) impede a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg). A - intensidade de fagocitose, B –. porcentagem de fagocitose. ***** p<0,05 em relação a todos os grupos, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo.

6.2 Experimento 2 – O RU-486 previne os efeitos da administração de MDMA sobre a atividade de neutrófilos

Vinte e cinco camundongos foram separados ao acaso em 5 grupos. Os tratamentos com solução salina e MDMA foram realizados pela via i.p. empregando-se sempre um volume de 0,1 mL de solução para cada 10g de peso corporal. Os tratamentos com RU e PEG 400 foram realizados pela via subcutânea no volume de 0,1mL por animal. Os animais do grupo controle receberam duas injeções dessa solução. Os animais do grupo PEG (veículo do RU-486) receberam uma injeção de PEG 400 e uma injeção de solução salina. Os animais do grupo RU receberam uma injeção de RU-486 na concentração de 25 mg/kg e uma injeção de solução salina. Os animais do grupo MDMA receberam uma injeção de solução salina e uma injeção de MDMA na concentração 10mg/kg. Por fim, os animais do grupo RU+MDMA receberam uma injeção de RU-486 (25 mg/kg) e uma injeção de MDMA (10mg/kg). Todos os animais em estudo receberam duas injeções para eliminar possíveis efeitos do estresse da injeção. A **figura 8** ilustra este esquema de tratamento.

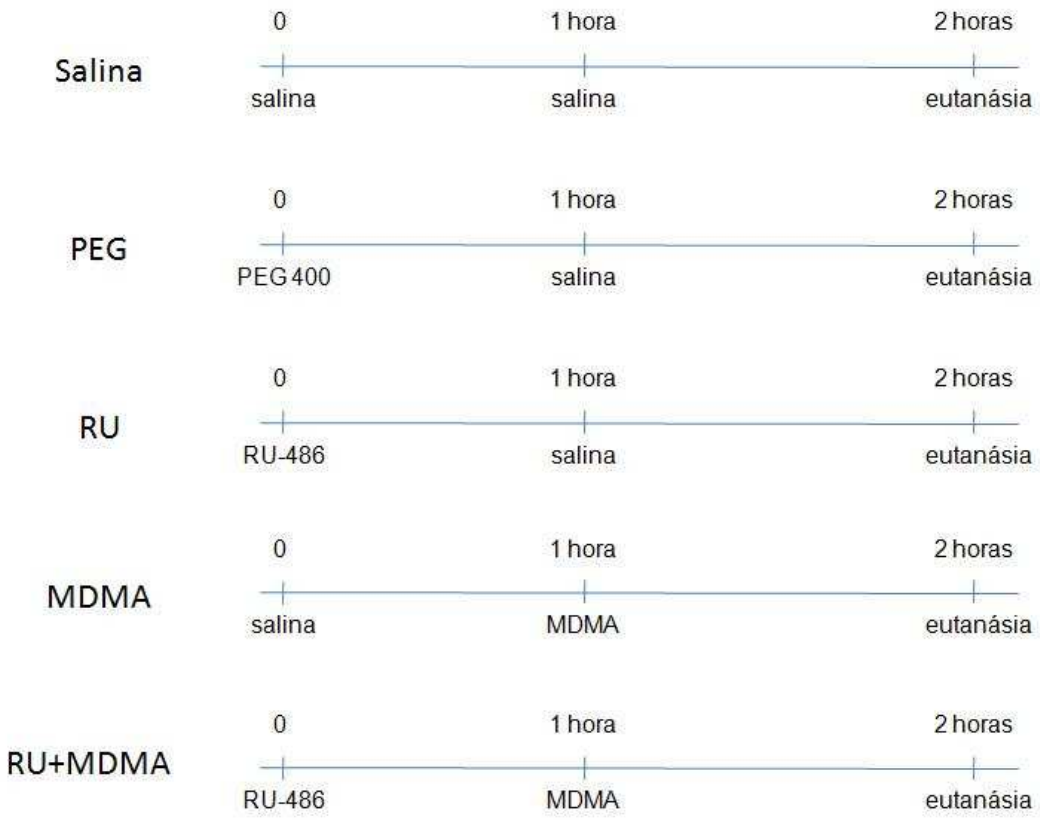

Figura 8 - Esquema de tratamento empregado para manipular os receptores de glicocorticóides previamente à avaliação dos efeitos do MDMA sobre a atividade de neutrófilos de camundongos Balb/C.

RESULTADOS

A **tabela 2** mostra que os efeitos da administração de MDMA sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos foram prevenidos pela administração prévia de RU-486. A análise estatística dos dados mostrou uma redução tanto do *burst* induzido por SAPI e PMA como da intensidade e porcentagem de fagocitose dos animais tratados com MDMA em relação aos animais do grupo controle tratados com solução salina, como observado anteriormente. Entretanto, no grupo dos animais tratados com RU-486 previamente ao tratamento com MDMA estes efeitos foram prevenidos tanto para o *burst* induzido por SAPI ($F(4,20)=11,96$; $p<0,0001$) e PMA ($F(4,20)=12,10$; $p<0,0001$) como para a intensidade ($F(4,20)=9,15$; $p=0,0002$) e

porcentagem (F(4,20)=16,8 p<0,0001) de fagocitose em relação aos animais do grupo tratados com salina previamente ao MDMA.

O *burst* basal dos neutrófilos não foi alterado por qualquer um dos tratamentos, e o tratamento com RU-486 ou com o seu veículo PEG 400 não alterou quaisquer dos parâmetros avaliados em relação aos dados obtidos nos animais do grupo controle tratado com salina. As **figuras 9** e **10** ilustram estes resultados.

Tabela 2 – Efeitos da administração prévia de RU-486 (25 mg/kg) sobre a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg)

			Grupos		
Parâmetros[A]	Salina	PEG	RU	MDMA	RU+MDMA
Burst basal	52,42±2,88	51,71±3,01	50,15±10,22	52,37±15,83	68,88±3,17
Burst SAPI	77,08±5,04	69,10±19,29	71,48±3,46	56,04±7,19*	97,10±2,63*
Burst PMA	91,86±3,75	83,52±4,55	83,70±1,68	67,34±7,45*	88,32±9,43
Int Fagocitose	29,60±3,19	25,92±3,04	26,26±4,24	19,31±0,88*	28,25±3,33
% Fagocitose	94,84±0,92	94,78±1,28	96,41±1,75	77,87±0,15*	92,47±2,02

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

[A]**Porcentagem de Fagocitose**: porcentagem de neutrófilos que fagocitaram partículas de SAPI. **Intensidade de Fagocitose**: quantidade de bactérias fagocitadas pela população de neutrófilos.

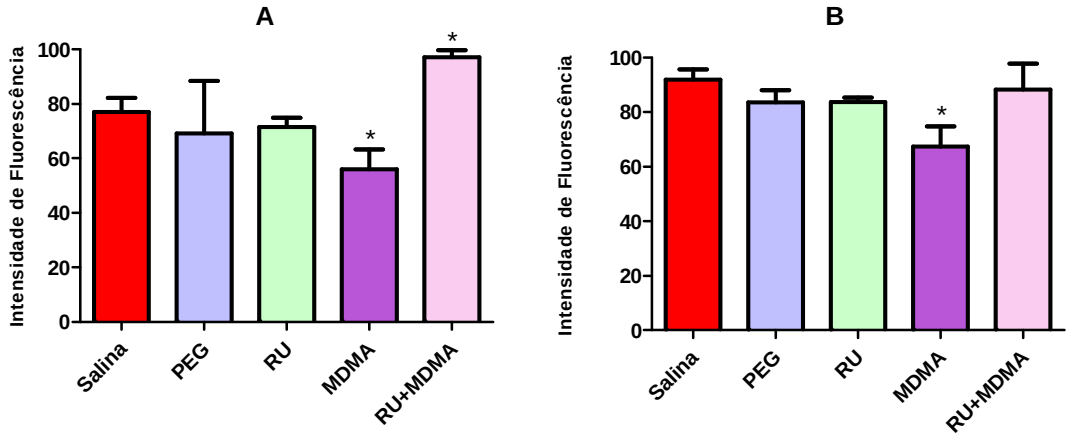

Figura 9 - A administração prévia de RU-486 (25mg/kg) impede a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg). A - *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. ***** p<0,05 em relação a todos os grupos, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=5 animais/grupo.

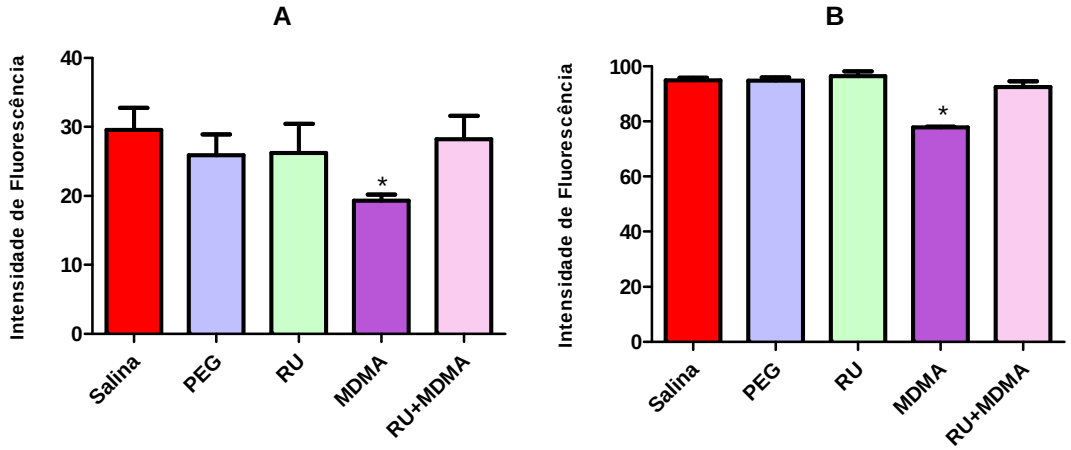

Figura 10 - A administração prévia de RU-486 (25mg/kg) impede a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg). A - intensidade de fagocitose, B –. porcentagem de fagocitose. ***** p<0,05 em relação a todos os grupos, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=5 animais/grupo.

6.3 Experimento 3 – A 6-OHDA não previne os efeitos da administração de MDMA sobre a atividade de neutrófilos

Para determinar se o MDMA induz aumento nos níveis de adrenalina e noradrenalina periférica, dosamos os níveis destas catecolaminas no plasma de animais tratados com MDMA. Vinte camundongos foram separados ao acaso em 2 grupos. Os animais foram tratados pela via i.p. com um volume 0,1 mL das soluções usadas para cada 10g de peso corporal de cada animal. Os animais do grupo controle receberam uma injeção de solução salina e os animais do grupo MDMA receberam uma injeção de MDMA na concentração 10mg/kg, após 60 minutos do tratamento os animais foram submetidos a eutanásia para coleta de sangue.

RESULTADOS

A **tabela 3** mostra que a administração de MDMA aumentou os níveis de noradrenalina (t=4,182; p=0,0006) e adrenalina (t=2,658; p=0,0197) no plasma dos animais tratados em relação aos animais do grupo controle. A **figura 11** ilustra esses resultados.

Tabela 3 – Efeitos da administração de MDMA (10mg/kg) sobre os níveis plasmáticos de noradrenalina e adrenalina de camundongos.

	Grupos	
	Salina	**MDMA**
Noradrenalina (ng/mL)	231±78,10	514,9±189,2*
Adrenalina (ng/mL)	236,3±34,81	311,2±70,75*

Os dados representam media±desvio padrão, *p<0,05 em relação ao grupo salina, dentro do mesmo parâmetro, Teste t-Student, n=10 animais/grupo.

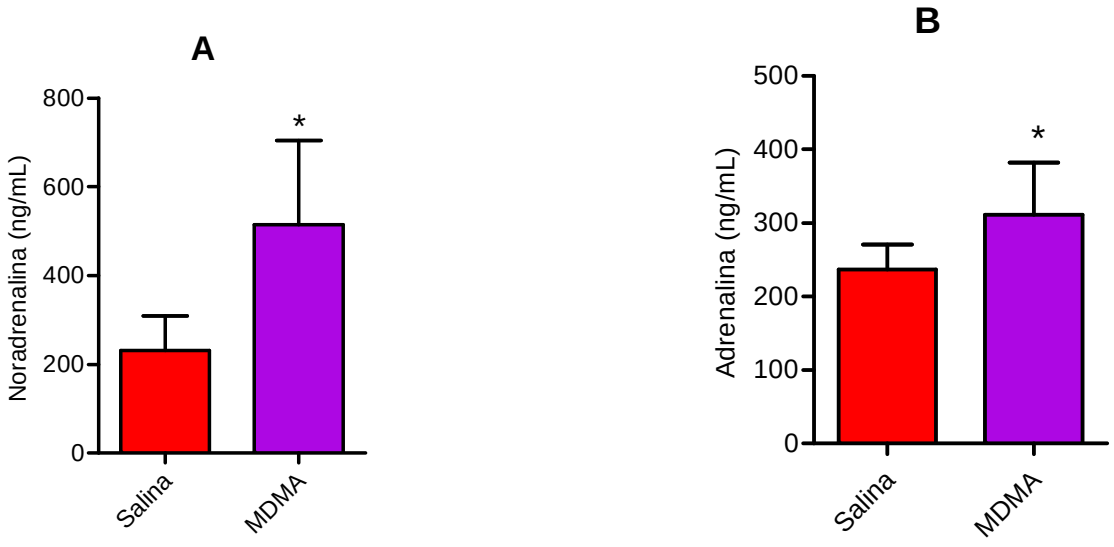

Figura 11 – A administração de MDMA (10mg/kg) aumenta os níveis de noradrenalina e adrenalina no plasma. A - noradrenalina, B –. adrenalina. ***** p<0,05 em relação ao grupo salina, Teste t de student. n=10 animais/grupo

Para manipular os níveis de catecolaminas periféricas, foram realizados dois protocolos distintos de simpatectomia química induzida por 6-OHDA. No primeiro protocolo, quarenta camundongos foram separados ao acaso em 5 grupos. Os animais foram tratados pela via i.p. com um volume 0,1 mL das soluções usadas para cada 10g de peso corporal de cada animal. Os animais do grupo controle receberam quatro injeções de solução salina. Os animais do grupo Salina+Vitamina C (veículo da 6-OHDA) receberam quatro injeções de Salina+Vitamina C e uma injeção de solução salina. Os animais do grupo 6-OHDA receberam três injeções de 6-OHDA, diluído em salina+Vitamina C, na concentração de 200mg/kg e uma injeção de solução salina. Os animais do grupo MDMA receberam três injeções de solução salina e uma injeção de MDMA na concentração 10mg/kg. Por fim, os animais do grupo 6-OHDA+MDMA receberam três injeções de 6-OHDA (200mg/kg) e uma injeção de MDMA (10mg/kg). Os camundongos receberam uma injeção por

dia, durante quatro dias consecutivos sendo que a última foi realizada 1 hora antes da eutanásia. Todos os animais em estudo receberam quatro injeções para eliminar possíveis efeitos do estresse da injeção. A **figura 12** ilustra o esquema de tratamento.

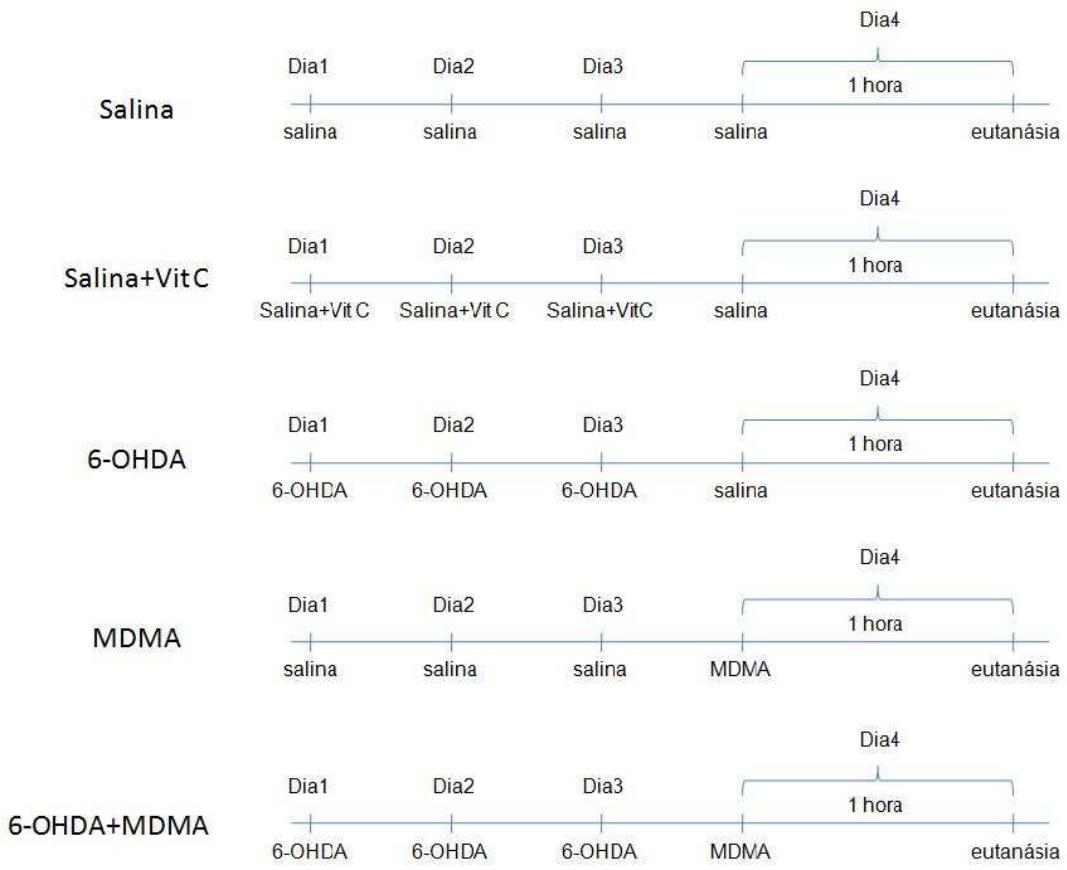

Figura 12 - Esquema de tratamento para manipulação dos níveis de catecolaminas previamente à avaliação dos efeitos do MDMA sobre a atividade de neutrófilos em camundongos Balb/C.

RESULTADOS

A **tabela 4** mostra que os efeitos da administração de MDMA sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos não foram prevenidos pelo tratamento prévio com 6-OHDA. A análise estatística dos dados mostrou uma redução tanto do *burst* induzido por SAPI ($F(4,30)=15,56$; $p<0,0001$) e por PMA ($F(4,31)=4,303$, $p=0,0070$) como da intensidade ($F(4,34)=11,70$; $p<0,0001$) e porcentagem de fagocitose

(F(4,35)=18,38; p<0,0001) nos animais tratados com MDMA em relação aos animais do grupo controle tratados com solução salina, replicando-se, assim, mais uma vez os dados obtidos anteriormente. Ainda foi possível observar que o tratamento com 6-OHDA não foi capaz de prevenir os efeitos do MDMA sobre os parâmetros avaliados, exceto no que diz respeito à porcentagem de fagocitose em relação aos animais do grupo tratados com salina previamente ao MDMA. As **figuras 13** e **14** ilustram estes resultados.

O *burst* basal dos neutrófilos não foi alterado por qualquer dos tratamentos, e o tratamento com 6-OHDA não alterou nenhum dos parâmetros avaliados da atividade de neutrófilos em relação ao grupo controle tratado com salina. É importante ressaltar que todos os animais tratados com 6-OHDA apresentaram diarréia intensa durante os 3 dias de tratamento e tiveram uma diminuição de 5g em média no peso corporal.

Tabela 4 – Efeitos da administração prévia de 6-OHDA (200mg/kg) sobre a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg)

	Grupos				
Parâmetros[A]	Salina	Salina+VitC	6-OHDA	MDMA	6-OHDA+MDMA
Burst basal	50,51±11,59	46,05±9,34	51,30±7,53	51,07±18,78	52,36±14,21
Burst SAPI	49,44±5,08	51,76±2,92	54,86±10,95	33,66±5,83*	36,69±5,06*
Burst PMA	77,33±13,22	70,99±12,31	79,10±14,14	56,46±12,68#	65,90±5,98
Int Fagocitose	49,72±0,29	45,26±3,93	49,74±6,44	38,82±5,04*	39,63±2,88*
% Fagocitose	93,02±1,52	96,97±1,97	96,70±1,88	81,35±8,62**	93,24±2,07

Os dados representam a intensidade média de fluorescência (media±desvio padrão), correspondente ao *gate* da população de neutrófilos sangüíneos. *****p<0,05 em relação aos grupos salina, salina+vitC e 6-OHDA e não são diferentes entre si, #p<0,05 em relação aos grupos salina, salina+VitC e 6-OHDA, **p<0,05 em relação a todos os grupos,dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo.

[A]**Porcentagem de Fagocitose**: porcentagem de neutrófilos que fagocitaram partículas de SAPI. **Intensidade de Fagocitose**: quantidade de bactérias fagocitadas pela população de neutrófilos.

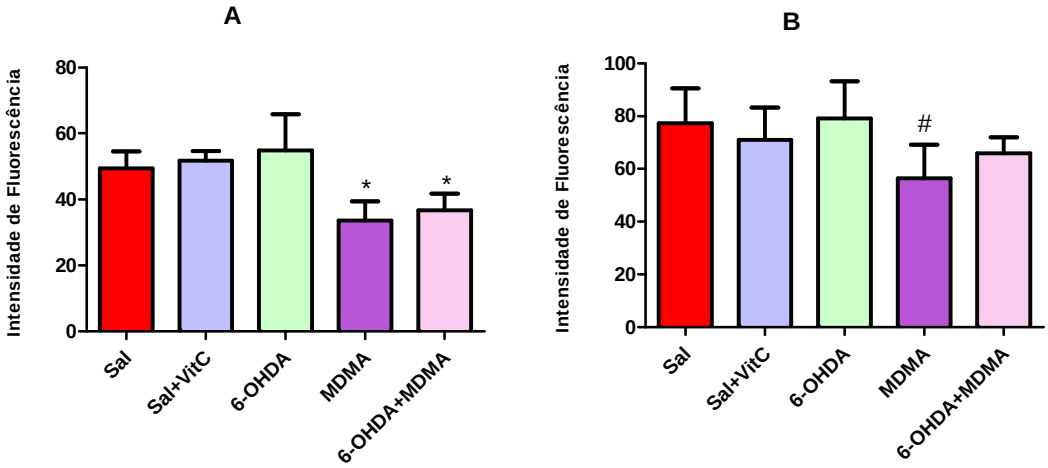

Figura 13 - A administração prévia de 6-OHDA (200mg/kg) não impede a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg). A - *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. *p<0,05 em relação aos grupos salina, salina+VitC e 6-OHDA e não são diferentes entre si, #p<0,05 em relação aos grupos salina, salina+VitC e 6-OHDA, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo.

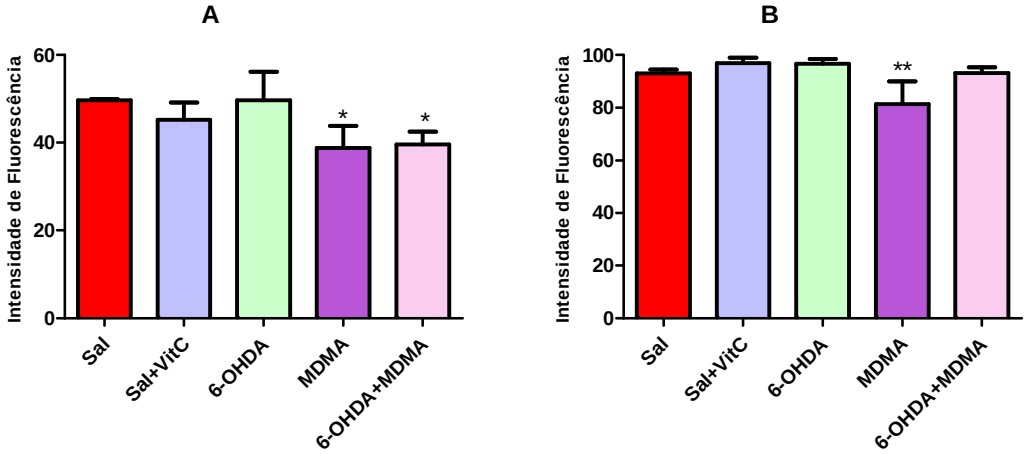

Figura 14 - A administração prévia de 6-OHDA (200mg/kg) não impede a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg). A - intensidade de fagocitose, B –. porcentagem de fagocitose. *p<0,05 em relação aos grupos salina, salina+vitC e 6-OHDA e não são diferentes entre si, **p<0,05 em relação a todos os grupos, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo.

Os efeitos colaterais causados pelo primeiro protocolo de tratamento com 6-OHDA pareceram suficientes para comprometer nossos resultados; por isso, decidimos utilizar um segundo protocolo de tratamento com 6-OHDA para manipular os níveis periféricos de catecolaminas.

Sendo assim, trinta e dois camundongos foram separados ao acaso em 4 grupos. Os animais foram tratados pela via i.p. e com um volume 0,1 mL das soluções usadas para cada 10g de peso corporal de cada animal. Os animais do grupo controle receberam duas injeções de solução salina. Os animais do grupo 6-OHDA receberam uma injeção de 6-OHDA, diluído em salina+Vitamina C, na concentração de 200mg/kg e uma injeção de solução salina. Os animais do grupo MDMA receberam uma injeção de solução salina e uma injeção de MDMA na concentração 10mg/kg. Por fim, os animais do grupo 6-OHDA+MDMA receberam uma injeção de 6-OHDA (200mg/kg) e uma injeção de MDMA (10mg/kg). Os camundongos receberam a primeira injeção 3 dias antes da eutanásia e a segunda injeção 1 hora antes da eutanásia. Todos os animais em estudo receberam duas injeções para eliminar possíveis efeitos do estresse da injeção, como ilustrado na **figura 15**.

No atual protocolo não observamos efeitos colaterais tão intensos quanto anteriormente, os animais apresentaram diarréia menos intensa e uma menor perda de peso, o que acreditamos tenha permitido uma análise mais fidedigna dos efeitos do composto em estudo e os resultados são descritos a seguir.

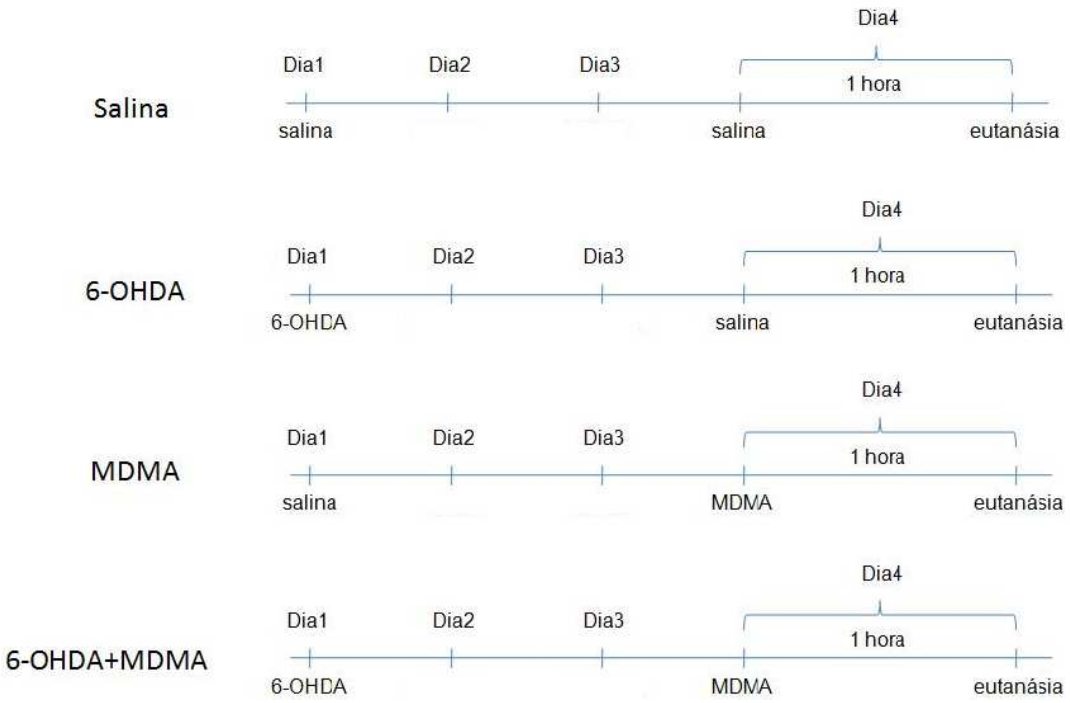

Figura 15 - Esquema de tratamento para manipulação dos níveis de catecolaminas previamente à avaliação dos efeitos do MDMA sobre a atividade de neutrófilos em camundongos Balb/C.

RESULTADOS

A **tabela 5** mostra que os efeitos da administração de MDMA sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos não foram prevenidos pelo tratamento prévio com 6-OHDA. A análise estatística dos dados mostrou uma redução tanto do *burst* induzido por SAPI ($F(3,28)=3,884$; $p=0,0194$) e por PMA ($F(3,28)=8,748$; $p=0,0003$) como da intensidade ($F(3,28)=8,532$; $p=0,0003$) e porcentagem de fagocitose ($F(3,28)=14,88$; $p<0,0001$) nos animais tratados com MDMA em relação aos animais do grupo controle tratados com solução salina, replicando-se, mais uma vez os dados obtidos anteriormente. Ainda foi possível observar que o tratamento com 6-OHDA não preveniu os efeitos do MDMA sobre os parâmetros avaliados, confirmando e reforçando os dados obtidos anteriormente. As **figuras 16** e **17** ilustram estes resultados.

O *burst* basal dos neutrófilos não foi alterado por qualquer dos tratamentos, e o tratamento com 6-OHDA não alterou nenhum dos parâmetros avaliados da atividade de neutrófilos em relação aos dados obtidos no grupo controle em que os animais foram tratados com salina.

Tabela 5 – Efeitos da administração prévia de 6-OHDA (200mg/kg) sobre a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg)

	Grupos			
Parâmetros[A]	Controle	6-OHDA	MDMA	6-OHDA+MDMA
Burst basal	47,23±14,60	51,30±7,53	49,81±19,01	48,66±12,71
Burst SAPI	144,10±20,66	137,60±14.99	112,30±33,20#	118,40±11,92
Burst PMA	135,20±28,78	110,20±11,97	78,50±24,27*	93,47±24,52*
Int Fagocitose	48,99±2,075	52,98±6,513	40,86±5,001#	42,41±7,001**
% Fagocitose	93,02±1,527	96,70±1,886	81,35±8,62*	82,36±6,799*

Os dados representam a intensidade média de fluorescência (media±desvio padrão), correspondente ao *gate* da população de neutrófilos sangüíneos. *p<0,05 em relação aos grupos salina e 6-OHDA e não são diferentes entre si, #p<0,05 em relação aos grupos salina e 6-OHDA, **p<0,05 em relação ao grupo 6-OHDA, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo.

[A]**Porcentagem de Fagocitose**: porcentagem de neutrófilos que fagocitaram partículas de SAPI. **Intensidade de Fagocitose**: quantidade de bactérias fagocitadas pela população de neutrófilos.

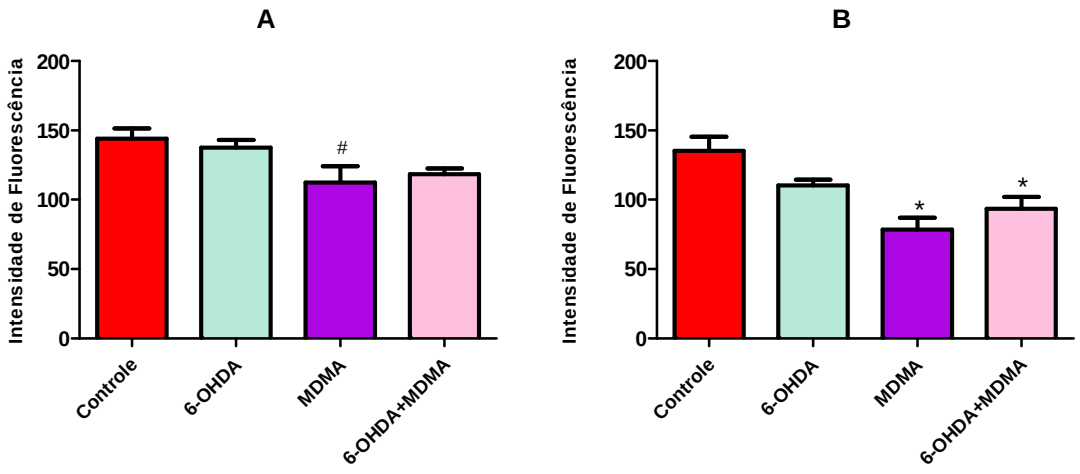

Figura 16 - A administração prévia de 6-OHDA (200mg/kg) não impede a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg). A - *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. *p<0,05 em relação aos grupos salina e 6-OHDA e não são diferentes entre si, #p<0,05 em relação aos grupos salina e 6-OHDA, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo.

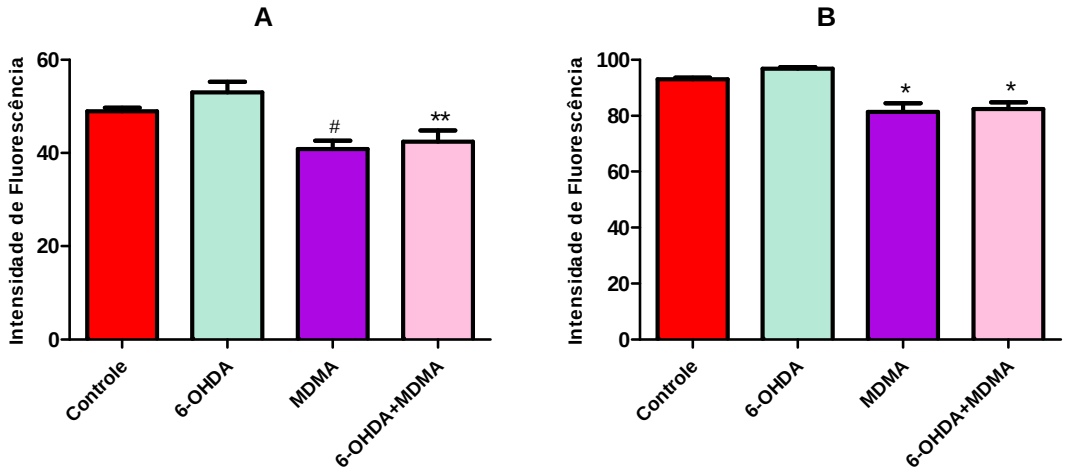

Figura 17 - A administração prévia de 6-OHDA (200mg/kg) não impede a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg). A - intensidade de fagocitose, B –. porcentagem de fagocitose. *p<0,05 em relação aos grupos salina e 6-OHDA e não são diferentes entre si, #p<0,05 em relação aos grupos salina e 6-OHDA, **p<0,05 em relação ao grupo 6-OHDA, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo.

6.4 Experimento 4 – O propranolol previne os efeitos da administração de MDMA sobre a atividade de neutrófilos

Vinte camundongos foram separados ao acaso em 4 grupos. Os animais foram sempre tratados pela via i.p. com um volume de 0,1 mL de solução para cada 10g de peso de cada animal. Os animais do grupo controle receberam duas injeções de solução salina. Os animais do grupo propranolol receberam uma injeção de propranolol na concentração de 20 mg/kg e uma injeção de solução salina. Os animais do grupo MDMA receberam uma injeção de solução salina e uma injeção de MDMA na concentração 10mg/kg. Por fim, os animais do grupo Prop+MDMA receberam uma injeção de propranolol (20 mg/kg) e uma injeção de MDMA (10mg/kg). Todos os animais em estudo receberam duas injeções para eliminar possíveis efeitos do estresse da injeção. A **figura 18** a seguir ilustra o esquema de tratamento.

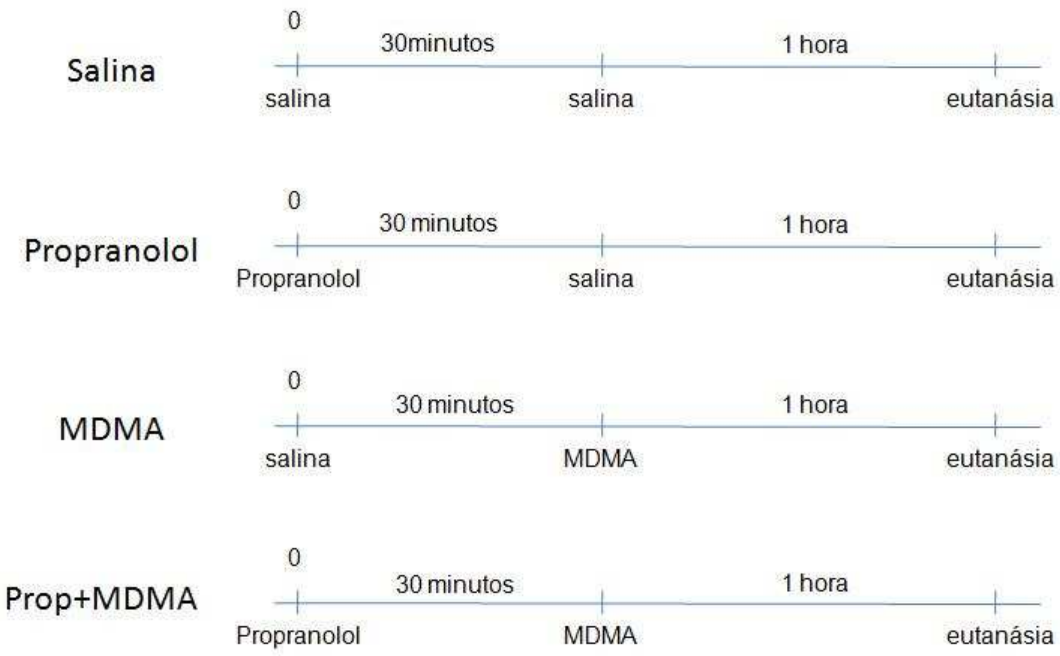

Figura 18 - Esquema de tratamento empregado para manipulação dos receptores de catecolaminas previamente à avaliação dos efeitos do MDMA sobre a atividade de neutrófilos de camundongos Balb/C.

RESULTADOS

A **tabela 6** mostra que os efeitos da administração de MDMA sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos foram prevenidos pelo tratamento prévio com propranolol (20 mg/kg). A análise estatística dos dados mostrou uma redução tanto do *burst* induzido por SAPI ($F(3,16)=8,58$; $p<0,0013$) e por PMA ($F(3,16)=14,08$, $p<0,0001$) como da intensidade ($F(3,16)=9,08$; $p=0,0010$) e porcentagem de fagocitose ($F(3,16)=19,1$; $p<0,0001$) nos animais tratados com MDMA em relação aos animais do grupo controle tratados com solução salina; mais uma vez, replicamos os dados obtidos anteriormente. Ainda, foi possível observar que o tratamento com propranolol preveniu os efeitos do MDMA sobre todos os parâmetros avaliados. As **figuras 19** e **20** ilustram estes resultados.

O *burst* basal dos neutrófilos não foi alterado por qualquer um dos tratamentos, e o tratamento com propranolol não alterou nenhum dos parâmetros avaliados da atividade de neutrófilos em relação ao grupo controle tratado com salina.

Tabela 6 - Efeitos da administração prévia de propranolol (20 mg/kg) sobre a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg)

	Grupos			
Parâmetros[A]	Salina	Propranolol	MDMA	Propranolol+MDMA
Burst basal	52,42±2,88	74,39±14,55	52,37±15,83	75,93±14,67
Burst SAPI	79,76±2,53	77,32±6,62	61,76±6,17*	91,60±16,19
Burst PMA	91,86±3,75	100,5±16,44	67,34±7,45**	115,1±15,14#
Int Fagocitose	29,47±2,77	28,16±5,083	19,16±0,84**	26,09±3,49
% Fagocitose	94,90±0,81	95,97±1,18	77,84±0,14**	93,19±2,27

Os dados representam a intensidade média de fluorescência (media±desvio padrão), correspondente ao *gate* da população de neutrófilos sangüíneos. *****p<0,05 em relação aos grupos salina e Propranolol+MDMA, **p<0,05 em relação a todos os grupos, #p<0,05 em relação ao grupo salina, dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=5 animais/grupo.

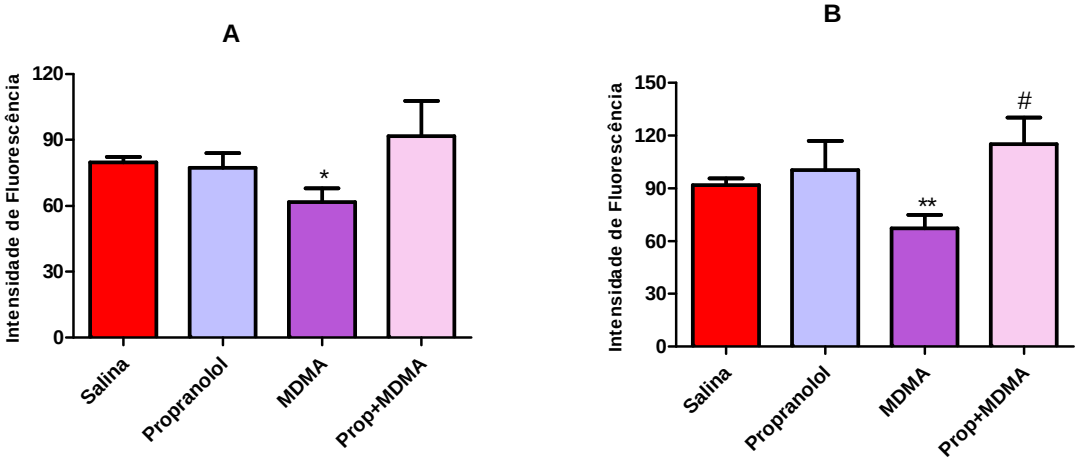

Figura 19- Administração prévia de propranolol (20mg/kg) impede a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg). A - *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. *p<0,05 em relação aos grupos salina e Propranolol+MDMA, **p<0,05 em relação a todos os grupos, #p<0,05 em relação ao grupo salina, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=5 animais/grupo.

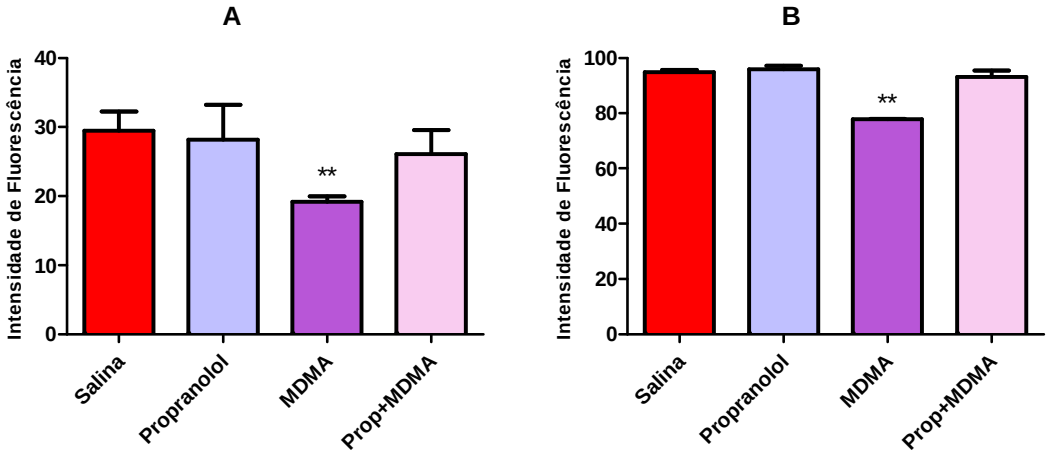

Figura 20 - A administração prévia de propranolol (20mg/kg) impede a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg). A - intensidade de fagocitose, B –. porcentagem de fagocitose. **** p<0,05 em relação a todos os grupos, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=5 animais/grupo.

Os resultados obtidos com propranolol nos causaram surpresa uma vez que o pré-tratamento com 6-OHDA não impediu os efeitos do MDMA, sobre a atividade de neutrófilos. Acreditamos que o propranolol tenha revertido os efeitos induzidos por MDMA, não pela sua ação de antagonista não seletivo de receptores β adrenérgicos, mas por se tratar de uma substância capaz de atravessar a barreira hematoencefálica atuando no hipotálamo, e consequentemente inibindo, como já sugerido, a secreção de corticosterona (Bugajski *et al.*, 1991; Bugajski *et al.*, 1995). Portanto, para confirmar se o propranolol inibiu o eixo HPA em nossos experimentos realizamos outro experimento no qual dosamos os níveis séricos de corticosterona em animais tratados com propranolol. Desta forma, trinta e seis camundongos foram separados ao acaso em 4 grupos. Os animais foram tratados pela via i.p. com um volume de 0,1 mL de solução para cada 10g de peso de cada animal. Os animais do grupo controle receberam duas injeções de solução salina. Os animais do grupo propranolol receberam uma injeção de propranolol na concentração de 20 mg/kg e uma injeção de solução salina. Os animais do grupo MDMA receberam uma injeção de solução salina e uma injeção de MDMA na concentração 10mg/kg. Por fim, os animais do grupo Prop+MDMA receberam uma injeção de propranolol (20 mg/kg) e uma injeção de MDMA (10mg/kg). Todos os animais em estudo receberam duas injeções para eliminar possíveis efeitos do estresse da injeção. A **figura 18** apresentada anteriormente representa o esquema de tratamento.

Observamos que os animais tratados com MDMA apresentaram um aumento nos níveis séricos de corticosterona, replicando dados do mestrado (De Paula *et al.*, 2009), e que o pré-tratamento com propranolol foi capaz de prevenir este aumento (KW=29,06; $p<0,0001$), confirmando nossa hipótese de que o pré-tratamento com propranolol seria capaz de prevenir as alterações induzidas na atividade de

neutrófilos pela sua capacidade de inibir a atividade do eixo HPA e não por atuar como um antagonista β adrenérgico na periferia. Os resultados obtidos estão ilustados na **figura 21**.

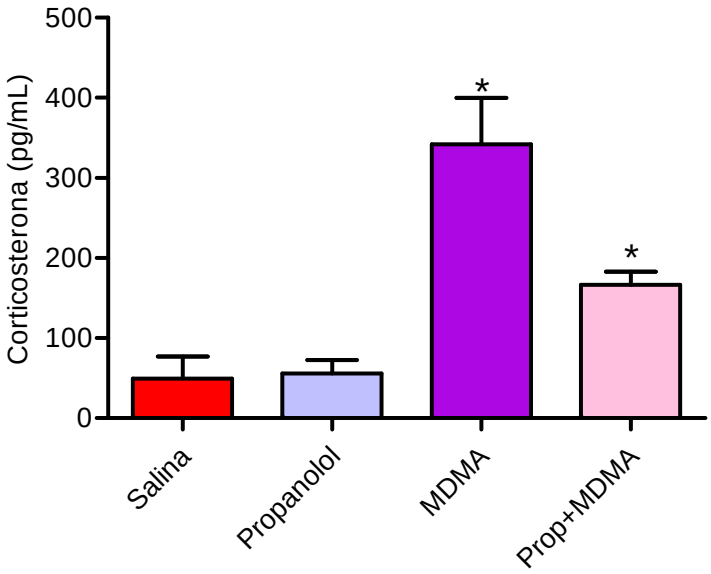

Figura 21 – Dosagens dos níveis séricos de corticosterona de animais tratados com propranolol previamente ao tratamento com MDMA. *p<0,05 em relação aos grupos salina e propranolol e são diferentes entre si, Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns de múltiplas comparações. n=9 animais/grupo.

No entanto, para confirmar nossos dados relativos à participação do SNS nos efeitos observados sobre a atividade de neutrófilos após tratamento com MDMA, realizamos outro experimento no qual tratamos os animais com ICI-118,551, um antagonista seletivo para receptores β2- adrenérgicos, previamente ao MDMA; esses resultados são mostrados a seguir.

6.5 Experimento 5 – O ICI-118,551 não previne os efeitos da administração de MDMA sobre a atividade de neutrófilos

Trinta e dois camundongos foram separados ao acaso em 4 grupos. Os animais foram tratados sempre pela via i.p. com de volume 0,1 mL de solução para cada 10g de peso de cada animal. Os animais do grupo controle receberam duas injeções de solução salina. Os animais do grupo ICI receberam uma injeção de ICI-118,551 na concentração de 15mg/kg e uma injeção de solução salina. Os animais do grupo MDMA receberam uma injeção de solução salina e uma injeção de MDMA na concentração 10mg/kg. Por fim, os animais do grupo ICI+MDMA receberam uma injeção de ICI (15mg/kg) e uma injeção de MDMA (10mg/kg). Os animais receberam a primeira injeção duas horas antes da eutanásia e a segunda injeção uma hora antes da eutanásia. Todos os animais em estudo receberam duas injeções para eliminar possíveis efeitos do estresse da injeção. A **figura 22** ilustra este esquema de tratamento.

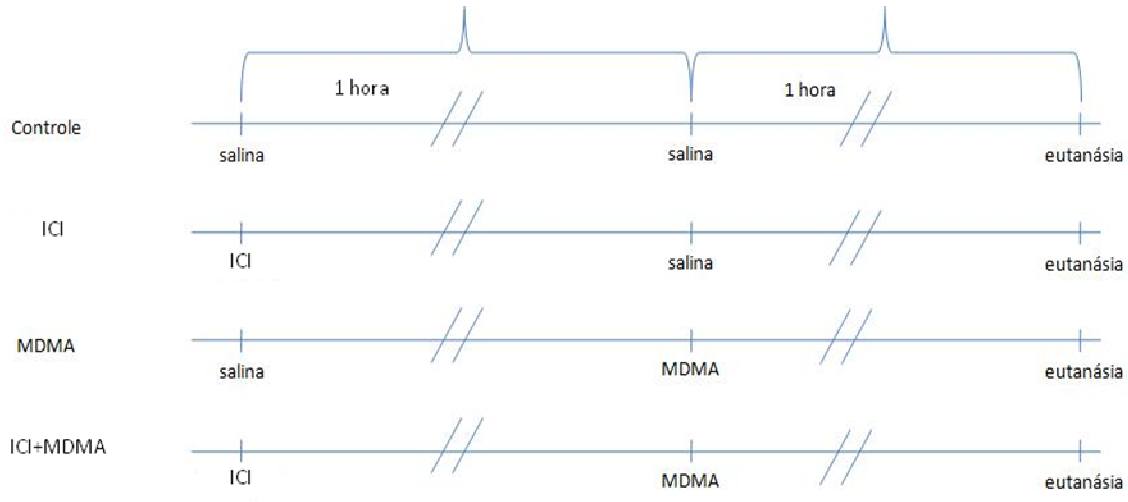

Figura 22 – Esquema de tratamento empregado para o antagonismo dos receptores β2-adrenérgicos previamente à avaliação dos efeitos do MDMA sobre a atividade de neutrófilos de camundongos Balb/C.

RESULTADOS

A **tabela 7** mostra que os efeitos produzidos pela administração de MDMA sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos não foram prevenidos pela administração prévia de ICI-118,551 (15mg/kg). A análise estatística dos dados mostrou uma redução tanto do *burst* induzido por SAPI e PMA como da intensidade e porcentagem de fagocitose nos animais tratados com MDMA em relação aos animais do grupo controle tratados com solução salina; replicamos, assim, os dados obtidos anteriormente. Entretanto, em relação aos animais do grupo tratado com salina previamente ao MDMA, observou-se no grupo dos animais tratados com ICI-118,551 previamente ao tratamento com MDMA, que os efeitos não foram prevenidos tanto no que diz respeito ao *burst* induzido por SAPI ($F(3,28)=5,865$; $p=0,0031$) e PMA ($F(3,28)=6,665$; $p=0,0015$) como no relativo à intensidade ($F(3,28)=5,611$; $p=0,0038$) e porcentagem ($F(3,28)=5,326$ $p=0,0050$) de fagocitose.

O *burst* basal dos neutrófilos não foi alterado por qualquer um dos tratamentos, e o tratamento com ICI-118,551 não alterou nenhum dos parâmetros avaliados em relação ao grupo controle tratado com salina. As **figuras 23 e 24** ilustram estes resultados.

Tabela 7- Efeitos da administração prévia de ICI-118,551 (15mg/kg) sobre a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg)

	Grupos			
Parâmetros[A]	Salina	ICI	MDMA	ICI+MDMA
Burst basal	99,20±24,59	98,47±47,41	109,2±20,75	103,00±25,56
Burst SAPI	623,30±208,70	544,30±126,60	384,30±141,00*	304,20±190,90*#
Burst PMA	623,40±82,32	521,30±102,80	476,30±41,12*	479,60±59, 98*
Int Fagocitose	94,12±16,54	82,00±38,73	48,70±30,17*#	48,12±21,09
% Fagocitose	92,56±1,954	92,12±2,188	67,25±24,65*	75,84±18,00*

Os dados representam a intensidade média de fluorescência (media±desvio padrão), correspondente ao *gate* da população de neutrófilos sangüíneos. *****p<0,05 em relação ao grupo salina e não diferem entre si, #p<0,05 em relação ao grupo ICI, dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo.

[A]**Porcentagem de Fagocitose**: porcentagem de neutrófilos que fagocitaram partículas de SAPI. **Intensidade de Fagocitose**: quantidade de bactérias fagocitadas pela população de neutrófilos.

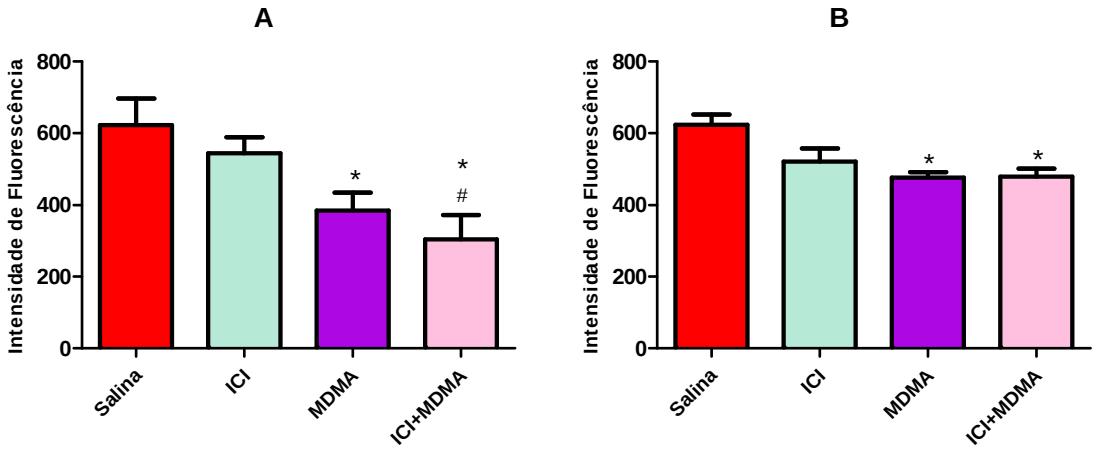

Figura 23 - A administração prévia de ICI-118,551 (15mg/kg) não impede a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg). A - *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. ***** p<0,05 em relação ao grupo controle e não diferem entre si, #p<0,05 em relação ao grupo ICI, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo.

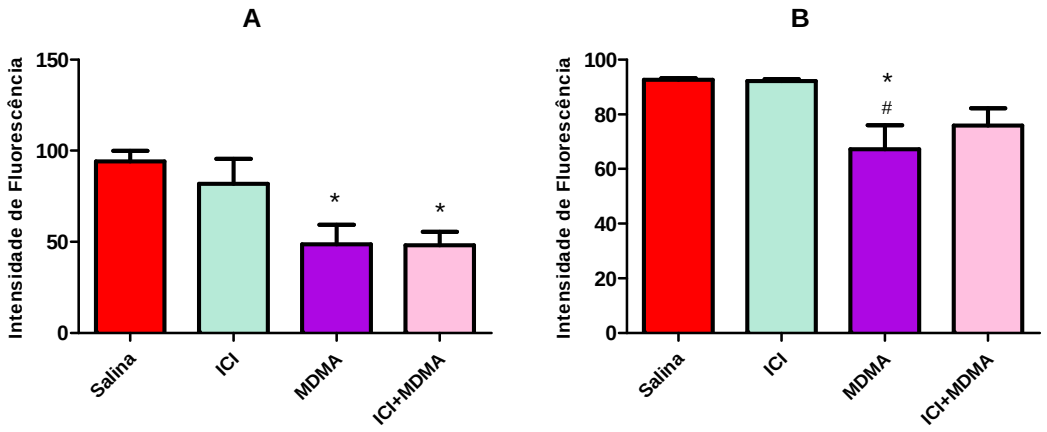

Figura 24 - A administração prévia de ICI-118,551 (15mg/kg) não impede a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg). A - intensidade de fagocitose, B –. porcentagem de fagocitose. ***** p<0,05 em relação ao grupo salina e não diferem entre si, #p<0,05 em relação ao grupo ICI, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=8 animais/grupo.

6.6 Experimento 6 – A metirapona previne a diminuição da expressão de NFκB p65 induzida por MDMA em neutrófilos

Vinte e oito camundongos foram separados ao acaso em 4 grupos. Os animais foram tratados pela via i.p. com de volume 0,1 mL de solução para cada 10g de peso de cada animal. Os animais do grupo controle receberam duas injeções de solução salina. Os animais do grupo metirapona receberam uma injeção de metirapona na concentração de 200mg/kg e uma injeção de solução salina. Os animais do grupo MDMA receberam uma injeção de solução salina e uma injeção de MDMA na concentração 10mg/kg. Por fim, os animais do grupo Metirapona+MDMA receberam uma injeção de metirapona (200mg/kg) e uma injeção de MDMA (10mg/kg). Os animais receberam a primeira injeção 3 horas antes da eutanásia e a segunda injeção 1 hora antes da eutanásia. Todos os animais em estudo receberam duas injeções para eliminar possíveis efeitos do estresse da injeção. A **figura 4** ilustra este esquema de tratamento.

RESULTADOS

A **tabela 8** mostra que o tratamento com MDMA induziu uma diminuição da expressão de NFκB p65 (ativado) e a metirapona foi capaz de prevenir estes efeitos.

A análise estatística dos dados mostrou que o tratamento com MDMA diminuiu a expressão de NFκB na população de neutrófilos ($F(3,24)=4,009$; $p=0,0197$) após estimulação com LPS *in vitro* e que a metirapona foi capaz de impedir este efeito, corroborando com os resultados obtidos na atividade de neutrófilos e demonstrando a participação do NFκB nos resultados obtidos anteriormente. Além disso, foi observado que a metirapona *per se* não induziu

alteração na expressão desse fator de transcrição quando comparado ao grupo controle. A **figura 25** ilustra estes resultados.

Tabela 8 - Efeitos da administração prévia de metirapona (200mg/kg) sobre a diminuição da expressão de NFκB p65 em neutrófilos induzida por MDMA (10mg/kg)

	Grupos			
Parâmetro	Salina	Metirapona	MDMA	Metirapona+MDMA
NFκB p65	19,33±1,24	18,72±1,40	17,35±0,52*	18,44±0,94

Os dados representam media±desvio padrão da média de intensidade de fluorescência (MIF) do *gate* de neutrófilos, *p<0,05 em relação aos demais grupos, dentro do mesmo parâmetro, Teste t-Student, n=7 animais/grupo.

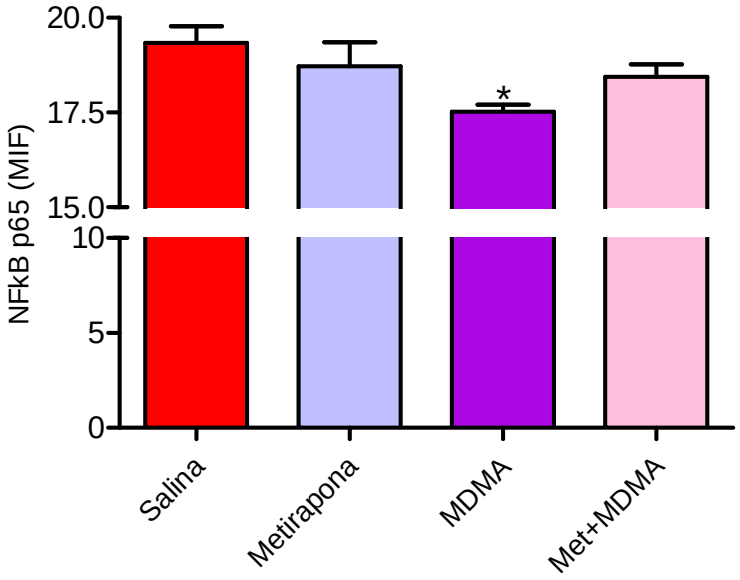

Figura 25 – A diminuição da expressão de NFκB p65 induzida por MDMA (10mg/kg) é inibida pelo pré-tratamento com metirapona (200mg/kg). *p<0,05 em relação aos demais grupos, dentro do mesmo parâmetro, Teste t-Student, n=7 animais/grupo. (MIF)=média de intensidade de fluorescência.

6.7 Experimento 7 – A metirapona não previne os efeitos da administração de MDMA sobre a distribuição de leucócitos e sobre o peso relativo do baço

Vinte e quatro camundongos foram separados ao acaso em 4 grupos. Os animais foram tratados pela via i.p. com de volume 0,1 mL de solução para cada 10g de peso de cada animal. Os animais do grupo controle receberam duas injeções de solução salina. Os animais do grupo metirapona receberam uma injeção de metirapona na concentração de 200mg/kg e uma injeção de solução salina. Os animais do grupo MDMA receberam uma injeção de solução salina e uma injeção de MDMA na concentração 10mg/kg. Por fim, os animais do grupo Metirapona+MDMA receberam uma injeção de metirapona (200mg/kg) e uma injeção de MDMA (10mg/kg). Os animais receberam a primeira injeção 3 horas antes da eutanásia e a segunda injeção 1 hora antes da eutanásia. Todos os animais em estudo receberam duas injeções para eliminar possíveis efeitos do estresse da injeção. A **figura 4** ilustra este esquema de tratamento.

RESULTADOS

A **tabela 9** mostra que o tratamento prévio com metirapona não impediu os efeitos da administração aguda de MDMA sobre a celularidade do baço e da medula óssea, e também não preveniu os efeitos do MDMA sobre o peso relativo do baço.

A análise estatística dos dados mostrou que o MDMA foi capaz de induzir uma diminuição da celularidade total da medula óssea ($F(3,21)=13,01$; $p<0,0001$), um aumento na celularidade do baço ($F(3,21)=8,863$; $p=0,0005$) e não causou alterações no número de leucócitos totais circulantes; induziu, ainda, uma diminuição no peso relativo do baço ($F(3,21)=9,950$; $p=0,0002$) em relação aos animais do grupo controle; replicando-se assim os resultados obtidos durante o mestrado. Foi possível observar que o tratamento prévio com metirapona não

preveniu os efeitos do MDMA sobre a celularidade da medula e do baço e tampouco preveniu os efeitos induzidos por MDMA sobre o peso relativo do baço. Além disso, a metirapona *per se* não foi capaz de alterar significativamente os parâmetros avaliados em relação àqueles dos animais administrados com solução salina. A **figura 26** ilustra estes resultados.

Tabela 9 - Efeitos da administração prévia de metirapona (200mg/kg) sobre as alterações na distribuição de leucócitos induzida por MDMA (10mg/kg) e sobre a alteração induzida no peso do baço

	Grupos			
Parâmetros	Salina	Metirapona	MDMA	Metirapona+MDMA
Medula (celsx10^6)	45,0±2,30	42,0±7,70	31,60±6,65*	31,0±4,47*
Baço (celsx10^6)	92,80±14,34	87,17±22,27	121,1±17,01*	126,3±13,26*
Peso relativo baço (g/100gPV)	0,44±0,039	0,45±0,018	0,40±0,015*	0,38±0,032*

Os dados representam a media±desvio padrão. *****p<0,05 em relação aos demais grupos e não diferem entre si dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

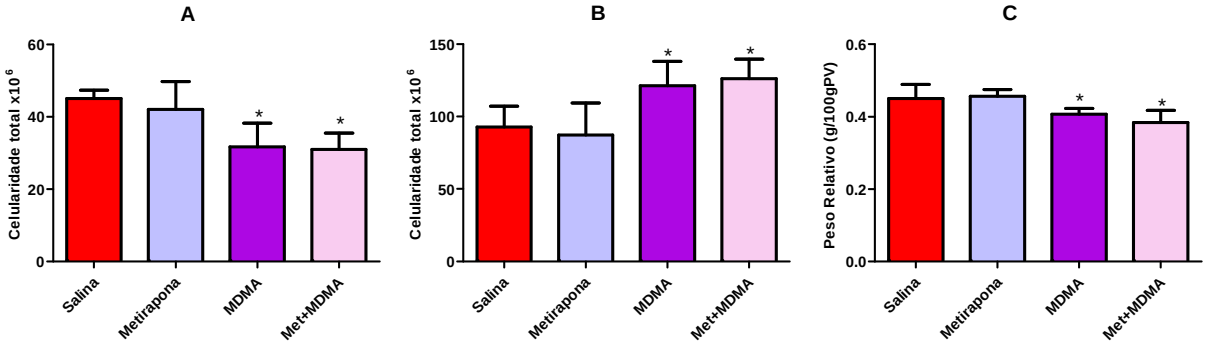

Figura 26 - A administração prévia de metirapona (200mg/kg) não impede os efeitos do MDMA (10mg/kg) sobre a celularidade na medula óssea (A) e no baço (B) e não previne os efeitos do MDMA sobre o peso relativo do baço (C).* p<0,05 em relação aos demais grupos e não diferem entre si. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

6.8 Experimento 8 – O RU-486 não previne os efeitos da administração de MDMA sobre a distribuição de leucócitos e sobre o peso relativo do baço

Vinte e quatro camundongos foram separados ao acaso em 4 grupos. Os animais foram tratados pela via i.p. com de volume 0,1 mL de solução para cada 10g de peso de cada animal, exceto os tratamentos com RU e PEG 400 que foram realizados pela via subcutânea no volume de 0,1mL por animal. Os animais do grupo controle receberam duas injeções de solução salina. Os animais do grupo PEG receberam uma injeção de PEG 400 e uma injeção de solução salina. Os animais do grupo RU receberam uma injeção de RU-486 na concentração de 25 mg/kg e uma injeção de solução salina. Os animais do grupo MDMA receberam uma injeção de solução salina e uma injeção de MDMA na concentração 10mg/kg. Por fim, os animais do grupo RU+MDMA receberam uma injeção de RU-486 (25 mg/kg) e uma injeção de MDMA (10mg/kg). Todos os animais em estudo receberam duas injeções para eliminar possíveis efeitos do estresse da injeção. A **figura 8** ilustra o esquema de tratamento.

RESULTADOS

A **tabela 10** mostra que o tratamento prévio com RU-486 não impediu os efeitos da administração aguda de MDMA sobre a celularidade do baço e da medula óssea, e também não preveniu os efeitos do MDMA sobre o peso relativo do baço.

A análise estatística dos dados mostrou que o MDMA foi capaz de induzir uma diminuição da celularidade total da medula óssea ($F(3,21)=38,19$; $p<0,0001$), um aumento na celularidade do baço ($F(3,21)=6,298$; $p=0,0010$) e não causou alterações no número de leucócitos totais circulantes; induziu, ainda, uma diminuição no peso relativo do baço ($F(3,21)=11,65$; $p<0,0001$) em relação aos animais do grupo controle; replicando-se, assim os resultados obtidos anteriormente

durante o mestrado. Foi possível observar que o tratamento prévio com RU-486 não preveniu os efeitos do MDMA sobre a celularidade da medula e do baço e tampouco preveniu os efeitos induzidos por MDMA sobre o peso relativo do baço. Além disso, o RU-486 e o PEG 400 *per se* não foram capazes de alterar significativamente os parâmetros avaliados em relação àqueles dos animais administrados com solução salina. A **figura 27** ilustra estes resultados.

Tabela 10 - Efeitos da administração prévia de RU-486 (25mg/kg) sobre as alterações na distribuição de leucócitos induzida por MDMA (10mg/kg) e sobre a alteração induzida no peso relativo do baço

	Grupos				
Parâmetros	Salina	PEG	RU	MDMA	RU+MDMA
Medula (celsx10^6)	43,88±4,25	59,20±8,58	69,0±13,32	33,17±2,99*	30,7 8±2,48*
Baço (celsx10^6)	85,50±17,38	96,50±12,12	90,60±10,36	120,7±14,68*	106,0±13,33*
Peso relativo baço (g/100gPV)	0,44±0,04	0,35±0,007#	0,41±0,02	0,38±0,01*	0,36±0,0 2*

Os dados representam a media±desvio padrão.#p<0,05 em relação aos grupos salina e RU-486, *****p<0,05 em relação aos demais grupos e não diferem entre si, dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

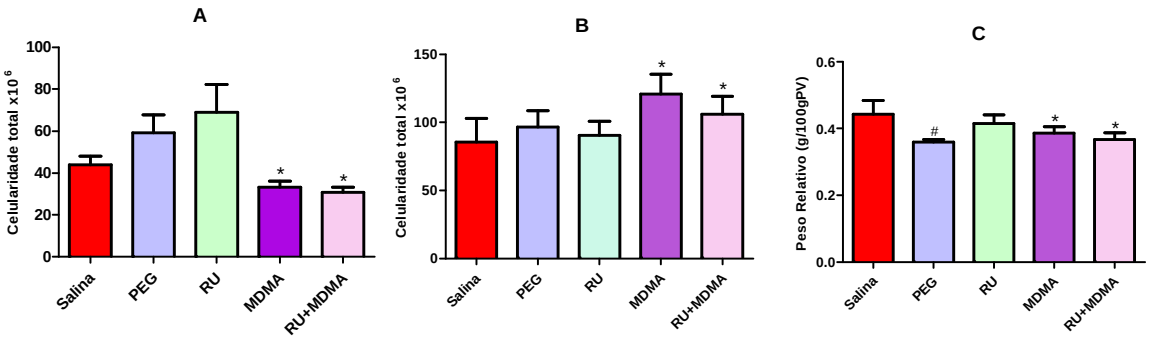

Figura 27 - A administração prévia de RU-486 (25mg/kg) não impede os efeitos do MDMA (10mg/kg) sobre a celularidade na medula óssea (A) e no baço (B) e não previne os efeitos do MDMA sobre o peso relativo do baço (C).#p<0,05 em relação aos grupos salina e RU-486, *****p<0,05 em relação aos demais grupos e não diferem entre si, dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

6.9 Experimento 9 – A metirapona previne a alteração na contagem diferencial dos leucócitos sanguíneos induzida por MDMA

Dezoito camundongos foram separados ao acaso em 3 grupos. Os animais foram tratados pela via i.p. com de volume 0,1 mL de solução para cada 10g de peso de cada animal. Os animais do grupo controle receberam duas injeções de solução salina. Os animais do grupo MDMA receberam uma injeção de solução salina e uma injeção de MDMA na concentração 10mg/kg. Por fim, os animais do grupo Metirapona+MDMA receberam uma injeção de metirapona (200mg/kg) e uma injeção de MDMA (10mg/kg). Os animais receberam a primeira injeção 3 horas antes da eutanásia e a segunda injeção 1 hora antes da eutanásia. Todos os animais em estudo receberam duas injeções para eliminar possíveis efeitos do estresse da injeção. A **figura 4** ilustra este esquema de tratamento.

RESULTADOS

A **tabela 11** mostra que o tratamento prévio com metirapona impediu os efeitos da administração aguda de MDMA sobre a porcentagem de neutrófilos e linfócitos, e que a porcentagem de monócitos não foi alterada por nenhum dos tratamentos.

A análise estatística dos dados mostrou que o MDMA foi capaz de induzir um aumento da porcentagem de neutrófilos ($F(2,15)=4,908$; $p<0,002$), uma diminuição na porcentagem de linfócitos ($F(2,15)=11,96$; $p=0,0008$) e não causou alterações na porcentagem de monócitos sanguíneos em relação aos animais controles, replicando-se, assim os resultados obtidos durante o mestrado. Além disso, foi possível observar que o tratamento prévio com metirapona preveniu os efeitos do MDMA sobre as porcentagens de neutrófilos e linfócitos sanguíneos. A **figura 28** ilustra estes resultados.

Ë importante ressaltar que neste experimento, o grupo metirapona não foi incluído por termos observado nos experimentos anteriores que a metirapona não causava alterações estatísticas significantes e desta forma, minimizamos o número de animais utilizados. Além disso, não repetimos este experimento com RU-486 por acreditarmos que os resultados que seriam obtidos com RU-486 seriam semelhantes aos observados aqui, com metirapona, como foram até o momento e desta forma também poderíamos poupar um bom número de animais.

Tabela 11 - Efeitos da administração prévia de metirapona (200mg/kg) sobre as alterações nas porcentagens de leucócitos sanguíneos induzida por MDMA (10mg/kg)

	Grupos		
Parâmetros	Salina	MDMA	Metirapona+MDMA
Monócitos (%)	2,00±1,41	1,5±1,0	2,0±0,70
Neutrófilos (%)	44,4±3,36	52,57±6,99*	44,8±2,95
Linfócitos (%)	53,0±1,87	43,2±5,89*	59,38±7,09**

Os dados representam a media±desvio padrão. *****p<0,05 em relação ao grupo salina, ** em relação ao grupo MDMA, dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

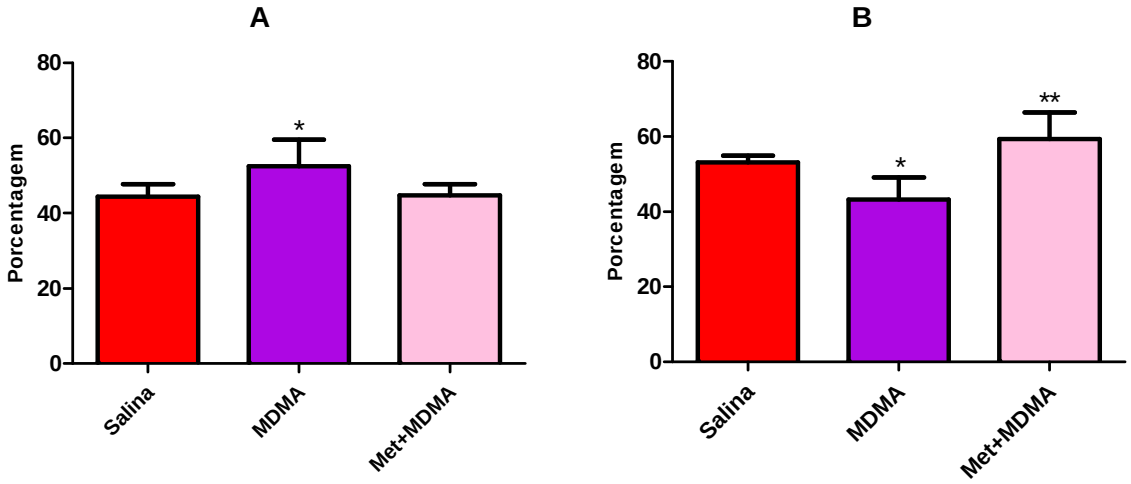

Figura 28 – Contagem diferencial de leucócitos sanguíneos. (A) Porcentagem de neutrófilos e (B) porcentagem de linfócitos. . *****p<0,05 em relação ao grupo salina, ** em relação ao grupo MDMA, dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

6.10 Experimento 10 – A 6-OHDA não previne os efeitos da administração de MDMA sobre a distribuição de leucócitos e sobre o peso relativo do baço

Vinte e quatro camundongos foram separados ao acaso em 4 grupos. Os animais foram tratados pela via i.p. e com um volume 0,1 mL das soluções usadas para cada 10g de peso corporal de cada animal. Os animais do grupo controle receberam duas injeções de solução salina. Os animais do grupo 6-OHDA receberam uma injeção de 6-OHDA, diluído em salina+Vitamina C, na concentração de 200mg/kg e uma injeção de solução salina. Os animais do grupo MDMA receberam uma injeção de solução salina e uma injeção de MDMA na concentração 10mg/kg. Por fim, os animais do grupo 6-OHDA+MDMA receberam uma injeção de 6-OHDA (200mg/kg) e uma injeção de MDMA (10mg/kg). Os camundongos receberam a primeira injeção 3 dias antes da eutanásia e a segunda injeção uma hora antes da eutanásia. Todos os animais em estudo receberam duas injeções para eliminar possíveis efeitos do estresse da injeção, como ilustrado na **figura 15**.

RESULTADOS

A **tabela 12** mostra que o tratamento prévio com 6-OHDA não impediu os efeitos da administração aguda de MDMA sobre a celularidade do baço e da medula óssea, e também não preveniu os efeitos do MDMA sobre o peso relativo do baço.

A análise estatística dos dados mostrou que o MDMA foi capaz de induzir uma diminuição da celularidade total da medula óssea ($F(3,21)=8,411$; $p=0,0004$), um aumento na celularidade do baço ($F(3,21)=110,0$; $p<0,0001$) e não causou alterações no número de leucócitos totais circulantes; induziu, ainda, uma diminuição no peso relativo do baço ($F(3,21)=21,97$; $p<0,0001$) em relação aos animais do grupo controle; replicando-se assim, os resultados obtidos durante o

mestrado. Foi possível observar que o tratamento prévio com 6-OHDA não preveniu os efeitos do MDMA sobre a celularidade da medula e do baço e tampouco preveniu os efeitos induzidos por MDMA sobre o peso relativo do baço. Além disso, a 6-OHDA induziu *per se* alterações significantes em todos os parâmetros avaliados em relação aos animais do grupo controle e acreditamos que este fato tenha dificultado observar inibição dos efeitos do MDMA. A **figura 29** ilustra estes resultados.

Tabela 12 - Efeitos da administração prévia de 6-OHDA (200mg/kg) sobre as alterações na distribuição de leucócitos induzida por MDMA (10mg/kg) e sobre a alteração induzida no peso relativo do baço

	Grupos			
Parâmetros	Controle	6-OHDA	MDMA	6-OHDA+MDMA
Medula (celsx10^6)	39,98±7,55	28,06±5,02#	28,64±2,88#	28,88±5,73#
Baço (celsx10^6)	122,7±10,78	62,75±4,96**	149,3±10,35*	61,00±13,05**
Peso relativo baço (g/100gPV)	0,43±0,02	0,38±0,03**	0,38±0,01**	0,33±0,02*

Os dados representam a media±desvio padrão. *****p<0,05 em relação a todos os grupos, **p<0,05 em relação aos outros grupos e não diferem entre si, #p<0,05 em relação ao grupo controle e não diferem entre si dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

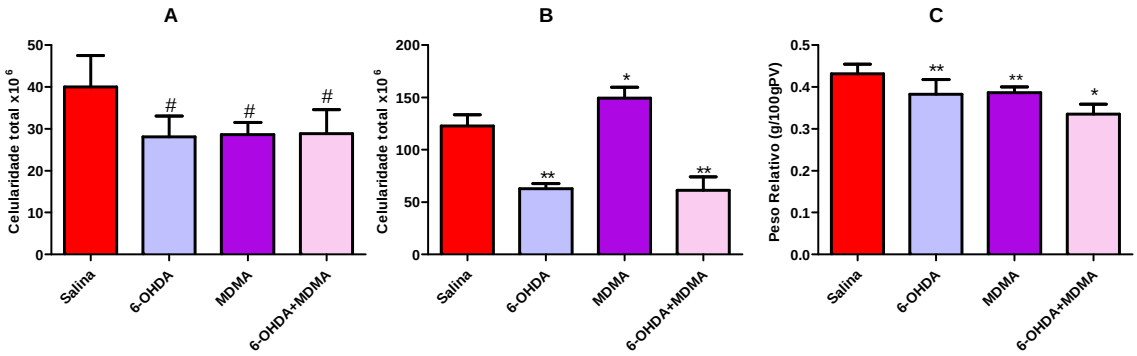

Figura 29 - A administração prévia de 6-OHDA (200mg/kg) não impede os efeitos do MDMA (10mg/kg) sobre a celularidade na medula óssea (A) e no baço (B) e não previne os efeitos do MDMA sobre o peso relativo do baço (C).* p<0,05 em relação a todos os grupos, **p<0,05 em relação aos outros grupos e não diferem entre si, #p<0,05 em relação ao grupo controle e não diferem entre si dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

6.11 Experimento 11 - O ICI 118,551 previne os efeitos da administração de MDMA sobre a distribuição de leucócitos e sobre o peso relativo do baço

Vinte e quatro camundongos foram separados ao acaso em 4 grupos. Os animais foram tratados sempre pela via i.p. com de volume 0,1 mL de solução para cada 10g de peso de cada animal. Os animais do grupo controle receberam duas injeções de solução salina. Os animais do grupo ICI receberam uma injeção de ICI-118,551 na concentração de 15mg/kg e uma injeção de solução salina. Os animais do grupo MDMA receberam uma injeção de solução salina e uma injeção de MDMA na concentração 10mg/kg. Por fim, os animais do grupo ICI+MDMA receberam uma injeção de ICI (15mg/kg) e uma injeção de MDMA (10mg/kg). Os animais receberam a primeira injeção 2 horas antes da eutanásia e a segunda injeção 1 hora antes da eutanásia. Todos os animais em estudo receberam duas injeções para eliminar possíveis efeitos do estresse da injeção. A **figura 22** ilustra este esquema de tratamento.

RESULTADOS

A **tabela 13** mostra que o tratamento prévio com ICI 118,551 preveniu os efeitos da administração aguda de MDMA sobre a celularidade do baço e da medula óssea, e também sobre os efeitos do MDMA no peso relativo do baço.

A análise estatística dos dados mostrou que o MDMA foi capaz de induzir uma diminuição da celularidade total da medula óssea ($F(3,21)=12,68$; $p<0,0001$), um aumento na celularidade do baço ($F(3,21)=9,387$; $p=0,0005$) e não causou alterações no número de leucócitos totais circulantes; induziu, ainda, uma diminuição no peso relativo do baço ($F(3,21)=7,081$; $p=0,0017$) em relação aos animais do grupo controle; replicando-se assim, os resultados obtidos anteriormente

e também durante o mestrado. Foi possível observar que o tratamento prévio com ICI preveniu os efeitos do MDMA sobre a celularidade da medula e do baço e também preveniu os efeitos induzidos por MDMA sobre o peso relativo do baço. Além disso, o ICI *per se* não induziu alterações significantes nos parâmetros avaliados em relação aos animais administrados com solução salina. A **figura 30** ilustra estes resultados.

Tabela 13 - Efeitos da administração prévia de ICI 118,551 (15mg/kg) sobre as alterações na distribuição de leucócitos induzida por MDMA (10mg/kg) e sobre a alteração induzida no peso relativo do baço

	Grupos			
Parâmetros	Controle	ICI	MDMA	ICI+MDMA
Medula (celsx10^6)	39,98±7,55	34,81±3,49	28,64±2,88*	41,88±4,67
Baço (celsx10^6)	122,7±10,78	107,3±11,62	149,3±10,35*	120,0±17,54
Peso relativo baço (g/100gPV)	0,43±0,02	0,44±0,02	0,38±0,01*	0,42±0,03

Os dados representam a media±desvio padrão. *****p<0,05 em relação a todos os grupos dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

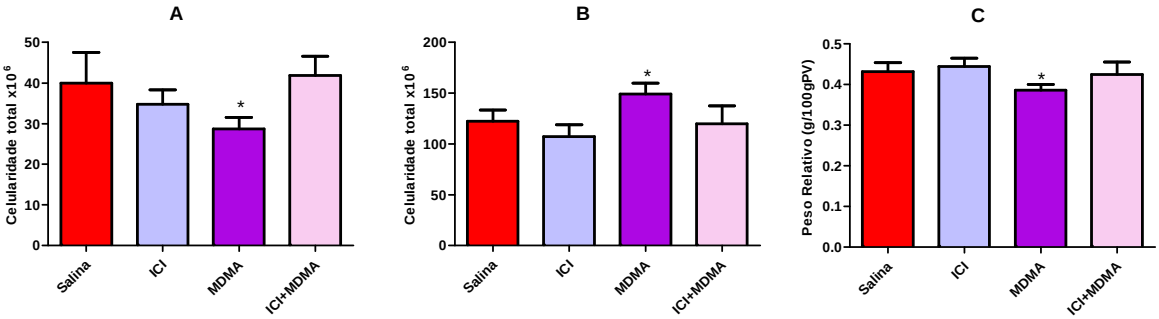

Figura 30 – A administração prévia de ICI (15mg/kg) previne os efeitos do MDMA (10mg/kg) sobre a celularidade na medula óssea (A) e no baço (B) e previne os efeitos do MDMA sobre o peso relativo do baço (C). *p<0,05 em relação a todos os grupos dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

6.12 Experimento 12 – O ICI 118,551 não previne a alteração na contagem diferencial dos leucócitos sanguíneos induzida por MDMA

Dezoito camundongos foram separados ao acaso em 3 grupos. Os animais foram tratados sempre pela via i.p. com de volume 0,1 mL de solução para cada 10g de peso de cada animal. Os animais do grupo controle receberam duas injeções de solução salina. Os animais do grupo MDMA receberam uma injeção de solução salina e uma injeção de MDMA na concentração 10mg/kg. Por fim, os animais do grupo ICI+MDMA receberam uma injeção de ICI (15mg/kg) e uma injeção de MDMA (10mg/kg). Os animais receberam a primeira injeção 2 horas antes da eutanásia e a segunda injeção 1 hora antes da eutanásia. Todos os animais em estudo receberam duas injeções para eliminar possíveis efeitos do estresse da injeção. A **figura 22** ilustra este esquema de tratamento.

RESULTADOS

A **tabela 14** mostra que o tratamento prévio com ICI não impediu os efeitos da administração aguda de MDMA sobre a porcentagem de neutrófilos e linfócitos, e que a porcentagem de monócitos não foi alterada por nenhum dos tratamentos.

A análise estatística dos dados mostrou que o MDMA foi capaz de induzir um aumento da porcentagem de neutrófilos ($F(2,15)=4,129$; $p=0,003$), uma diminuição na porcentagem de linfócitos ($F(2,15)=4,129$; $p=0,03$) e não causou alterações na porcentagem de monócitos sanguíneos em relação aos animais controles, replicando-se assim, os resultados obtidos durante o mestrado. Além disso, foi possível observar que o tratamento prévio com ICI não preveniu os efeitos do MDMA sobre nenhum dos parâmetros avaliados. A **figura 31** ilustra estes resultados.

É importante ressaltar que neste experimento, o grupo ICI não foi incluído por termos observado nos experimentos anteriores que o tratamento com ICI 118,551 não causou alterações estatísticas significantes e desta forma, minimizamos o número de animais utilizados. Além disso, não repetimos este experimento com 6-OHDA por termos observado no experimento 10 que esta substância apresentou efeitos *per se* nestes parâmetros e desta forma, também poupamos um bom número de animais.

Tabela 14 - Efeitos da administração prévia de metirapona (200mg/kg) sobre as alterações nas porcentagens de leucócitos sanguíneos induzida por MDMA (10mg/kg)

	Grupos		
Parâmetros	Salina	MDMA	ICI+MDMA
Monócitos (%)	2,33±0,57	2,66±0,58	1,83±0,75
Neutrófilos (%)	37,33±5,68	52,20±9,25*	50,90±7,4
Linfócitos (%)	58,0±6,08	44,0±6,59*	46,0±6,16**

Os dados representam a media±desvio padrão. *****p<0,05 em relação ao grupo salina e não diferem entre si, dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

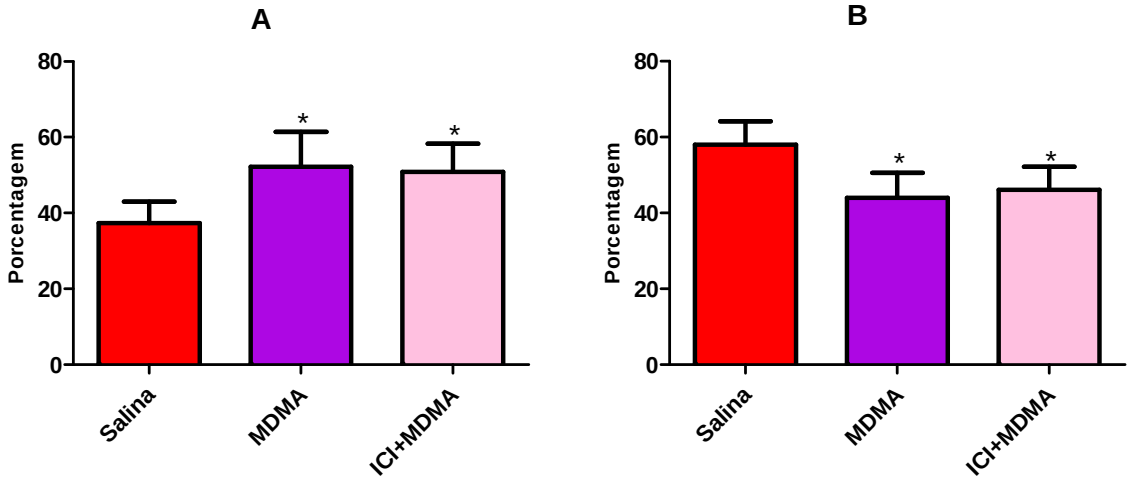

Figura 31 - Contagem diferencial de leucócitos sanguíneos. (A) Porcentagem de neutrófilos e (B) porcentagem de linfócitos. . *p<0,05 em relação ao grupo salina e não diferem entre si, dentro do mesmo parâmetro, Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

6.13 Experimento 13 - O MDMA induz mielossupressão em animais infectados com *Listeria monocytogenes*

Para avaliarmos se os efeitos induzidos por MDMA observados até o momento podem ser considerados imunossupressores, realizamos um protocolo de infecção experimental com LM para observarmos se as alterações induzidas por MDMA na atividade de neutrófilos e na distribuição de leucócitos seria capaz de prejudicar a resposta desses animais à infecção.

Setenta e dois camundongos foram separados ao acaso em 3 grupos: 24h, 48h e 72h e, depois, subdivididos em mais 4 grupos: Salina, MDMA, LM e MDMA+LM. Na primeira injeção, todos os animais foram tratados pela via i.p. com volume de 0,1 mL de solução para cada 10g de peso de cada animal. Na segunda injeção, todos os animais foram tratados pela via i.p. com volume de 0,2 mL de solução por animal. Os animais do grupo controle receberam duas injeções de solução salina. Os animais do grupo MDMA receberam uma injeção de MDMA (10,0 mg/kg) e uma injeção de solução salina. Os animais do grupo LM receberam uma injeção de solução salina e uma injeção de LM diluída (dose subletal) em solução salina. Por fim, os animais do grupo MDMA+LM receberam uma injeção de MDMA (10mg/kg) e uma injeção de LM diluída (dose subletal) em solução salina. Os animais receberam a primeira injeção 1 hora antes da inoculação da bactéria e foram submetidos a eutanásia após 24h, 48h e 72h da inoculação. Todos os animais em estudo receberam duas injeções para eliminar possíveis efeitos do estresse da injeção. A **figura 32** ilustra este esquema de tratamento.

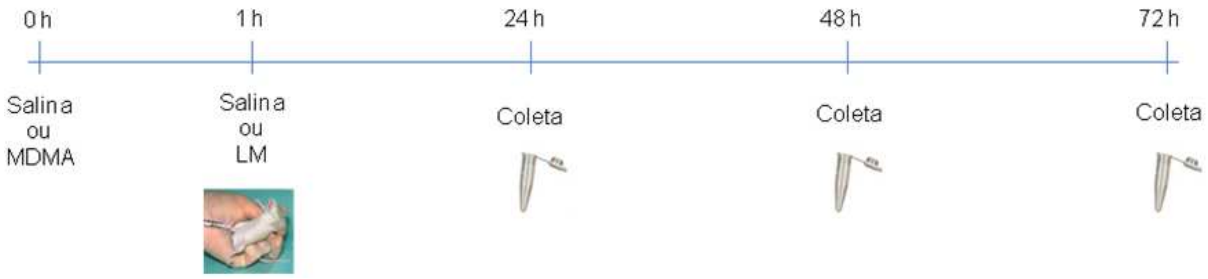

Figura 32 - Esquema de tratamento empregado para avaliar os efeitos da infecção por *Listeria monocytogenes* em camundongos Balb/C tratados com MDMA (10,0mg/kg).

RESULTADOS

A **tabela 15** mostra os efeitos produzidos pela administração de MDMA sobre o número de CFU-GM da medula óssea e baço de animais não infectados e infectados com dose subletal de *L. monocytogenes.* Nos animais não infectados, o tratamento com MDMA foi capaz de causar uma mielosupressão já nas primeiras 24h ($F(3,20)=17,54$; $p<0,0001$) e esses efeitos se mantiveram também nas 48h ($F(3,20)=108,1$; $p<0,0001$) e 72h ($F(3,20)=64,75$; $p<0,0001$) após o tratamento em relação aos animais tratados com salina e não infectados. Além disso, como já era esperado, os animais infectados tratados ou não com MDMA, apresentaram uma mielossupressão em relação aos animais controles não infectados, sendo esta mielossupressão ainda mais drástica nos animais infectados tratados com MDMA após 72h da infecção, demonstrando o potencial imunossupressor desta droga.

Em relação à hematopoese extamedular, a análise estatística dos dados demonstrou que o tratamento com MDMA em animais não infectados foi capaz de aumentar expressivamente o número de CFU-GM no baço nas 24h ($F(3,20)=11,26$; $p=0,0002$) e 48h ($F(3,20)=14,14$; $p<0,0001$) após o tratamento em relação aos outros grupos. A infecção com LM produziu um aumento significativo no número de colônias esplênicas após 48h e 72h da infecção, sendo que os animais infectados

tratados com MDMA apresentaram um aumento ainda mais expressivo após 72h da infecção (F(3,20)=81,17; p<0,0001) quando comparado aos demais grupos. As **figuras 33 e 34** ilustram estes resultados e para melhor visualização dos efeitos os dados foram representados como porcentagem em relação ao controle.

Tabela 15 - Efeitos induzidos pela administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número de CFU-GM da medula óssea e baço de animais não infectados e infectados com dose subletal de LM.

		Grupos			
	Tempos	Salina	MDMA	LM	MDMA+LM
Medula óssea	**24 h**	3,997± 1,040	1,568± 0,664*	2,275± 0,424*	1,702± 0,073*
	48 h	8,401± 1,545	2,120± 0,465*	1,647±0,096*	1,025± 0,022*
	72 h	6,125± 0,782	4,125± 0,559#	2,275±1,051#	0,683±0,127#
Baço	**24 h**	23,76±6,440	36,00±10,95*	16,13±0,454	19,26±0,805
	48 h	19,26±0,483	116,3±47,98*	72,54±39,44*	16,20±3,542
	72 h	7,560±0,966	5,580±0,161	111,1±28,17#	229,0±50,23#

Os dados representam a media±desvio padrão, correspondente ao número de CFU-GM da medula óssea e do baço. *****p<0,05 em relação ao grupo salina e não diferem entre si, #p<0,05 em relação ao grupo salina e diferem entre si, dentro do mesmo período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

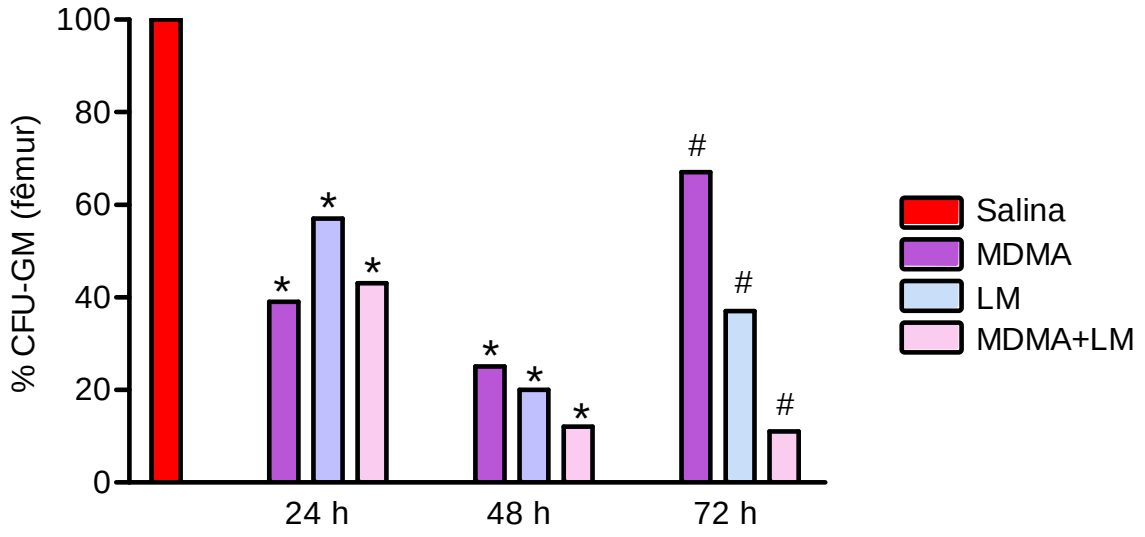

Figura 33 - Efeitos produzidos pela administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número de CFU-GM da medula óssea de animais não infectados e infectados com dose subletal de LM. * p<0,05 em relação ao grupo salina e não diferem entre si, #p<0,05 em relação ao grupo salina e diferem entre si, dentro do mesmo período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo. Representação gráfica como porcentagem em relação ao grupo controle (salina).

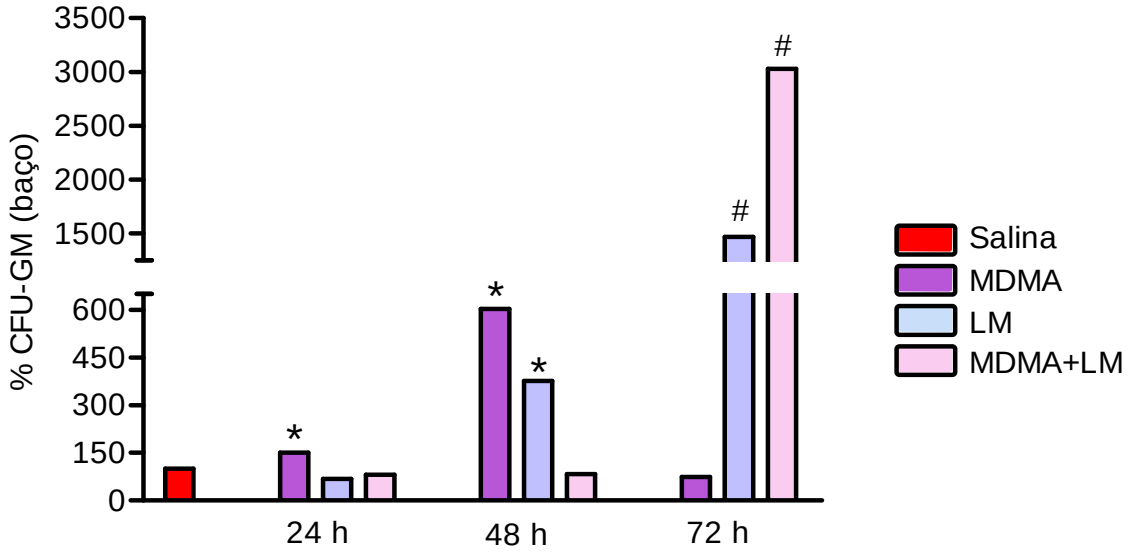

Figura 34 - Efeitos produzidos pela administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre o número de CFU-GM do baço de animais não infectados e infectados com dose subletal de LM. * p<0,05 em relação a todos os grupos, #p<0,05 em relação aos demais grupos e diferem entre si, dentro do mesmo período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo. Representação gráfica como porcentagem em relação ao grupo controle (salina).

6.14 Experimento 14 – O MDMA não altera a atividade estimuladora de colônias (CSA) de progenitores da medula óssea em animais infectados com *Listeria monocytogenes*

Setenta e dois camundongos foram separados ao acaso em 3 grupos: 24h, 48h e 72h e depois subdivididos em mais 4 grupos: Salina, MDMA, LM e MDMA+LM. Na primeira injeção, todos os animais foram tratados pela via i.p. com volume de 0,1 mL de solução para cada 10g de peso de cada animal. Na segunda injeção, todos os animais foram tratados pela via i.p. com volume de 0,2 mL de solução por animal. Os animais do grupo controle receberam duas injeções de solução salina. Os animais do grupo MDMA receberam uma injeção de MDMA (10,0 mg/kg) e uma injeção de solução salina. Os animais do grupo LM receberam uma injeção de solução salina e uma injeção de LM diluída (dose subletal) em solução salina. Por fim, os animais do grupo MDMA+LM receberam uma injeção de MDMA (10mg/kg) e uma injeção de LM diluída (dose subletal) em solução salina. Os animais receberam a primeira injeção 1 hora antes da inoculação da bactéria e foram submetidos a eutanásia após 24h, 48h e 72h da inoculação. Todos os animais em estudo receberam duas injeções para eliminar possíveis efeitos do estresse da injeção. A **figura 32** ilustra este esquema de tratamento.

Resultados

A **tabela 16** mostra a avaliação de CSA no soro de animais não infectados e infectados com dose subletal de LM tratados ou não com MDMA. A análise estatística dos dados mostrou que nos animais tratados com MDMA e não infectados não se observou efeito sobre o crescimento e diferenciação de células progenitoras da medula óssea de animais *naive*.

A presença da infecção induziu um aumento nos níveis séricos de CSA nos animais infectados e não tratados com MDMA em relação aos outros grupos após 24h (KW=19,14; p=0,0003) da infecção; este aumento foi observado nos animais infectados tratados e não tratados com MDMA após 48h (KW=20,28; p=0,0001) e 72h (KW=20,35; p=0,0001) da infecção em relação aos animais não infectados, demonstrando que o tratamento com MDMA em animais infectados não altera os níves de CSA em relação aos animais infectados e não tratados. A **figura 35** ilustra esses resultados.

Tabela 16 - Efeitos induzidos pela administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a atividade estimuladora de colônias no soro de animais não infectados e infectados com dose subletal de LM.

	Grupos			
CSA	Salina	MDMA	LM	MDMA+LM
24 h	0,333±0,005	0,333±0,005	1,503±0,746*	0,670±0,008
48 h	0,336±0,005	0,503±0,146	7,840±0,447#	8,500±0,152#
72 h	0,336±0,005	0,333±0,005	13,50±1,342#	10,33±1,194#

Os dados representam a media±desvio padrão, correspondente às unidades de CSA/mL do soro de animais infectados e não infectados por LM. *****p<0,05 em relação aos demais grupos, #p<0,05 em relação aos grupos salina e MDMA e são diferentes entre si, dentro do mesmo período de tempo. Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

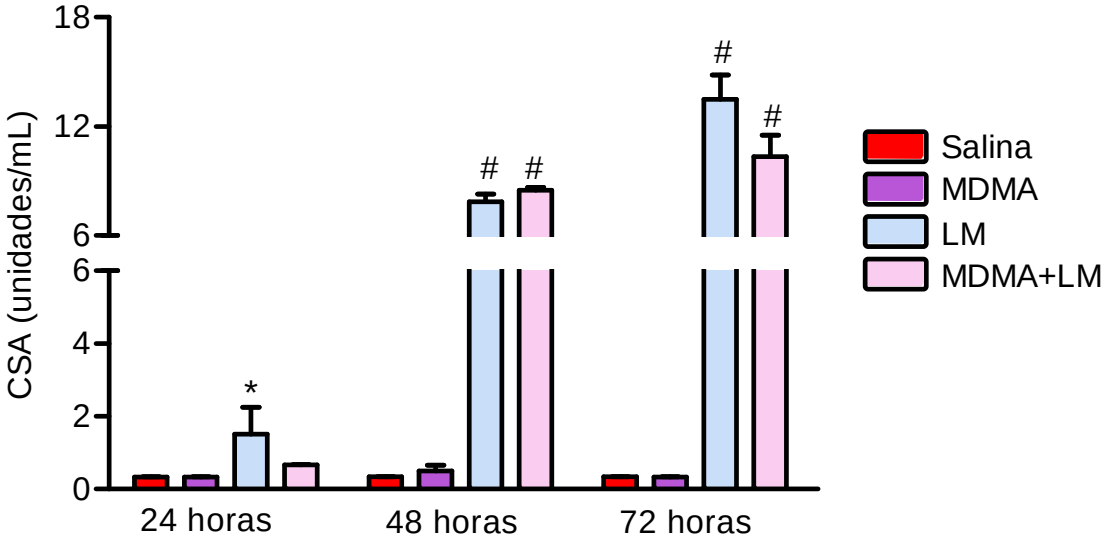

Figura 35 - Efeitos da administração de 10,0 mg/kg de MDMA sobre a atividade estimuladora de colônias (CSA) no soro de animais não infectados e infectados com dose subletal de LM. *p<0,05 em relação aos demais grupos, #p<0,05 em relação aos grupos salina e MDMA e são diferentes entre si, dentro do mesmo período de tempo. Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

6.15 Experimento 15 – O MDMA induz alteração na distribuição de leucócitos no sangue, baço e medula óssea de animais infectados com *Listeria monocytogenes*

Setenta e dois camundongos foram separados ao acaso em 3 grupos: 24h, 48h e 72h e depois subdivididos em mais 4 grupos: Salina, MDMA, LM e MDMA+LM. Na primeira injeção, todos os animais foram tratados pela via i.p. com volume de 0,1 mL de solução para cada 10g de peso de cada animal. Na segunda injeção, todos os animais foram tratados pela via i.p. com volume de 0,2 mL de solução por animal. Os animais do grupo controle receberam duas injeções de solução salina. Os animais do grupo MDMA receberam uma injeção de MDMA (10,0 mg/kg) e uma injeção de solução salina. Os animais do grupo LM receberam uma injeção de solução salina e uma injeção de LM diluída (dose subletal) em solução salina. Por fim, os animais do grupo MDMA+LM receberam uma injeção de MDMA (10mg/kg) e uma injeção de LM diluída (dose subletal) em solução salina. Os animais receberam a primeira injeção 1 hora antes da inoculação da bactéria e foram submetidos a eutanásia após 24h, 48h e 72h da inoculação. Todos os animais em estudo receberam duas injeções para eliminar possíveis efeitos do estresse da injeção. A **figura 32** ilustra este esquema de tratamento.

RESULTADOS

A **tabela 17** mostra a distribuição de leucócitos totais no sangue, baço e medula óssea de animais tratados ou não com MDMA (10,0mg/kg) não infectados e infectados com dose subletal de *L. monocytogenes.* A análise estatística dos dados mostrou em relação aos animais dos grupos não infectados que os animais

infectados tratados com MDMA apresentaram uma diminuição no número de leucócitos totais no sangue 72h após ($F(3,20)=4,803$; $p=0,0112$) a infecção e o mesmo ocorreu na medula óssea 24h ($F(3,20)=3,401$; $p=0,0378$), 48h ($KW=15,47$; $p=0,0015$) e 72h ($F(3,20)=8,956$; $p=0,0006$) após a infecção por LM; também observamos um aumento da celularidade do baço 72h ($KW=10,98$; $p=0,018$) após a infecção no grupo tratado com MDMA em relação ao grupo tratado não infectado. O peso relativo do baço apresentou um aumento induzido pela infecção após 48h ($F(3,20)=13,90$; $p<0,0001$) e 72h ($F(3,20)=16,19$; $p<0,0001$) quando comparado aos grupos não infectados. As **figuras 36, 37, 38 e 39** ilustram esses resultados.

Tabela 17 – Efeitos do tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) sobre a distribuição de leucócitos totais no sangue, baço e medula óssea de animais não infectados e infectados com dose subletal de LM.

		Grupos			
Tempo	**Parametros**	Salina	MDMA	LM	MDMA+LM
24 h	**Sangue (cels x10^6/mm^3)**	5,767±1,362	5,367±2,307	5,683±1,751	6,417±1,300
	Baço (cels x10^6/mm^3)	368,3±84,27	366,9±88,64	415,4±112,5	335,8±87,51
	Medula óssea (cels x10^6/mm^3)	28,21±4,766	22,67±4,890	23,79±3,992	20,13±4,224*
	Peso relativo do baço (g/100gPV)	0,513±0,050	0,495±0,045	0,598±0,050	0,528±0,096
48 h	**Sangue (cels x10^6/mm^3)**	4,633±1,823	4,950±0,8803	5,133±1,042	5,667±1,048
	Baço (cels x10^6/mm^3)	369,2±130,6	438,9±79,43	534,9±135,9	541,2±139,2
	Medula óssea (cels x10^6/mm^3)	37,21±11,98	46,00±12,69	32,54±3,444	23,79±1,853*
	Peso relativo do baço (g/100gPV)	0,526±0,075	0,516±0,053	0,693±0,055*#	0,686±0,068*#
72 h	**Sangue (cels x10^6/mm^3)**	5,283±1,272	5,283±0,9174	6,350±1,355	3,967±0,6802**
	Baço (cels x10^6/mm^3)	340,5±52,43	303,4±66,00	455,7±82,83	535,2±142,6#
	Medula óssea (cels x10^6/mm^3)	35,25±7,691	36,04±4,721	24,54±6,847*#	19,88±6,555*#
	Peso relativo do baço (g/100gPV)	0,543±0,061	0,495±0,047	0,841±0,131*#	0,783±0,143*#

Os dados representam a media±desvio padrão, correspondente a contagem de células totais e peso relativo do baço de animais infectados e não infectados por LM. *****p<0,05 em relação ao grupo salina, #p<0,05 em relação ao grupo MDMA e não diferem entre si, ** p<0,05 em relação ao grupo LM, dentro do mesmo período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações ou o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

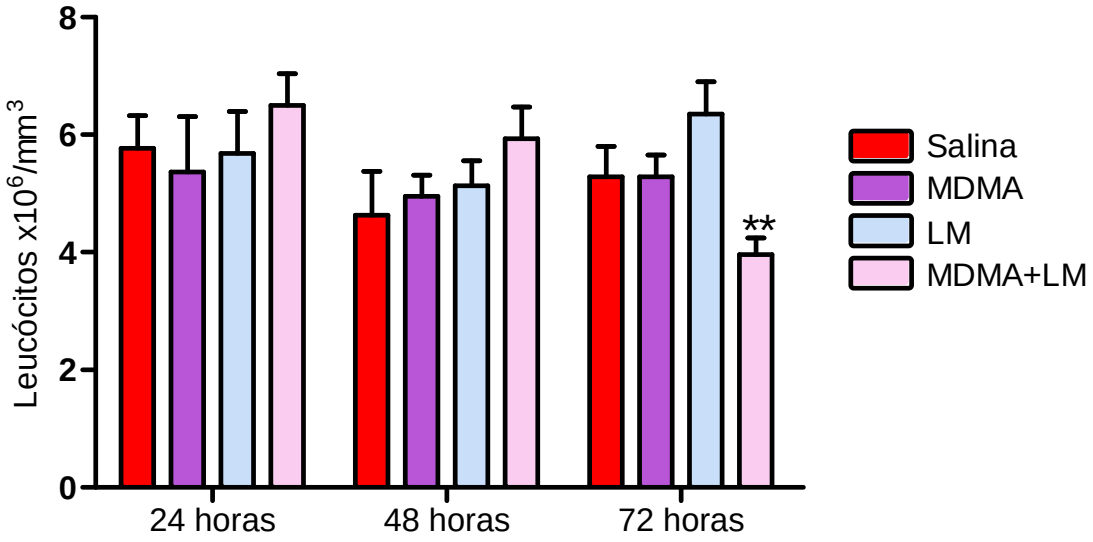

Figura 36 – Efeitos do tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) sobre a contagem de leucócitos totais no sangue de animais não infectados e infectados com dose subletal de LM. ** p<0,05 em relação ao grupo LM, dentro do memso período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações ou o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

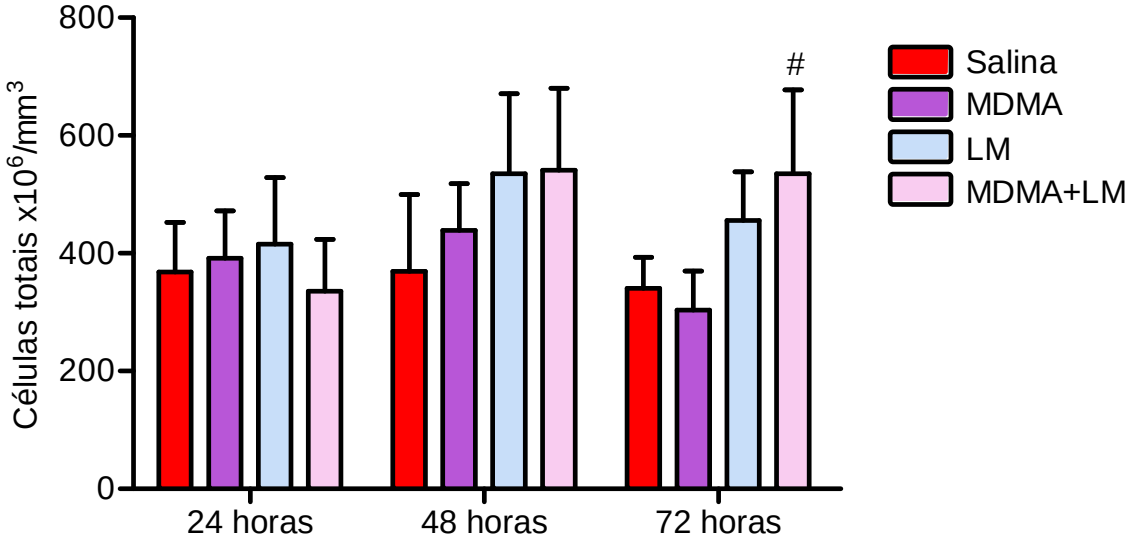

Figura 37 - Efeitos do tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) sobre a contagem de leucócitos totais no baço de animais não infectados e infectados com dose subletal de LM. #p<0,05 em relação ao grupo MDMA e não diferem entre si, dentro do mesmo período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações ou o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

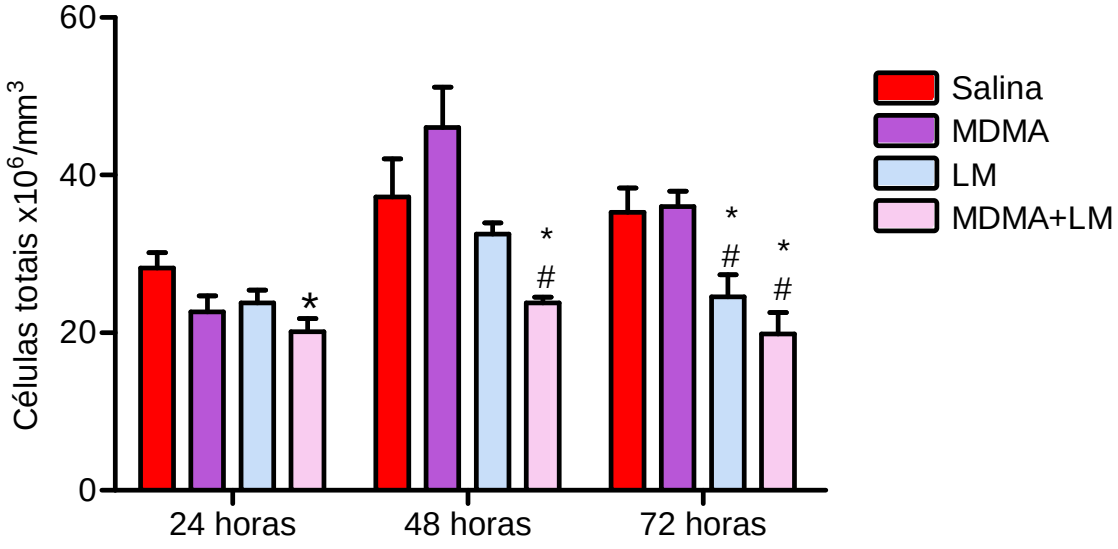

Figura 38 - Efeitos do tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) sobre a contagem de leucócitos totais na medula óssea de animais não infectados e infectados com dose subletal de LM. *****p<0,05 em relação ao grupo salina, #p<0,05 em relação ao grupo MDMA e não diferem entre si, dentro do mesmo período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações ou o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

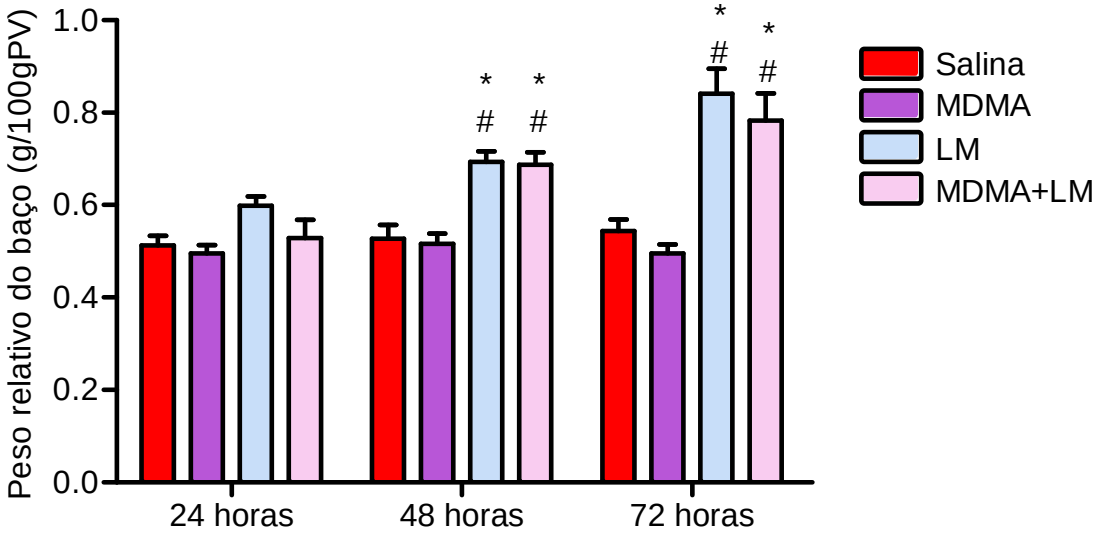

Figura 39 - Efeitos do tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) sobre o peso relativo do baço de animais não infectados e infectados com dose subletal de LM. *****p<0,05 em relação ao grupo salina, #p<0,05 em relação ao grupo MDMA e não diferem entre si, dentro do mesmo período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações ou o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

6.16 Experimento 16 – Dosagem de citocinas no soro de animais tratados com MDMA e infectados com *Listeria monocytogenes*

Setenta e dois camundongos foram separados ao acaso em 3 grupos: 24h, 48h e 72h e depois subdivididos em mais 4 grupos: Salina, MDMA, LM e MDMA+LM. Na primeira injeção, todos os animais foram tratados pela via i.p. com volume de 0,1 mL de solução para cada 10g de peso de cada animal. Na segunda injeção, todos os animais foram tratados pela via i.p. com volume de 0,2 mL de solução por animal. Os animais do grupo controle receberam duas injeções de solução salina. Os animais do grupo MDMA receberam uma injeção de MDMA (10,0 mg/kg) e uma injeção de solução salina. Os animais do grupo LM receberam uma injeção de solução salina e uma injeção de LM diluída (dose subletal) em solução salina. Por fim, os animais do grupo MDMA+LM receberam uma injeção de MDMA (10mg/kg) e uma injeção de LM diluída (dose subletal) em solução salina. Os animais receberam a primeira injeção 1 hora antes da inoculação da bactéria e foram submetidos a eutanásia após 24h, 48h e 72h da inoculação para coleta de sangue e subsequente análise de citocinas no soro. Todos os animais em estudo receberam duas injeções para eliminar possíveis efeitos do estresse da injeção. A **figura 32** ilustra este esquema de tratamento.

RESULTADOS

Como esperado, os animais não infectados (sem estímulo) apresentaram níveis basais muitos baixos e até mesmo indetectáveis das diferentes citocinas avaliadas; somente os animais infectados apresentaram expressão significativa das diferentes citocinas e quimiocina, as diferenças entre os grupos podem ser observadas na **tabela 18.**

A análise estatística dos dados, confirmando informações anteriores, mostrou que os animais não infectados e tratados com MDMA não apresentaram alterações significativas na expressão de nenhuma das citocinas e quimiocina analisadas quando comparados com os animais do grupo controle não infectados.

Observamos que o tratamento com MDMA foi capaz de induzir uma tendência a diminuição nos níveis de IL12p70, TNF, IFNγ, MCP-1 e IL-6 nos animais infectados em relação aos animais infectados não tratados nas primeiras 24h de infecção. No entanto, 48h após a infecção, os níveis destas citocinas nos animais tratados e infectados, apresentaram um aumento em sua expressão igualando-se àqueles dos animais infectados e não tratados. Por fim, 72h após a infecção, observou-se um aumento significativo destas citocinas nos animais tratados e infectados quando comparados aos animais infectados e não tratados. De forma geral, podemos afirmar que o tratamento com MDMA inibiu o início da resposta imune inflamátoria nas primerias 24h, passando por um perído de transição em 48h e iniciando-se uma resposta inflamatória muito robusta e descontrolada, provavelmente pelo fato de a replicação da bactéria não ter sido contralada no início da infecção. Além disso, observamos que os níveis de IL-10 estavam aumentados nos animais infectados e não tratados após 72h da infecção para reestabelecimento da homeostase, o que não aconteceu com os animais do grupo tratado com MDMA e infectados. As **figuras 40, 41, 42, 43, 44 e 45** ilustram estes resultados.

.

Tabela 18 - Efeitos do tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) sobre a dosagem de citocinas e quimiocina no soro de animais não infectados e infectados com dose subletal de LM

		Grupos			
Tempo	**Parametros**	Salina	MDMA	LM	MDMA+LM
24 h	**IL12p70**	0,0±0,0	0,0±0,0	10,1±3,9*	5,4±3,7*
	TNF	6,4±0,6	6,8±0,9	29,9±9,5*	20,5±7,9*
	IFN-γ	0,9±0,5	1,1±0,6	212,2±67,1*	122,0±46,7*#
	MCP-1	17,3±1,4	16,0±2,2	781,5±298,9*	226,7±122,7#
	IL-6	1,1±1,0	1,5±0,8	267,9±66,2*	61,2±21,2#
	IL-10	1,1±2,5	0,0±0,0	3,2±3,3	0,6±1,4
48 h	**IL12p70**	0,4±0,8	0,0±0,0	1,5±2,3*	3,5±2,0*
	TNF	7,9±1,7	6,4±1,5	38,6±6,4*	44,2±7,1*
	IFN-γ	1,0±0,6	1,8±0,5	619,4±189,2*	556,6±141,2*
	MCP-1	24,9±13,3	15,5±2,2	442,9±102,8*	384,6±116,6*
	IL-6	2,1±1,7	2,0±1,6	93,7±31,1*	118,4±62,4*
	IL-10	0,7±1,9	0,0±0,0	0,3±0,7	0,9±1,9
72 h	**IL12p70**	0,0±0,0	0,0±0,0	8,1±3,7*	8,9±3,6*
	TNF	5,0±1,1	7,8±1,5	102,3±93,7	210,9±79,8*
	IFN-γ	1,2±0,1	1,4±0,2	1125,0±730,6*	1971,0±512,1*#
	MCP-1	16,6±3,4	15,5±2,3	341,9±152,7*	883,0±153,2*#
	IL-6	1,6±1,0	1,4±0,8	96,4±56,8	303,4±194,4*#
	IL-10	0,7±1,6	0,0±0,0	4,5±2,7*	0,7±1,6#

Os dados representam a media±desvio padrão. *****p<0,05 em relação ao grupo salina e MDMA não infectados, #p<0,05 em relação ao grupo LM, dentro do mesmo período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

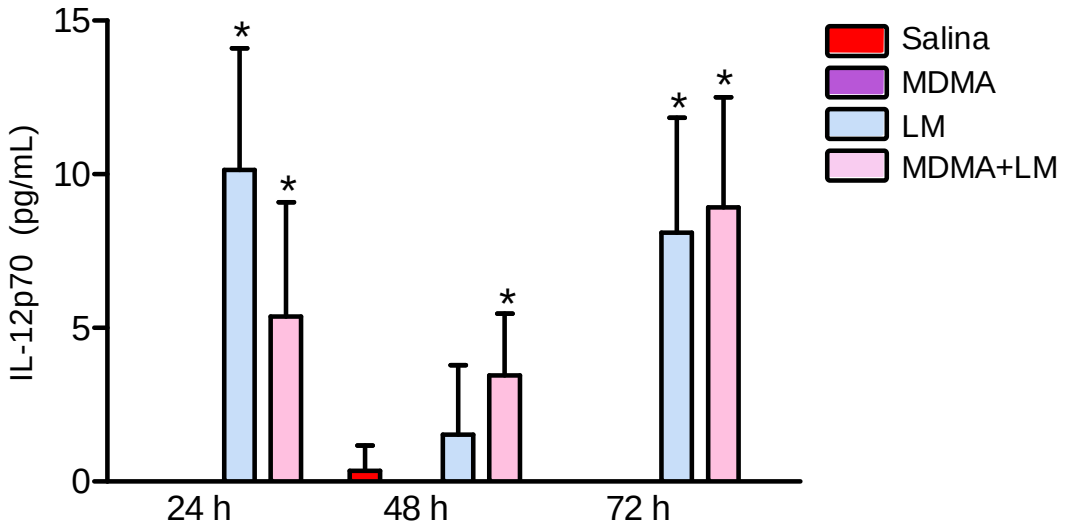

Figura 40 - Efeitos do tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) sobre a expressão de IL12p70 no soro de animais infectados e não infectados com LM. *p<0,05 em relação ao grupo salina e MDMA não infectados, dentro do mesmo período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

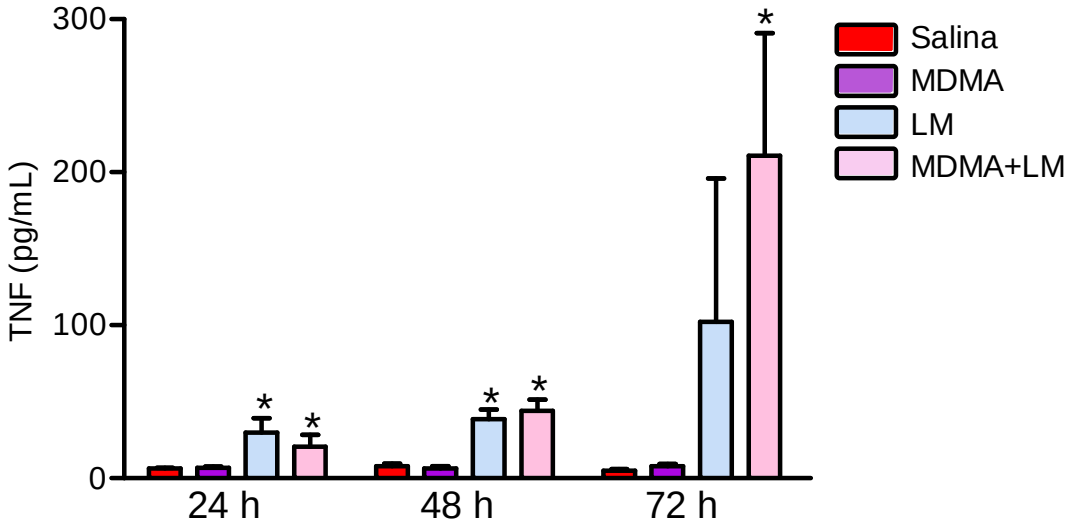

Figura 41 - Efeitos do tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) sobre a expressão de TNF no soro de animais infectados e não infectados com LM. *p<0,05 em relação ao grupo salina e MDMA não infectados, dentro do mesmo período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

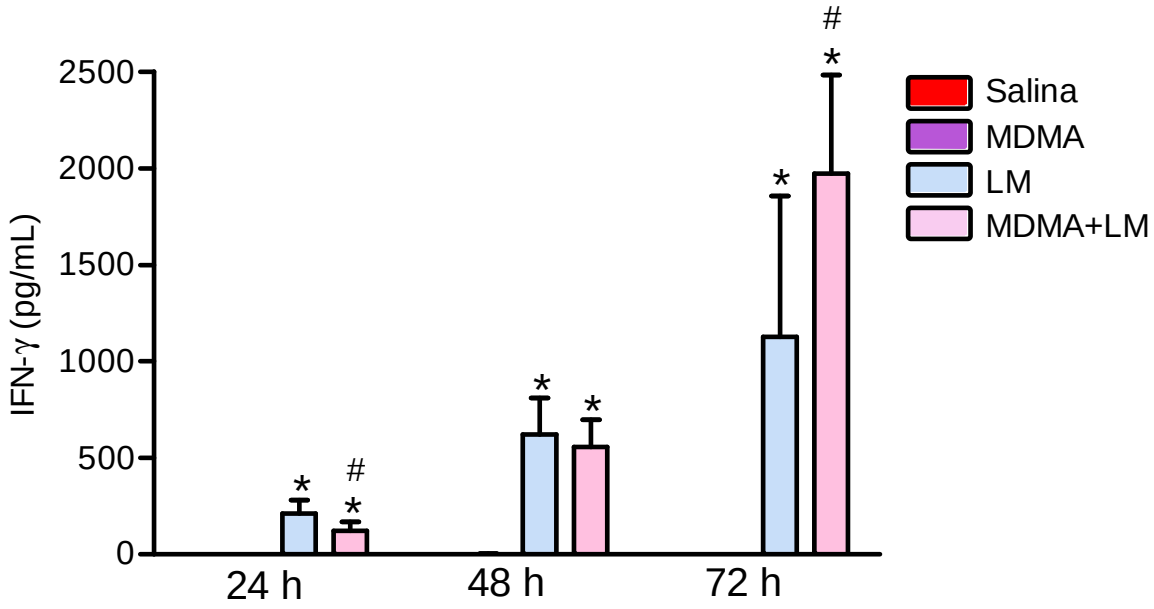

Figura 42 - Efeitos do tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) sobre a expressão de IFNγ no soro de animais infectados e não infectados com LM. *p<0,05 em relação ao grupo salina e MDMA não infectados, #p<0,05 em relação ao grupo LM, dentro do mesmo período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

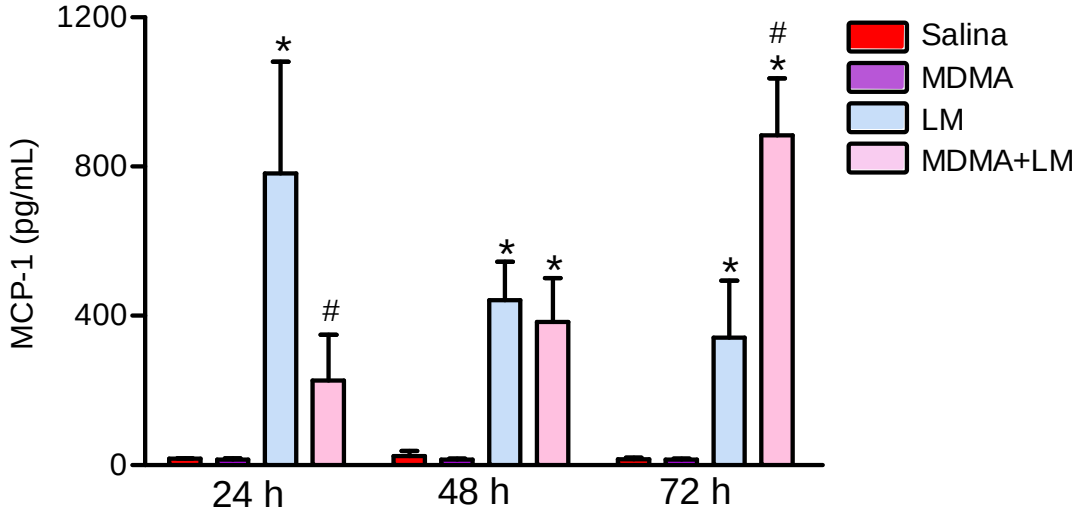

Figura 43 - Efeitos do tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) sobre a expressão de MCP-1 no soro de animais infectados e não infectados com LM. *p<0,05 em relação ao grupo salina e MDMA não infectados, #p<0,05 em relação ao grupo LM, dentro do mesmo período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

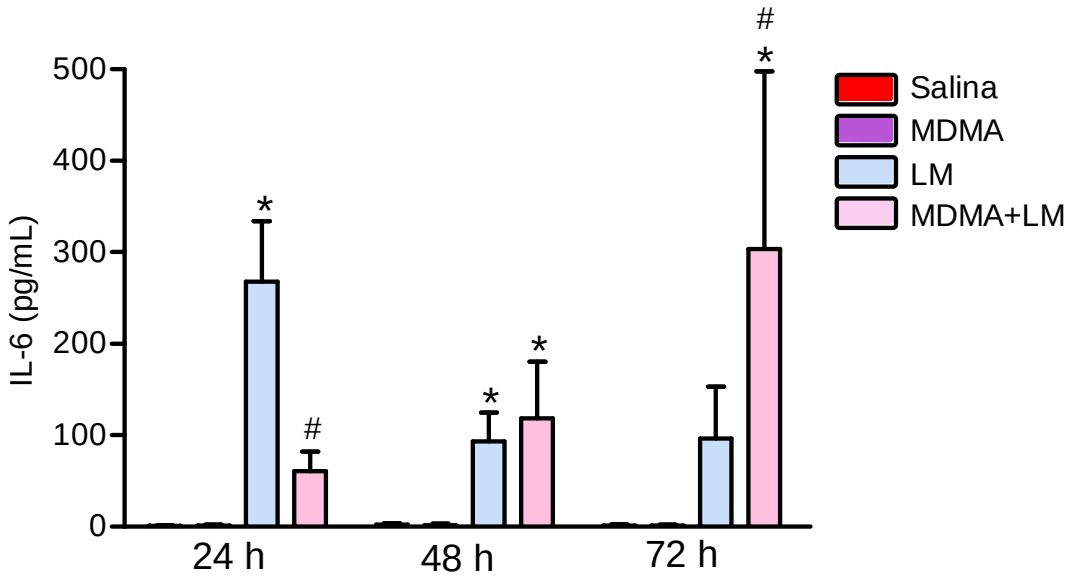

Figura 44 - Efeitos do tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) sobre a expressão de IL-6 no soro de animais infectados e não infectados com LM. *p<0,05 em relação ao grupo salina e MDMA não infectados, #p<0,05 em relação ao grupo LM, dentro do mesmo período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

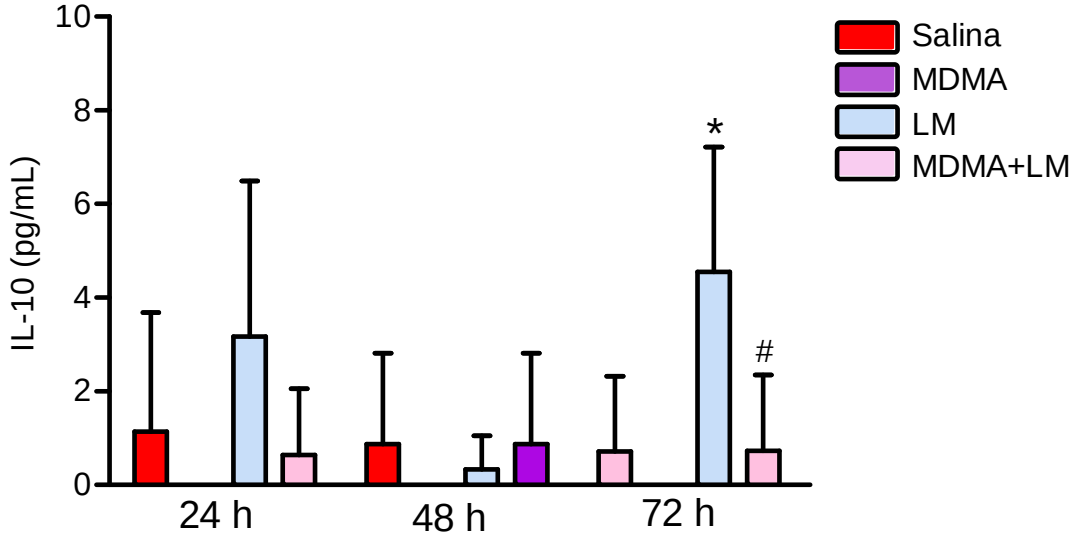

Figura 45 - Efeitos do tratamento com MDMA (10,0 mg/kg) sobre a expressão de IL-10 no soro de animais infectados e não infectados com LM. *p<0,05 em relação ao grupo salina e MDMA não infectados, #p<0,05 em relação ao grupo LM, dentro do mesmo período de tempo. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. n=6 animais/grupo.

7 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que 60 minutos após a administração de MDMA na dose 10mg/kg, houve uma diminuição do *burst* oxidativo de neutrófilos induzido por SAPI e PMA, assim como, da porcentagem e da intensidade da fagocitose dos neutrófilos sanguíneos; também observamos uma diminuição da celularidade total da medula óssea e aumento da mesma no baço e diminuição do peso relativo do baço. Observamos ainda, que o tratamento com MDMA foi capaz de aumentar a porcentagem de neutrófilos e de diminuir a porcentagem de linfócitos sanguíneos, assim como, por nós observado anteriormente (De Paula *et al.*, 2009); este fato nos levou a sugerir que nossos achados fossem decorrência de aumento induzido pelo MDMA nos níveis séricos de corticosterona. De fato, observamos agora que o tratamento prévio com metirapona ou com RU-486 em animais tratados com MDMA foi capaz de inibir os efeitos observados após administração desta droga em todos os parâmetros avaliados da atividade de neutrófilos; mais precisamente, observamos que os efeitos induzidos pelo MDMA sobre a atividade de neutrófilos foram mediados pela diminuição da ativação de NFκB, efeito este inibido pela metirapona. Além disso, observamos que as alterações nas porcentagens de neutrófilos e linfócitos sanguíneos induzidas pelo MDMA também foram prevenidas pela admistração prévia de metirapona.

No entanto, os tratamentos com metirapona ou RU-486 não foram capazes de impedir as alterações de celularidade da medula óssea e do baço ou a diminuição no peso relativo do baço induzidos por MDMA. Desta forma, pareceu-nos que estes efeitos poderiam ser advindos de uma ativação do SNS. De fato, mostramos que o MDMA induziu um aumento nos níveis plasmáticos de adrenalina e noradrenalina.

Neste sentido, observamos que o tratamento prévio com 6-OHDA, ao contrário, não preveniu os efeitos do MDMA sobre a diminuição da atividade de neutrófilos; porém o tratamento com propranolol foi capaz de inibir os efeitos do MDMA sobre os parâmetros de atividade de neutrófilos. Para esclarecer este fato, mostramos que o propranolol impediu a ação do MDMA sobre a atividade dos neutrófilos não em decorrência de uma ação como antagonista não seletivo de receptores β adrenérgicos, mas sim pela sua capacidade de inibir a atividade do eixo HPA e, consequente, pela redução da concentração sérica de corticosterona. Para confirmar este resultado, realizamos um novo ensaio no qual utilizamos o pré-tratamento com ICI-118,551, um antagonista adrenérgico seletivo para receptores β2 e observamos que ele não foi capaz de inibir os efeitos induzidos por MDMA quer na atividade de neutrófilos quer na contagem diferencial de leucócitos sanguíneos; no entanto, o tratamento com ICI 118,551 preveniu as alterações de celularidade da medula óssea e do baço e também a diminuição do peso relativo do baço induzidos por MDMA.

Desta forma, parece-nos possível afirmar que os efeitos induzidos pelo MDMA sobre a atividade de neutrófilos e sobre a contagem diferencial de neutrófilos e linfócitos se devam à uma ação da corticosterona enquanto que as catecolaminas periféricas estariam envolvidas na alteração de distribuição de leucócitos entre o baço e a medula óssea e na diminuição do peso relativo do baço.

No contexto da presente discussão é importante ressaltar que o MDMA induz alterações neuroquímicas, comportamentais e endócrinas, semelhantes àquelas produzidas por exposição a um estresse agudo, sugerindo este fato, ser ele um estressor químico (Pacifici *et al.*, 2000; Pacifici *et al.*, 2002; Connor, 2004; De Paula *et al.*, 2009; Ferraz-De-Paula *et al.*, 2011). O eixo HPA é um dos mais importantes

sistemas de integração do organismo, sendo ativado em resposta a estímulos estressores ambientais ou químicos ou na vigência de distúrbios homeostáticos (Mcewen, 1998; 2000c; b; a; Alves *et al.*, 2006; Palermo-Neto *et al.*, 2008; De Paula *et al.*, 2009; Pinheiro *et al.*, 2011). Fármacos com ação no SNC como, por exemplo, a anfetamina (Ligeiro-Oliveira *et al.*, 2004; Ligeiro De Oliveira *et al.*, 2008) e o MDMA (Connor *et al.*, 2000), carreiam potencial para modificar a imunidade por alterar principalmente as atividades do eixo HPA (De Paula *et al.*, 2009) e/ou a atividade do SNS. De fato, observamos que o MDMA ativou o eixo HPA e o SNS com consequente liberação de corticosterona, noradrenalina e adrenalina na circulação, respectivamente.

Neste sentido, evidências têm demonstrado a participação dos GCs 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 a ocorrência de uma ativação do eixo HPA; mostraram, também, que estes aumentos ocorriam de forma dose-dependente, e que os efeitos que observaram podiam ser prevenidos pela imunoneutralização do CRH. Ligeiro-Oliveira et al. (2004) constataram, em nossos laboratórios, que ratos tratados com anfetamina apresentaram níveis aumentados de corticosterona sérica, confirmando informações prévias de que o tratamento com anfetamina induzia não apenas alterações comportamentais indicativas de estresse, mas também que ativava o eixo HPA.

Em 2004, Connor et al.[2], mostraram que ratos tratados com 10mg/kg de MDMA apresentaram diminuição do *burst* oxidativo de neutrófilos em resposta ao

[2] 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.

zymosan opsonizado. Mais especificamente, verificaram em ratos que a administração de 20 mg/kg de MDMA 30 minutos antes dos testes suprimia a proliferação de linfócitos induzida por Con-A, e reduzia a contagem total de leucócitos sanguíneos (Connor *et al.*, 1998; Connor *et al.*, 2000); mostraram, ainda, que essas alterações eram acompanhadas por um aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona que persistiram durante 6 horas (Connor *et al.*, 1998). Estes dados corroboram, assim, com os que observamos, visto que a diminuição do *burst* oxidativo e da fagocitose por neutrófilos ocorreram 60 minutos após a administração do MDMA, momento em que os níveis de corticosterona estavam elevados (De Paula *et al.*, 2009; Ferraz-De-Paula *et al.*, 2011). O pré-tratamento agora realizado com metirapona e RU-486 ao inibir estes efeitos, reforçam a participação do eixo HPA nos efeitos induzidos pelo MDMA sobre a atividade de neutrófilos.

Neste sentido, lembramos que diversos trabalhos de literatura têm confirmado o efeito imunossupressor dos GCs sobre a atividade de neutrófilos tanto em humanos como em animais de laboratório (De Paula *et al.*, 2009; Pinheiro *et al.*, 2011). Bekesi et. al., (2004), demonstraram que neutrófilos de voluntários sadios apresentavam uma significante redução na produção de íons superóxido quando incubados com corticosterona e 18-hidroxi-deoxicorticosterona (Bekesi *et al.*, 2004). 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 albicans* e *Nitroblue tetrazolium*. Nohmi et al., (1994) também demonstraram que concentrações fisiológicas de corticosterona suprimiam *in vivo* a atividade de neutrófilos murinos induzida por *Candida albicans*. 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 era 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 GCs sobre os neutrófilos sanguíneos (Harris,Flower e Perretti, 1995).

Acredita-se que a mais importante propriedade dos GCs seja seu efeito imunossupressor, pela sua propriedade em diminuir a expressão de moléculas inflamatórias e aumentar a expressão de moléculas anti-inflamatórias, atuando sobre fatores de transcrição envolvidos com a resposta inflamatória, como o NFκB . O NFκB é um fator de transcrição encontrado em sua forma inativa, ligado a uma proteína inibitória, o IκB, no citoplasma de muitas células do sistema imune, incluindo-se aqui os neutrófilos (Abraham, 2005). No início de uma sinalização intracelular induzida pela ativação de receptores associados a padrões moleculares de patógenos – como, por exemplo, os TLRs 2 ou 4, que reconhecem produtos microbianos ou outros receptores de mediadores inflamatórios, como, por exemplo os de citocinas – o NFκB desliga-se da sua proteína inibitória IκB e migra para o núcleo da célula aumentando a transcrição de genes responsáveis pela expressão de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e outros mediadores inflamatórios associados com estímulos infecciosos (Tak e Firestein, 2001). O antagonismo exercido pelos GRs ativados sobre o NFκB é considerado explicativo para as ações imunossupressivas e antiinflamatórias dos GCs. De fato, foi possível observar neste estudo que uma única dose de MDMA foi capaz de induzir uma diminuição da

expressão de NFκB ativado (NFκB p68), provocando uma diminuição na atividade dos neutrófilos estimulados *in vitro* e que esta diminuição foi prevenida pelo pré-tratamento com metirapona, confirmando a participação do eixo HPA, mais especificamente dos GCs, nos efeitos do MDMA quando da diminuição por ele induzida na ativação do NFκB em neutrófilos.

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).

O tráfego de células imunes é tido como sendo crucial para o desempenho da resposta imune, bem como para as funções efetoras do sistema imune. Dados de literatura têm mostrado que animais estressados apresentam níveis elevados de corticosterona no plasma, acompanhados por significante diminuição no número e porcentagem de linfócitos (Ligeiro-Oliveira *et al.*, 2004; De Paula *et al.*, 2009) e por um aumento no número e porcentagem de neutrófilos circulantes (Ottaway e Husband, 1994; Engler *et al.*, 2004; De Paula *et al.*, 2009) e estes efeitos são diminuidos em animais adrenalectomizados. Sugere-se, assim, que fatores endócrinos liberados durante o estresse modulem o tráfego de leucócitos, o que resulta numa redistribuição desses entre o sangue e outros compartimentos imunes (Ottaway e Husband, 1994; Stefanski, 2000; Engler *et al.*, 2004).

Song, Earley; Leonard, (1995) mostraram ser a injeção intracerebroventricular de 0,5 e 1,0 µg de CRH, capaz de induzir aumento significativo na atividade do

sistema neuronal monoaminérgico, mais espscificamente, de noradrenalina, dopamina e 5-HT no hipotálamo. Nesse trabalho, os autores mostraram que a infusão de CRH produziu um aumento dose-dependente dos níveis séricos de corticosterona causando claramente redução da proliferação e da porcentagem de linfócitos e aumento na porcentagem de neutrófilos sanguíneos. Esses dados concordam com os nossos no referente à dimiunuição de linfócitos e aumento de neutrófilos circulantes causadas pelo MDMA que foram prevenidos pelo pré-tratamento com metirapona (Song,Earley e Leonard, 1995).

Nesse contexto, parece-nos interessante destacar que 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 HPA com conseqüente liberação de corticosterona. De fato, o pré-tratamento com metirapona preveniu apenas, 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 aparente divergência entre esses dados, além de se tratar de fármacos diferentes, pode ser explicada, pelo menos em parte, pelo fato de os animais não terem sido desafiados imunologicamente em nosso trabalho, ou seja, nossos resultados advem 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. No entanto, observamos agora neste trabalho, que a distribuição de leucócitos entre

o baço e a medula óssea foi prevenida somente pelo tratamento prévio com ICI e a que metirapona reverteu apenas a contagem diferencial de células do sangue circulante como destacado anteriormente.

Neste sentido, dados recentes no campo de estudo da neuroimunomodulação, têm sugerido a existência de várias vias, que a não a ativação do eixo HPA, pelas quais o estresse afeta 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 foi descrito que estímulos estressores como inalação de éter (Vellucci, 1977), frio (Ritter e Pelzer, 1978) e imobilização (Nakagawa *et al.*, 1981) são capazes de ativar o SNS e os sistemas de neurotransmissão catecolaminérgica no SNC (Iimori *et al.*, 1982). Neste sentido, sabe-se que o estresse ativa o *locus coerulleus* e que a ativação deste núcleo é acompanhada por um aumento de atividade do SNS. 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; Nance e Sanders, 2007).

Neste sentido, sabe-se que algumas fibras do SNS inervam órgãos linfóides (Madden e Felten, 1995), entre eles o baço. Estudos realizados em modelos animais mostraram que a administração local ou sistêmica de agonistas de receptores adrenérgicos $\alpha 1$ induziram 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, mimetizaram estes efeitos em animais e em seres humanos (Sato *et al.*, 1995; Shannon,Manders e Shen, 1995; Kaufman *et al.*, 1998). Esses dados concordam com os nossos, uma vez que observamos diminuição do peso relativo do baço induzida provavelmente, por uma contração da cápsula do baço. No entanto, de forma surpreendente, o pré-tratamento com ICI foi capaz de inibir a diminuição do peso relativo do baço induzido por MDMA. Acreditamos que uma hipótese explicativa para este resultado seja que o ICI 118,551 tenha atravessado a barreira hematoencefálica atuando em receptores β adrenérgicos no SNC, e desta forma, inibido a ativação do SNS (O'donnell,Frith e Wilkins, 1994), levando a uma inibição das ações das catecolaminas periféricas no baço.

Além disso, já se descreveu uma supressão da proliferação de linfócitos sanguíneos independente da atividade do eixo HPA, tendo sido ela atribuída a ações desencadeadas pelos sistemas catecolaminérgicos centrais e periféricos (Keller *et al.*, 1988). Desta forma, parece-nos possível inferir que as alterações imunes observadas em nosso trabalho tenham sido decorrentes também, ou pelo menos em parte, da ativação do SNS. No entanto, existem alguns pontos importantes a serem considerados a respeito dos efeitos das catecolaminas sobre o sistema imune. Em um primeiro momento, ressalta-se serem os efeitos das catecolaminas diferentes se avaliados local ou sistemicamente (Elenkov *et al.*, 2000). Uma possível explicação para este fato está relacionada às concentrações plasmáticas de catecolaminas atingidas em certas condições. A concentração basal de catecolaminas circulantes é de aproximadamente de 2-6 $x10^{-10}$M em ratos e humanos. O estresse de restrição de movimento em ratos pode aumentar essas concentrações em até 600%, alcançando a concentração de 2-6$x10^{-8}$M de catecolaminas circulantes; entretanto, a

concentração de catecolaminas na região terminal nervosa do baço pode alcançar níveis muito mais altos acima de $5x10^{-4}$M (Shimizu,Hori e Nakane, 1994). Em um segundo momento, lembramos que as catecolaminas podem afetar a resposta imune *in vivo* não somente por atuar diretamente em células imunes, mas, também, por alterar o fluxo sanguíneo e a distribuição de células. Um terceiro ponto a comentar diz respeito às células imunes, que têm uma distribuição particular em órgãos linfóides secundários; assim, por exemplo, as áreas de células T no baço são mais ricas em terminações nervosas simpáticas do que as áreas de células B. Finalmente, e em quarto lugar, não se pode esquecer que outras substâncias como o neuropeptídio Y, adenosina, serotonina, dopamina, ATP e etc são liberadas simultaneamente quando os nervos noradrenérgicos são estimulados *in vivo* e que estas substâncias atuam sobre as células imunes de forma sinérgica ou antagônica aos efeitos adrenérgicos do SNS (Del Rey e Besedovsky, 2008).

Diante desses fatos, não é surpreendente termos observado que os pré-tratamentos com 6-OHDA e com ICI tenham sido incapazes de inibir a diminuição da atividade de neutrófilos induzidas por MDMA. Desta forma, é possível que os efeitos induzidos pelo MDMA sobre a atividade dos neutrófilos e sobre a distribuição diferencial de leucócitos no sangue não sejam decorrentes da ativação direta do SNS. No entanto, o antagonismo induzido pelo ICI reverteu os efeitos induzidos pelo MDMA na distribuição de células no baço e na medula óssea. Esses achados nos levam a acreditar que o MDMA seja um estressor químico, que diminui a atividade de neutrófilos via ativação do eixo HPA e que altera a distribuição de leucócitos por uma via dependente do SNS, que estaria relacionada com os efeitos simpatomiméticos induzidos pela droga.

Neste contexto, acreditamos que não poderíamos atribuir a diminuição que observamos da atividade de neutrófilos induzida por MDMA a uma imunossupressão, visto que os efeitos observados foram obtidos em animais não desafiados imunologicamente. Desta forma, decidimos avaliar se a diminuição da atividade de neutrófilos induzida por MDMA e a alteração na distribuição de células entre o baço e a medula óssea afetou a capacidade de resposta do sistema imune a um desafio real por inoculação de uma dose subletal de LM.

Estudos têm demonstrado que durante a fase inicial da infecção com LM ocorre uma redução no número de precursores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos na medula óssea, com consequente hematopoese extramedular e elevação nos níveis séricos de fator estimulante de colônia (CSF) (Wing,Waheed e Shadduck, 1984; Wood *et al.*, 1984; Wing *et al.*, 1985; Teixeira *et al.*, 2006; Queiroz Jde *et al.*, 2008). De fato, observamos que o tratamento com MDMA foi capaz de induzir uma diminuição do número de precursores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos na medula óssea após 24h, 48h e 72h do tratamento em camundongos não infectados e infectados com LM, caracterizando uma drástica mielossupressão nestes animais, independente da infecção. Observamos um aumento destes precurssores no baço, caracterizando um aumento de hematopoese extramedular, quiça como tentativa de compensar os efeitos observados na medula óssea de animais tratados com MDMA e não infectados, 24h e 48h após o tratamento e nos animais infectados e tratados com MDMA apenas 72h após o tratamento. Este efeito tardio do MDMA sobre a hematopoese extramedular de animais infectados com LM pode estar relacionado com a progressão da infecção e com o aumento de 10% na resistência dos animais à infecção após as 72h (Mackaness, 1962). Além disso, o MDMA foi capaz de diminuir o número de células totais no sangue e na medula

óssea de animais infectados, potencilizando, desta forma, a atividade imunossupressora da LM.

Diversos fatores estão envolvidos na defesa contra a LM sendo que a resistência primária a esta bactéria é representada pela imunidade inata do hospedeiro. Embora a eliminação da infecção dependa de uma resposta imune específica mediada por células T, a resposta inata mediada por macrófagos e neutrófilos durante as fases iniciais da infecção é fundamental para a sobrevivência do hospedeiro (Braun e Cossart, 2000; Pamer, 2004; Zenewicz e Shen, 2007). Os neutrófilos são de grande importância, uma vez que são as primeiras células a atuar contra os microrganismos e produzir citocinas que orquestrarão uma resposta específica contra o patógeno. O recrutamento de monócitos é uma característica essencial da resposta inflamatória à infecção por LM (Dlugonska, 1986; North,Dunn e Conlan, 1997) e a depleção de granulócitos em modelos animais aumentou a susceptibilidade à infecção (Czuprynski *et al.*, 1994). Em diversas espécies animais, incluindo-se humanos e roedores, os neutrófilos desempenham um papel importante na contenção da infecção neutralizando vários patógenos de forma muito eficiente, como revisado anteriormente. O clearance de patógenos intracelulares, como a LM em camundongos, é potencializado pela produção de IFNγ pelas células NK, as quais ativam os macrófagos a iniciar sua atividade efetora.

Os macrófagos e granulócitos são células derivadas dos precursores hematopoéticos da medula óssea que se diferenciam na presença de CSF (Metcalf, 1986; Kayashima *et al.*, 1993). Desta forma, a presença de CSF bem como a produção, maturação e mobilização eficiente das células hematopoéticas derivadas da medula óssea, particularmente granulócitos e macrófagos, são fundamentais para o sucesso da resolução da infecção. Sabe-se que estas células progenitoras

podem migrar da medula óssea para outros tecidos hematopoéticos como o baço, sítio de replicação bacteriana, como parte da defesa do hospedeiro contra bactérias intracelulares (Wing *et al.*, 1985; Teixeira *et al.*, 2006). O CSF modula a resposta hematopoética provocando a pronta mobilização dos fagócitos circulantes e teciduais, e aumentando a diferenciação de progenitores hematopoéticos (Zhan *et al.*, 1998; Guleria e Pollard, 2001; Jin *et al.*, 2002; Qiu,Zhu e Pollard, 2009). Em animais resistentes à LM, como os camundongos da linhagem C57/BL-6, observa-se um aumento de CSF no soro nas primeiras horas de infecção, o que confere uma resposta hematopoética mais eficiente que aquela observada em animais susceptíveis como o BALB/c, cujo pico de CSF ocorre nas 48h que se sequem a infecção (Cheers e Stanley, 1988). Desta forma, nossos resultados sugerem que a diminuição que observamos no número de progenitores hematopoéticos da medula óssea possa estar relacionada a uma diminuição de CSF, uma vez que o tratamento com MDMA impediu o aumento de CSA nas primeiras 24h da infecção; neste sentido, apesar de termos observado um aumento de CSA nas 48h seguidas à infecção, os níveis de CSA em 72h nos animais infectados tratados com MDMA estavam menores do que os medidos em animais somente infectados. Assim, quer nos parecer que a mielossupressão observada nos animais tratados com MDMA e infectados com LM possa ter sido mediada por este fator, dentre outros que iremos discutir a seguir.

Estudos têm demonstrado que a noradrenalina e a dopamina, quando adicionadas *in vitro*, promovem diminuição no número de CFU-GM da medula óssea (Maestroni e Conti, 1994a; b; Miyan,Broome e Afan, 1998). Além disso, sabe-se que o sistema nervoso controla a produção de células sanguíneas e a migração, tanto das células maduras como das imaturas, da medula óssea para o sangue periférico,

corroborando com a noção da existência de um controle neural na hematopoese (Afan *et al.*, 1997; Broome e Miyan, 2000; Broome,Whetton e Miyan, 2000). Desta forma, podemos sugerir que a diminuição de CFU-GM e da migração de células da medula óssea nos animais tratados com MDMA possa ter sido decorrência do aumento dos níveis de catecolaminas circulantes nas primeiras horas da infecção, fato que teria coincidido com o momento em que está sendo montada a resposta imune contra o invasor. Além disso, quer nos parecer que a diminuição da atividade de neutrófilos induzidas pelo tratamento com MDMA durante as primeiras horas da infecção, tenha promovido uma descontrolada multiplicação do patógeno culminando este fato com a piora da infecção, o que não ocorreu nos animais infectados não tratados com MDMA, que apresentaram uma resposta de reestabelecimento da homeostase após as 72h da infecção.

Para determinar de forma ainda mais completa os possíveis mecanismos pelos quais o tratamento com MDMA diminuiu a resposta à infecção com LM, pareceu-nos relevante avaliar os níveis séricos de citocinas nestes animais. De fato, o controle e a resolução de infecções por LM envolvem diversos tipos celulares que se comunicam através de citocinas (IL-12, TNF, IFNγ, IL-6 e IL-1β) e quimiocinas (MCP-1, MIP-1, MIP-2 e IL-8), que regulam a resposta imune por estimular e mobilizar células efetoras contra o patógeno no local de infecção (Cousens e Wing, 2000).

Sabe-se que a IL-12, o TNF e o INFγ iniciam uma cascata de eventos que resultam na resistência mediada por macrófagos e células NK (Tripp,Wolf e Unanue, 1993). A principal fonte de IL-12 na infecção por LM ainda é desconhecida; mas os neutrófilos e as células dendríticas secretam IL-12, em uma quantidade que parece ser primordial para a resistência anti-listeria em camundongos normais e SCID

(camundongos com imunodeficiência combinada grave) (Tripp *et al.*, 1994). A IL-12 e o TNF atuam de forma sinérgica induzindo a produção de IFNγ pelas células NK (Tripp,Wolf e Unanue, 1993). Mostrou-se que a neutralização da IL-12 ou do TNF diminuiu a ativação de macrófagos e aumentou o desenvolvimento da LM no fígado (Wagner *et al.*, 1994), no entanto, a falta de IL-12 pode ser compensada pela administração de IFNγ (Tripp *et al.*, 1994). Emoto e colaboradores (2003) mostraram que os neutrófilos são as princiapis células efetoras de defesa do hospedeiro contra a LM, pois secretam IL-12 que ativa as células NK a produzir IFNγ direcionando a resposta imune para o tipo Th1, que tem um papel crucial na eliminação do patógeno. Esses dados parecem concordar com os resultados por nós observados. Nos animais tratados com MDMA e infectados com LM observamos uma diminuição na produção de IL-12 e TNF, fatos que coincidiram com uma diminuição na produção de IFNγ nas primeiras 24h da infecção, que é essencial para o controle da infecção com LM; esta ação pode corresponder a uma das vias pelas quais os animais apresentaram uma mielossupressão pronunciada após 48h e 72h da infecção. No entanto, os níveis de IL-12, TNF e IFNγ, apresentaram-se aumentados após 72h da infecção nos animais tratados com MDMA; acreditamos que seja possível sugerir que este fato não tenha sido decorrência de uma melhora no quadro infeccioso, mas sim decorrente de uma resposta inflamatória descontrolada, uma vez que em 72h os animais não tratados e infectados apresentaram uma recuperação na contagem de CFU-GM e nos níveis de citocinas em relação aos animais tratados e infectados. Corroborando com esta hipótese observamos que o tratamento com MDMA em animais infectados culminou com a morte de todos eles nas 96h após a infecção com a dose letal da LM (dados não mostrados).

Além das respostas reguladas por IL-12, TNF e IFNγ discutidas anteriormente, sabe-se que a IL-6 e a IL-1 são requeridas para a resistência orgânica a LM *in vivo* (Rogers *et al.*, 1994; Dalrymple *et al.*, 1995) Embora os mecanismos ainda sejam poucos conhecidos, sabe-se que a IL-6 e a IL-1 regulam principalmente as respostas induzidas por neutrófilos contra a LM durante a infecção. De fato, mostrou-se que animais deficientes de IL-6 apresentaram maior susceptibilidade à infecção por LM e, ainda, que o aumento do desenvolvimento de LM no fígado destes animais estava correlacionado com um aumento de neutrófilos sanguíneos que apresentavam atividade reduzida (Dalrymple *et al.*, 1995). Nossos dados corroboram com estes da literatura uma vez que observamos uma diminuição dos níveis de IL-6 nos animais tratados com MDMA e infectados com LM nas primeiras 24h da infecção momento em que a diminuição na atividade dos neutrófilos causada pelo aumento de corticosterona induzida por MDMA teria um efeito somatório com a falta de ativação por IL-6. Em conjunto, estas ações teriam resultado em diminuição da resistência dos animais à infecção por LM.

Assim como discutido acima, a IL-6 aumentou muito às 72h após a infecção fato que acreditamos, tenha ocorrido devido a uma resposta inflamatória descontrolada e não a uma melhor resposta à infecção. Esta hipótese pode ser agora confirmada, uma vez observado que os níveis de IL-10, uma citocina anti-inflamatória conhecida pelo seu papel regulatório das respostas inflamatórias (Jankovic,Kugler e Sher), estavam diminuídos em todos os períodos de evolução da infecção que avaliamos. De fato, a IL-10 é produzida em resposta a uma estimulação das células do sistema immune inato, neutrófilos, macrófagos e células NK, inibindo a resposta inflamatória induzida pela infecção e reestabelecendo a homeostase.

As quimiocinas são citocinas de baixo peso molecular com função quimioatraente e pró-inflamatória. Sabe-se que o tráfego e a infiltração de neutrófilos, macrófagos e células NK no fígado são fatores críticos quando da resistência orgânica contra a LM, apesar dos mecanismos envolvidos não estarem muito claros (Cousens e Wing, 2000). A inoculação intracerebral de LM estimulou a expressão de MIP-1 e MIP-2 por neutrófilos e monócitos infiltrados no cérebro em resposta a infecção (Seebach *et al.*, 1995). Mostrou-se que o MCP-1 é importante para o recrutamento de monócitos para os locais de infecção por LM, sendo produzido por macrófagos em resposta à invasão citosólica pela LM (Serbina *et al.*, 2003). Em nossos experimentos, observamos diminuição dos níveis de MCP-1 nas 24h e 48h após a infecção por LM, o que provavelmente se traduziu por diminuição da migração de monócitos para o local da infecção. Tomados em conjunto com aqueles relativos às dosagens de citocinas, estes dados sugerem que o MDMA tenha diminuido a resposta imune inata por inibir a resposta de citocinas pró-inflamatórias e o recrutamento de células no estágio inicial da infecção; desta forma, estes fatores teriam permitido uma maior multiplicação e disseminação da LM, levando a um descontrole da resposta inflamatória a partir das 72h da infecção.

Acreditamos que seja possível afirmar que a ativação do fator de transcrição NFκB, diminuída nos neutrófilos por uma via dependente de GCs, esteja diminuída também em outros tipos celulares e, que por isso, as respostas inflamatórias iniciais à LM teriam sido prejudicadas de forma a comprometer toda a resposta imune subsequente. De fato, já foi demonstrado que camundongos deficientes da subunidade p50 do NFκB apresentam maior susceptibilidade à infecção por LM quando comparados a animais normais (Sha *et al.*, 1995) e também que o NFκB é ativado pela invasão citosólica por LM (Hauf *et al.*, 1997).

Diante destes achados, parece-nos possível sugerir que o MDMA seja um estressor químico, que diminui a atividade de neutrófilos por inibir a ativação de NFκB, através de uma via dependente de corticosterona e que altera a distribuição de leucócitos entre diferentes compartimentos imunes, através de uma via dependente de catecolaminas. Essas alterações, induzidas por uma única dose de MDMA, mesmo que tenham duração de poucas horas, podem representar um risco àa respostas orgânicas montadas contra patógenos invasores, reduzindo drasticamente a formação de uma resposta imune eficaz. De fato, observamos que os animais tratados com MDMA e infectados com LM apresentaram mielossupressão acompanhada por uma diminuição dos níveis séricos de CSA, citocinas e quimiocinas nas primeiras horas da infecção e uma resposta imune/inflamatória exacerbada após 72h da infecção, fatos que culminaram com a morte de todos os animais tratados com a droga. Desta forma, concluímos que o MDMA possa ser considerado uma droga imunossupressora que exerce seus efeitos por mecanismos neuroimunes. Ainda que não se pretendam extrapolações simplistas, os presentes achados sugerem que deva existir uma avaliação cuidadosa dos efeitos do *Ecstasy* sobre o sistema imunológico de usuários desta droga.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A. K., K. M. Murphy e A. Sher. Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature, v.383, n.6603, Oct 31, p.787-793. 1996.

Abe, Y., S. Sekiya, T. Yamasita, *et al.* Vascular hyperpermeability induced by tumor necrosis factor and its augmentation by IL-1 and IFN-gamma is inhibited by selective depletion of neutrophils with a monoclonal antibody. J Immunol, v.145, n.9, Nov 1, p.2902-2907. 1990.

Abi Abdallah, D. S., C. E. Egan, B. A. Butcher, *et al.* Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. Int Immunol, v.23, n.5, May, p.317-326. 2011.

Abraham, E. Alterations in cell signaling in sepsis. Clin Infect Dis, v.41 Suppl 7, Nov 15, p.S459-464. 2005.

Adams, D. O. e T. A. Hamilton. The cell biology of macrophage activation. Annu Rev Immunol, v.2, p.283-318. 1984.

Ader, R., L. J. Grota e N. Cohen. Conditioning on immune responses: San Diego: Academic Press. 1991 (Psychoneuroimmunology)

Afan, A. M., C. S. Broome, S. E. Nicholls, *et al.* Bone marrow innervation regulates cellular retention in the murine haemopoietic system. Br J Haematol, v.98, n.3, Sep, p.569-577. 1997.

Allen, R. C. Biochemiexcitation: chemiluminescence and study of biological oxigenation reactions. In: W. Adam e G. Cilento (Ed.). Chemical and biological generation of excited states: New York: Academic Press, 1982. Biochemiexcitation: chemiluminescence and study of biological oxigenation reactions., p.309

Alves, G. J., L. Vismari, J. C. Florio, *et al.* Cohabitation with a sick cage mate: Effects on noradrenaline turnover and neutrophil activity. Neurosci Res, v.56, n.2, Oct, p.172-179. 2006.

Alves, G. J., L. Vismari e J. Palermo-Neto. Cohabitation with a sick cage mate: effects on ascitic form of Ehrlich tumor growth and macrophage activity. Neuroimmunomodulation, v.14, n.6, p.297-303. 2007.

Anderson, D. C. e T. A. Springer. Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. Annu Rev Med, v.38, p.175-194. 1987.

Arzt, E., D. Kovalovsky, L. M. Igaz, *et al.* Functional cross-talk among cytokines, T-cell receptor, and glucocorticoid receptor transcriptional activity and action. Ann N Y Acad Sci, v.917, p.672-677. 2000.

Ashwell, J. D., F. W. Lu e M. S. Vacchio. Glucocorticoids in T cell development and function*. Annu Rev Immunol, v.18, p.309-345. 2000.

Bainton, D. F. e M. G. Farquhar. Differences in enzyme content of azurophil and specific granules of polymorphonuclear leukocytes. I. Histochemical staining of bone marrow smears. J Cell Biol, v.39, n.2, Nov, p.286-298. 1968a.

_____. Differences in enzyme content of azurophil and specific granules of polymorphonuclear leukocytes. II. Cytochemistry and electron microscopy of bone marrow cells. J Cell Biol, v.39, n.2, Nov, p.299-317. 1968b.

Bakardjiev, A. I., J. A. Theriot e D. A. Portnoy. Listeria monocytogenes traffics from maternal organs to the placenta and back. PLoS Pathog, v.2, n.6, Jun, p.e66. 2006.

Bancroft, G. J., R. D. Schreiber e E. R. Unanue. Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. Immunol Rev, v.124, Dec, p.5-24. 1991.

Bekesi, G., K. Racz, A. Hrabak*, et al.* Systematic investigation of different steroid precursors with respect to their effect on superoxide anion production by human neutrophil granulocytes. Horm Metab Res, v.36, n.3, Mar, p.155-163. 2004.

Benschop, R. J., M. Rodriguez-Feuerhahn e M. Schedlowski. Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions. Brain Behav Immun, v.10, n.2, Jun, p.77-91. 1996.

Berkenbosch, F., J. Van Oers, A. Del Rey*, et al.* Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. Science, v.238, n.4826, Oct 23, p.524-526. 1987.

Besedovsky, H. e E. Sorkin. Network of immune-neuroendocrine interactions. Clin Exp Immunol, v.27, n.1, Jan, p.1-12. 1977.

Bielecki, J., P. Youngman, P. Connelly*, et al.* Bacillus subtilis expressing a haemolysin gene from Listeria monocytogenes can grow in mammalian cells. Nature, v.345, n.6271, May 10, p.175-176. 1990.

Biola, A., K. Andreau, M. David*, et al.* The glucocorticoid receptor and STAT6 physically and functionally interact in T-lymphocytes. FEBS Lett, v.487, n.2, Dec 29, p.229-233. 2000.

Biswas, P. S., V. Pedicord, A. Ploss*, et al.* Pathogen-specific CD8 T cell responses are directly inhibited by IL-10. J Immunol, v.179, n.7, Oct 1, p.4520-4528. 2007.

Blalock, J. E. Proopiomelanocortin-derived peptides in the immune system. Clin Endocrinol (Oxf), v.22, n.6, Jun, p.823-827. 1985.

Blalock, J. E., K. L. Bost e E. M. Smith. Neuroendocrine peptide hormones and their receptors in the immune system. Production, processing and action. J Neuroimmunol, v.10, n.1, Nov, p.31-40. 1985.

Borovikova, L. V., S. Ivanova, D. Nardi*, et al.* Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. Auton Neurosci, v.85, n.1-3, Dec 20, p.141-147. 2000.

Borovikova, L. V., S. Ivanova, M. Zhang*, et al.* Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. Nature, v.405, n.6785, May 25, p.458-462. 2000.

Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes. Immunity, v.33, n.5, Nov 24, p.657-670. 2010.

Braun, L. e P. Cossart. Interactions between Listeria monocytogenes and host mammalian cells. Microbes Infect, v.2, n.7, Jun, p.803-811. 2000.

Broome, C. S. e J. A. Miyan. Neuropeptide control of bone marrow neutrophil production. A key axis for neuroimmunomodulation. Ann N Y Acad Sci, v.917, p.424-434. 2000.

Broome, C. S., A. D. Whetton e J. A. Miyan. Neuropeptide control of bone marrow neutrophil production is mediated by both direct and indirect effects on CFU-GM. Br J Haematol, v.108, n.1, Jan, p.140-150. 2000.

Bruehl, R. E., K. L. Moore, D. E. Lorant*, et al.* Leukocyte activation induces surface redistribution of P-selectin glycoprotein ligand-1. J Leukoc Biol, v.61, n.4, Apr, p.489-499. 1997.

Buchmeier, N. A. e R. D. Schreiber. Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of Listeria monocytogenes infection. Proc Natl Acad Sci U S A, v.82, n.21, Nov, p.7404-7408. 1985.

Bugajski, J., A. Gadek-Michalska, A. Olowska*, et al.* Adrenergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under basal and social stress conditions. J Physiol Pharmacol, v.46, n.3, Sep, p.297-312. 1995.

Bugajski, J., M. Turon, A. Gadek-Michalska*, et al.* Catecholaminergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity. J Physiol Pharmacol, v.42, n.1, Mar, p.93-103. 1991.

Bunting, M., E. S. Harris, T. M. Mcintyre*, et al.* Leukocyte adhesion deficiency syndromes: adhesion and tethering defects involving beta 2 integrins and selectin ligands. Curr Opin Hematol, v.9, n.1, Jan, p.30-35. 2002.

Buscher, K., S. B. Riese, M. Shakibaei*, et al.* The transmembrane domains of L-selectin and CD44 regulate receptor cell surface positioning and leukocyte adhesion under flow. J Biol Chem, v.285, n.18, Apr 30, p.13490-13497. 2010.

Bylund, D. B., D. C. Eikenberg, J. P. Hieble*, et al.* International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. Pharmacol Rev, v.46, n.2, Jun, p.121-136. 1994.

Cao, L., N. M. Filipov e D. A. Lawrence. Sympathetic nervous system plays a major role in acute cold/restraint stress inhibition of host resistance to Listeria monocytogenes. J Neuroimmunol, v.125, n.1-2, Apr, p.94-102. 2002.

Cao, L., C. A. Hudson e D. A. Lawrence. Acute cold/restraint stress inhibits host resistance to Listeria monocytogenes via beta1-adrenergic receptors. Brain Behav Immun, v.17, n.2, Apr, p.121-133. 2003a.

_____. Immune changes during acute cold/restraint stress-induced inhibition of host resistance to Listeria. Toxicol Sci, v.74, n.2, Aug, p.325-334. 2003b.

Carrero, J. A., B. Calderon e E. R. Unanue. Lymphocytes are detrimental during the early innate immune response against Listeria monocytogenes. J Exp Med, v.203, n.4, Apr 17, p.933-940. 2006.

Carryn, S., S. Van De Velde, F. Van Bambeke*, et al.* Impairment of growth of Listeria monocytogenes in THP-1 macrophages by granulocyte macrophage colony-stimulating factor: release of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide. J Infect Dis, v.189, n.11, Jun 1, p.2101-2109. 2004.

Cassatella, M. A. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. Adv Immunol, v.73, p.369-509. 1999.

Cheers, C. e E. R. Stanley. Macrophage production during murine listeriosis: colony-stimulating factor 1 (CSF-1) and CSF-1-binding cells in genetically resistant and susceptible mice. Infect Immun, v.56, n.11, Nov, p.2972-2978. 1988.

Conlan, J. W. e R. J. North. Neutrophils are essential for early anti-Listeria defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. J Exp Med, v.179, n.1, Jan 1, p.259-268. 1994.

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

Connor, T. J., J. P. Kelly, M. Mcgee*, et al.* Methylenedioxymethamphetamine (MDMA; Ecstasy) suppresses IL-1beta and TNF-alpha secretion following an in vivo lipopolysaccharide challenge. Life Sci, v.67, n.13, Aug 18, p.1601-1612. 2000.

Connor, T. J., M. G. Mcnamara, D. Finn*, et al.* Acute 3,4-methylenedioxymethamphetamine(MDMA) administration produces a rapid and sustained suppression of immune function in the rat. Immunopharmacology, v.38, n.3, Jan, p.253-260. 1998.

Cossart, P. Listeriology (1926-2007): the rise of a model pathogen. Microbes Infect, v.9, n.10, Aug, p.1143-1146. 2007.

Cossart, P. e H. Bierne. The use of host cell machinery in the pathogenesis of Listeria monocytogenes. Curr Opin Immunol, v.13, n.1, Feb, p.96-103. 2001.

Cossart, P. e A. Toledo-Arana. Listeria monocytogenes, a unique model in infection biology: an overview. Microbes Infect, v.10, n.9, Jul, p.1041-1050. 2008.

Cousens, L. P. e E. J. Wing. Innate defenses in the liver during Listeria infection. Immunol Rev, v.174, Apr, p.150-159. 2000.

Culshaw, S., O. R. Millington, J. M. Brewer*, et al.* Murine neutrophils present Class II restricted antigen. Immunol Lett, v.118, n.1, Jun 15, p.49-54. 2008.

Cunnick, J. E., D. T. Lysle, B. J. Kucinski*, et al.* Evidence that shock-induced immune suppression is mediated by adrenal hormones and peripheral beta-adrenergic receptors. Pharmacol Biochem Behav, v.36, n.3, Jul, p.645-651. 1990.

Czuprynski, C. J., J. F. Brown, N. Maroushek*, et al.* Administration of anti-granulocyte mAb RB6-8C5 impairs the resistance of mice to Listeria monocytogenes infection. J Immunol, v.152, n.4, Feb 15, p.1836-1846. 1994.

Dalrymple, S. A., L. A. Lucian, R. Slattery*, et al.* Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to Listeria monocytogenes infection: correlation with inefficient neutrophilia. Infect Immun, v.63, n.6, Jun, p.2262-2268. 1995.

De Blasi, A., G. Parruti e M. Sallese. Regulation of G protein-coupled receptor kinase subtypes in activated T lymphocytes. Selective increase of beta-adrenergic receptor kinase 1 and 2. J Clin Invest, v.95, n.1, Jan, p.203-210. 1995.

De Bosscher, K., W. Vanden Berghe e G. Haegeman. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors. J Neuroimmunol, v.109, n.1, Sep 1, p.16-22. 2000.

_____. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. Endocr Rev, v.24, n.4, Aug, p.488-522. 2003.

De Paula, V. F., A. Ribeiro, M. L. Pinheiro*, et al.* Methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy) decreases neutrophil activity and alters leukocyte distribution in bone marrow, spleen and blood. Neuroimmunomodulation, v.16, n.3, p.191-200. 2009.

Del Rey, A. e H. O. Besedovsky. Sympathetic nervous system-immune interactions in autoimmune lymphoproliferative diseases. Neuroimmunomodulation, v.15, n.1, p.29-36. 2008.

Del Rey, A., A. Randolf, J. Wildmann*, et al.* Re-exposure to endotoxin induces differential cytokine gene expression in the rat hypothalamus and spleen. Brain Behav Immun, v.23, n.6, Aug, p.776-783. 2009.

Dhabhar, F. S. e B. S. Mcewen. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.3, Feb 2, p.1059-1064. 1999.

Dhabhar, F. S., A. H. Miller, B. S. Mcewen*, et al.* Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. J Immunol, v.157, n.4, Aug 15, p.1638-1644. 1996.

Dinarello, C. A. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. Blood, v.77, n.8, Apr 15, p.1627-1652. 1991.

Dinarello, C. A. e J. W. Mier. Lymphokines. N Engl J Med, v.317, n.15, Oct 8, p.940-945. 1987.

Dlugonska, H. Stimulation of the mouse monocytes by Listeria monocytogenes. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), v.34, n.1, p.65-72. 1986.

Dobbs, C. M., M. Vasquez, R. Glaser*, et al.* Mechanisms of stress-induced modulation of viral pathogenesis and immunity. J Neuroimmunol, v.48, n.2, Nov-Dec, p.151-160. 1993.

Domann, E., J. Wehland, M. Rohde*, et al.* A novel bacterial virulence gene in Listeria monocytogenes required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. EMBO J, v.11, n.5, May, p.1981-1990. 1992.

Drevets, D. A. Listeria monocytogenes infection of cultured endothelial cells stimulates neutrophil adhesion and adhesion molecule expression. J Immunol, v.158, n.11, Jun 1, p.5305-5313. 1997.

Drouin, J., Y. L. Sun, M. Chamberland*, et al.* Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. Embo J, v.12, n.1, Jan, p.145-156. 1993.

Edelson, B. T. e E. R. Unanue. Immunity to Listeria infection. Curr Opin Immunol, v.12, n.4, Aug, p.425-431. 2000.

Egan, P. J. e S. R. Carding. Downmodulation of the inflammatory response to bacterial infection by gammadelta T cells cytotoxic for activated macrophages. J Exp Med, v.191, n.12, Jun 19, p.2145-2158. 2000.

Elenkov, I. J., R. L. Wilder, G. P. Chrousos*, et al.* The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. Pharmacol Rev, v.52, n.4, Dec, p.595-638. 2000.

Emoto, M., M. Miyamoto, Y. Emoto*, et al.* Highly biased type 1 immune responses in mice deficient in LFA-1 in Listeria monocytogenes infection are caused by elevated IL-12 production by granulocytes. J Immunol, v.171, n.8, Oct 15, p.3970-3976. 2003.

Engler, H., M. T. Bailey, A. Engler*, et al.* Effects of repeated social stress on leukocyte distribution in bone marrow, peripheral blood and spleen. J Neuroimmunol, v.148, n.1-2, Mar, p.106-115. 2004.

Farmer, P. e J. Pugin. beta-adrenergic agonists exert their "anti-inflammatory" effects in monocytic cells through the IkappaB/NF-kappaB pathway. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.279, n.4, Oct, p.L675-682. 2000.

Farsky, S. H., P. Borelli, R. A. Fock*, et al.* Chronic blockade of nitric oxide biosynthesis in rats: effect on leukocyte endothelial interaction and on leukocyte recruitment. Inflamm Res, v.53, n.9, Sep, p.442-452. 2004.

Farsky, S. P. e S. B. Mello. [Participation of the adhesion molecules in the development of inflammatory response]. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo, v.50, n.1, Jan-Feb, p.80-89. 1995.

Farsky, S. P., P. Sannomiya e J. Garcia-Leme. Secreted glucocorticoids regulate leukocyte-endothelial interactions in inflammation. A direct vital microscopic study. J Leukoc Biol, v.57, n.3, Mar, p.379-386. 1995.

Felten, D. L., S. Y. Felten, D. L. Bellinger*, et al.* Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. Immunol Rev, v.100, Dec, p.225-260. 1987.

Felten, S. Y., D. L. Felten, D. L. Bellinger*, et al.* Noradrenergic sympathetic innervation of lymphoid organs. Prog Allergy, v.43, p.14-36. 1988.

Ferraz-De-Paula, V., D. Stankevicius, A. Ribeiro*, et al.* Differential behavioral outcomes of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA-ecstasy) in anxiety-like responses in mice. Braz J Med Biol Res, v.44, n.5, May, p.428-437. 2011.

Flesch, I. E. e S. H. Kaufmann. Role of macrophages and alpha beta T lymphocytes in early interleukin 10 production during Listeria monocytogenes infection. Int Immunol, v.6, n.3, Mar, p.463-468. 1994.

Fonseca, E. S., C. O. Massoco e J. Palermo-Neto. Effects of prenatal stress on stress-induced changes in behavior and macrophage activity of mice. Physiol Behav, v.77, n.2-3, Nov, p.205-215. 2002.

Gaillard, J. L., P. Berche, C. Frehel*, et al.* Entry of L. monocytogenes into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. Cell, v.65, n.7, Jun 28, p.1127-1141. 1991.

Gellin, B. G. e C. V. Broome. Listeriosis. JAMA, v.261, n.9, Mar 3, p.1313-1320. 1989.

Glimcher, L. H. e K. M. Murphy. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. Genes Dev, v.14, n.14, Jul 15, p.1693-1711. 2000.

Goossens, P. L. e G. Milon. Induction of protective CD8+ T lymphocytes by an attenuated Listeria monocytogenes actA mutant. Int Immunol, v.4, n.12, Dec, p.1413-1418. 1992.

Gregory, S. H., L. K. Barczynski e E. J. Wing. Effector function of hepatocytes and Kupffer cells in the resolution of systemic bacterial infections. J Leukoc Biol, v.51, n.4, Apr, p.421-424. 1992.

Gregory, S. H., A. J. Sagnimeni e E. J. Wing. Bacteria in the bloodstream are trapped in the liver and killed by immigrating neutrophils. J Immunol, v.157, n.6, Sep 15, p.2514-2520. 1996.

Guleria, I. e J. W. Pollard. Aberrant macrophage and neutrophil population dynamics and impaired Th1 response to Listeria monocytogenes in colony-stimulating factor 1-deficient mice. Infect Immun, v.69, n.3, Mar, p.1795-1807. 2001.

Haak-Frendscho, M., J. F. Brown, Y. Iizawa*, et al.* Administration of anti-IL-4 monoclonal antibody 11B11 increases the resistance of mice to Listeria monocytogenes infection. J Immunol, v.148, n.12, Jun 15, p.3978-3985. 1992.

Hadri, K. E., A. Courtalon, X. Gauthereau*, et al.* Differential regulation by tumor necrosis factor-alpha of beta1-, beta2-, and beta3-adrenoreceptor gene expression in 3T3-F442A adipocytes. J Biol Chem, v.272, n.39, Sep 26, p.24514-24521. 1997.

Hamon, M., H. Bierne e P. Cossart. Listeria monocytogenes: a multifaceted model. Nat Rev Microbiol, v.4, n.6, Jun, p.423-434. 2006.

Harris, J. G., R. J. Flower e M. Perretti. Endogenous corticosteroids mediate the neutrophilia caused by platelet-activating factor in the mouse. Eur J Pharmacol, v.283, n.1-3, Sep 5, p.9-18. 1995.

Harty, J. T. e M. J. Bevan. CD8+ T cells specific for a single nonamer epitope of Listeria monocytogenes are protective in vivo. J Exp Med, v.175, n.6, Jun 1, p.1531-1538. 1992.

_____. Specific immunity to Listeria monocytogenes in the absence of IFN gamma. Immunity, v.3, n.1, Jul, p.109-117. 1995.

Harty, J. T., R. D. Schreiber e M. J. Bevan. CD8 T cells can protect against an intracellular bacterium in an interferon gamma-independent fashion. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.23, Dec 1, p.11612-11616. 1992.

Hasui, M., Y. Hirabayashi e Y. Kobayashi. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. J Immunol Methods, v.117, n.1, Feb 8, p.53-58. 1989.

Hauf, N., W. Goebel, F. Fiedler*, et al.* Listeria monocytogenes infection of P388D1 macrophages results in a biphasic NF-kappaB (RelA/p50) activation induced by lipoteichoic acid and bacterial phospholipases and mediated by IkappaBalpha and IkappaBbeta degradation. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.17, Aug 19, p.9394-9399. 1997.

Havell, E. A. Evidence that tumor necrosis factor has an important role in antibacterial resistance. J Immunol, v.143, n.9, Nov 1, p.2894-2899. 1989.

Hebeda, C. B., S. M. Bolonheis, A. Nakasato*, et al.* Effects of chlorogenic acid on neutrophil locomotion functions in response to inflammatory stimulus. J Ethnopharmacol, v.135, n.2, May 17, p.261-269. 2011.

Hebeda, C. B., F. J. Pinedo, M. A. Vinolo*, et al.* Hydroquinone Stimulates Inflammatory Functions in Microvascular Endothelial Cells via NF-kappaB Nuclear Activation. Basic Clin Pharmacol Toxicol, Jun 6. 2011.

Heijnen, C. J., C. Rouppe Van Der Voort, N. Wulffraat*, et al.* Functional alpha 1-adrenergic receptors on leukocytes of patients with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. J Neuroimmunol, v.71, n.1-2, Dec, p.223-226. 1996.

Iimori, K., M. Tanaka, Y. Kohno*, et al.* Psychological stress enhances noradrenaline turnover in specific brain regions in rats. Pharmacol Biochem Behav, v.16, n.4, Apr, p.637-640. 1982.

Iizawa, Y., J. F. Brown e C. J. Czuprynski. Early expression of cytokine mRNA in mice infected with Listeria monocytogenes. Infect Immun, v.60, n.10, Oct, p.4068-4073. 1992.

Iking-Konert, C., B. Ostendorf, O. Sander*, et al.* Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils to dendritic-like cells at the site of inflammation in rheumatoid arthritis: evidence for activation by T cells. Ann Rheum Dis, v.64, n.10, Oct, p.1436-1442. 2005.

Jankovic, D., D. G. Kugler e A. Sher. IL-10 production by CD4+ effector T cells: a mechanism for self-regulation. Mucosal Immunol, v.3, n.3, May, p.239-246.

Jin, Y., L. Dons, K. Kristensson*, et al.* Colony-stimulating factor 1-dependent cells protect against systemic infection with Listeria monocytogenes but facilitate neuroinvasion. Infect Immun, v.70, n.8, Aug, p.4682-4686. 2002.

Jonat, C., H. J. Rahmsdorf, K. K. Park*, et al.* Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. Cell, v.62, n.6, Sep 21, p.1189-1204. 1990.

Kaufman, M. J., A. J. Siegel, J. H. Mendelson*, et al.* Cocaine administration induces human splenic constriction and altered hematologic parameters. J Appl Physiol, v.85, n.5, Nov, p.1877-1883. 1998.

Kaufmann, S. H. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. Nat Immunol, v.9, n.7, Jul, p.705-712. 2008.

Kayashima, S., S. Tsuru, N. Hata*, et al.* Therapeutic effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on the protection against Listeria infection in SCID mice. Immunology, v.80, n.3, Nov, p.471-476. 1993.

Keller, S. E., S. J. Schleifer, A. S. Liotta*, et al.* Stress-induced alterations of immunity in hypophysectomized rats. Proc Natl Acad Sci U S A, v.85, n.23, Dec, p.9297-9301. 1988.

Kelley, S. P., L. J. Grota, S. Y. Felten*, et al.* Norepinephrine in mouse spleen shows minor strain differences and no diurnal variation. Pharmacol Biochem Behav, v.53, n.1, Jan, p.141-146. 1996.

Kocks, C., E. Gouin, M. Tabouret*, et al.* L. monocytogenes-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. Cell, v.68, n.3, Feb 7, p.521-531. 1992.

Koff, W. C. e M. A. Dunegan. Neuroendocrine hormones suppress macrophage-mediated lysis of herpes simplex virus-infected cells. J Immunol, v.136, n.2, Jan, p.705-709. 1986.

Kohm, A. P. e V. M. Sanders. Suppression of antigen-specific Th2 cell-dependent IgM and IgG1 production following norepinephrine depletion in vivo. J Immunol, v.162, n.9, May 1, p.5299-5308. 1999.

_____. Norepinephrine: a messenger from the brain to the immune system. Immunol Today, v.21, n.11, Nov, p.539-542. 2000.

Kovalovsky, D., D. Refojo, F. Holsboer*, et al.* Molecular mechanisms and Th1/Th2 pathways in corticosteroid regulation of cytokine production. J Neuroimmunol, v.109, n.1, Sep 1, p.23-29. 2000.

Kumar, V. e A. Sharma. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. Int Immunopharmacol, v.10, n.11, Nov, p.1325-1334. 2010.

Lapidot, T. e O. Kollet. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. Leukemia, v.16, n.10, Oct, p.1992-2003. 2002.

Lara-Tejero, M. e E. G. Pamer. T cell responses to Listeria monocytogenes. Curr Opin Microbiol, v.7, n.1, Feb, p.45-50. 2004.

Lecuit, M., S. Vandormael-Pournin, J. Lefort*, et al.* A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. Science, v.292, n.5522, Jun 1, p.1722-1725. 2001.

Lehrer, R. I., T. Ganz, M. E. Selsted*, et al.* Neutrophils and host defense. Ann Intern Med, v.109, n.2, Jul 15, p.127-142. 1988.

Liberman, A. C., J. Druker, M. J. Perone*, et al.* Glucocorticoids in the regulation of transcription factors that control cytokine synthesis. Cytokine Growth Factor Rev, v.18, n.1-2, Feb-Apr, p.45-56. 2007.

Liberman, A. C., J. Druker, D. Refojo*, et al.* Glucocorticoids inhibit GATA-3 phosphorylation and activity in T cells. Faseb J, Jan 5. 2009.

Liberman, A. C., D. Refojo e E. Arzt. Cytokine signaling/transcription factor cross-talk in T cell activation and Th1-Th2 differentiation. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), v.51, n.6, p.351-365. 2003.

Liberman, A. C., D. Refojo, J. Druker*, et al.* The activated glucocorticoid receptor inhibits the transcription factor T-bet by direct protein-protein interaction. Faseb J, v.21, n.4, Apr, p.1177-1188. 2007.

Lieschke, G. J., D. Grail, G. Hodgson*, et al.* Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. Blood, v.84, n.6, Sep 15, p.1737-1746. 1994.

Ligeiro-Oliveira, A. P., A. M. Fialho De Araujo, R. Lazzarini*, et al.* Effects of amphetamine on immune-mediated lung inflammatory response in rats. Neuroimmunomodulation, v.11, n.3, p.181-190. 2004.

Ligeiro De Oliveira, A. P., R. Lazzarini, G. Cavriani*, et al.* Effects of single or repeated amphetamine treatment and withdrawal on lung allergic inflammation in rats. Int Immunopharmacol, v.8, n.9, Sep, p.1164-1171. 2008.

Lloyd, A. R. e J. J. Oppenheim. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. Immunol Today, v.13, n.5, May, p.169-172. 1992.

Luo, H. R. e F. Loison. Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. Am J Hematol, v.83, n.4, Apr, p.288-295. 2008.

Macedo, S. M., S. C. Vaz, E. L. Lourenco*, et al.* In vivo hydroquinone exposure impairs allergic lung inflammation in rats. Toxicology, v.241, n.1-2, Nov 20, p.47-57. 2007.

Mackaness, G. B. Cellular resistance to infection. J Exp Med, v.116, Sep 1, p.381-406. 1962.

Madden, K. S. e D. L. Felten. Experimental basis for neural-immune interactions. Physiol Rev, v.75, n.1, Jan, p.77-106. 1995.

Madden, K. S., S. Y. Felten, D. L. Felten*, et al.* Sympathetic nervous system modulation of the immune system. II. Induction of lymphocyte proliferation and migration in vivo by chemical sympathectomy. J Neuroimmunol, v.49, n.1-2, Jan, p.67-75. 1994.

_____. Sympathetic neural modulation of the immune system. I. Depression of T cell immunity in vivo and vitro following chemical sympathectomy. Brain Behav Immun, v.3, n.1, Mar, p.72-89. 1989.

Madden, K. S., J. A. Moynihan, G. J. Brenner*, et al.* Sympathetic nervous system modulation of the immune system. III. Alterations in T and B cell proliferation and differentiation in vitro following chemical sympathectomy. J Neuroimmunol, v.49, n.1-2, Jan, p.77-87. 1994.

Madden, K. S., V. M. Sanders e D. L. Felten. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.35, p.417-448. 1995.

Maestroni, G. J. e A. Conti. Modulation of hematopoiesis via alpha 1-adrenergic receptors on bone marrow cells. Exp Hematol, v.22, n.3, Mar, p.313-320. 1994a.

_____. Noradrenergic modulation of lymphohematopoiesis. Int J Immunopharmacol, v.16, n.2, Feb, p.117-122. 1994b.

Massoco, C. e J. Palermo-Neto. Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study. Vet Immunol Immunopathol, v.95, n.1-2, Sep 15, p.11-19. 2003.

Massoco, C. O. e J. Palermo-Neto. Diazepam effects of peritoneal macrophage activity and corticosterone serum levels in Balb/C mice. Life Sci, v.65, n.20, p.2157-2165. 1999.

Mcewen, B. S. Protective and damaging effects of stress mediators. N Engl J Med, v.338, n.3, Jan 15, p.171-179. 1998.

_____. Effects of adverse experiences for brain structure and function. Biol Psychiatry, v.48, n.8, Oct 15, p.721-731. 2000a.

_____. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. Brain Res, v.886, n.1-2, Dec 15, p.172-189. 2000b.

_____. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. Prog Brain Res, v.122, p.25-34. 2000c.

Metcalf, D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. Blood, v.67, n.2, Feb, p.257-267. 1986.

Miyan, J. A., C. S. Broome e A. M. Afan. Coordinated host defense through an integration of the neural, immune and haemopoietic systems. Domest Anim Endocrinol, v.15, n.5, Sep, p.297-304. 1998.

Nakagawa, R., M. Tanaka, Y. Kohno*, et al.* Regional responses of rat brain noradrenergic neurones to acute intense stress. Pharmacol Biochem Behav, v.14, n.5, May, p.729-732. 1981.

Nance, D. M. e V. M. Sanders. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). Brain Behav Immun, v.21, n.6, Aug, p.736-745. 2007.

Newton, C. A., T. Lu, S. J. Nazian*, et al.* The THC-induced suppression of Th1 polarization in response to Legionella pneumophila infection is not mediated by increases in corticosterone and PGE2. J Leukoc Biol, v.76, n.4, Oct, p.854-861. 2004.

Nickol, A. D. e P. F. Bonventre. Anomalous high native resistance to athymic mice to bacterial pathogens. Infect Immun, v.18, n.3, Dec, p.636-645. 1977.

Nissen, R. M. e K. R. Yamamoto. The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. Genes Dev, v.14, n.18, Sep 15, p.2314-2329. 2000.

North, R. J., P. L. Dunn e J. W. Conlan. Murine listeriosis as a model of antimicrobial defense. Immunol Rev, v.158, Aug, p.27-36. 1997.

O'donnell, J. M., S. Frith e J. Wilkins. Involvement of beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in the antidepressant-like effects of centrally administered isoproterenol. J Pharmacol Exp Ther, v.271, n.1, Oct, p.246-254. 1994.

Oda, T., M. Katori, K. Hatanaka*, et al.* Inhibition of neutrophil migration by a selective inhibitor of matrix metalloproteinase: analysis by intravital microscopy. Mediators Inflamm, v.4, n.2, p.133-137. 1995.

Oehler, L., O. Majdic, W. F. Pickl*, et al.* Neutrophil granulocyte-committed cells can be driven to acquire dendritic cell characteristics. J Exp Med, v.187, n.7, Apr 6, p.1019-1028. 1998.

Ojiri, Y., K. Noguchi, T. Chibana*, et al.* Effects of adrenergic stimulants on the splenic diameter, haemoglobin content and haematocrit in anaesthetized dogs: determination of the adrenoceptor subtype responsible for changes in the splenic diameter. Acta Physiol Scand, v.149, n.1, Sep, p.31-39. 1993.

Ottaway, C. A. e A. J. Husband. The influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration. Immunol Today, v.15, n.11, Nov, p.511-517. 1994.

Pacifici, R., P. Zuccaro, M. Farre*, et al.* Immunomodulating activity of MDMA. Ann N Y Acad Sci, v.914, Sep, p.215-224. 2000.

_____. Cell-mediated immune response in MDMA users after repeated dose administration: studies in controlled versus noncontrolled settings. Ann N Y Acad Sci, v.965, Jun, p.421-433. 2002.

Palermo-Neto, J., E. S. Fonseca, W. M. Quinteiro-Filho*, et al.* Effects of individual housing on behavior and resistance to Ehrlich tumor growth in mice. Physiol Behav, v.95, n.3, Oct 20, p.435-440. 2008.

Palermo Neto, J., C. O. Massoco e R. C. Favare. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. Neurotoxicol Teratol, v.23, n.5, Sep-Oct, p.497-507. 2001.

Pamer, E. G. Immune responses to Listeria monocytogenes. Nat Rev Immunol, v.4, n.10, Oct, p.812-823. 2004.

Paul, W. E. e R. A. Seder. Lymphocyte responses and cytokines. Cell, v.76, n.2, Jan 28, p.241-251. 1994.

Pereira, B., L. F. Rosa, D. A. Safi*, et al.* Hormonal regulation of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in rat macrophages. Biochem Pharmacol, v.50, n.12, Dec 22, p.2093-2098. 1995.

Pfeffer, K., T. Matsuyama, T. M. Kundig*, et al.* Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. Cell, v.73, n.3, May 7, p.457-467. 1993.

Pinheiro, M. L., V. Ferraz-De-Paula, A. Ribeiro*, et al.* Long-term maternal separation differentially alters serum corticosterone levels and blood neutrophil activity in a/j and C57BL/6 mouse offspring. Neuroimmunomodulation, v.18, n.3, p.184-190. 2011.

Portnoy, D. A., R. D. Schreiber, P. Connelly*, et al.* Gamma interferon limits access of Listeria monocytogenes to the macrophage cytoplasm. J Exp Med, v.170, n.6, Dec 1, p.2141-2146. 1989.

Qiu, X., L. Zhu e J. W. Pollard. Colony-stimulating factor-1-dependent macrophage functions regulate the maternal decidua immune responses against Listeria monocytogenes infections during early gestation in mice. Infect Immun, v.77, n.1, Jan, p.85-97. 2009.

Queiroz Jde, S., C. O. Torello, J. Palermo-Neto*, et al.* Hematopoietic response of rats exposed to the impact of an acute psychophysiological stressor on responsiveness to an in vivo challenge with Listeria monocytogenes: modulation by Chlorella vulgaris prophylactic treatment. Brain Behav Immun, v.22, n.7, Oct, p.1056-1065. 2008.

Ramaswamy, V., V. M. Cresence, J. S. Rejitha*, et al.* Listeria--review of epidemiology and pathogenesis. J Microbiol Immunol Infect, v.40, n.1, Feb, p.4-13. 2007.

Ramer-Quinn, D. S., R. A. Baker e V. M. Sanders. Activated T helper 1 and T helper 2 cells differentially express the beta-2-adrenergic receptor: a mechanism for selective modulation of T helper 1 cell cytokine production. J Immunol, v.159, n.10, Nov 15, p.4857-4867. 1997.

Ramer-Quinn, D. S., M. A. Swanson, W. T. Lee*, et al.* Cytokine production by naive and primary effector CD4+ T cells exposed to norepinephrine. Brain Behav Immun, v.14, n.4, Dec, p.239-255. 2000.

Refojo, D., A. C. Liberman, D. Giacomini*, et al.* Integrating systemic information at the molecular level: cross-talk between steroid receptors and cytokine signaling on different target cells. Ann N Y Acad Sci, v.992, May, p.196-204. 2003.

Reichardt, H. M., J. P. Tuckermann, M. Gottlicher*, et al.* Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. Embo J, v.20, n.24, Dec 17, p.7168-7173. 2001.

Ribeiro, A. L., A. L. Shimada, C. B. Hebeda*, et al.* In vivo hydroquinone exposure alters circulating neutrophil activities and impairs LPS-induced lung inflammation in mice. Toxicology, May 31. 2011.

Rice, P. A., G. W. Boehm, J. A. Moynihan*, et al.* Chemical sympathectomy increases the innate immune response and decreases the specific immune response in the spleen to infection with Listeria monocytogenes. J Neuroimmunol, v.114, n.1-2, Mar 1, p.19-27. 2001.

_____. Chemical sympathectomy alters numbers of splenic and peritoneal leukocytes. Brain Behav Immun, v.16, n.1, Feb, p.62-73. 2002a.

_____. Chemical sympathectomy increases numbers of inflammatory cells in the peritoneum early in murine listeriosis. Brain Behav Immun, v.16, n.6, Dec, p.654-662. 2002b.

Ritter, S. e N. L. Pelzer. Magnitude of stress-induced brain norepinephrine depletion varies with age. Brain Res, v.152, n.1, Aug 18, p.170-175. 1978.

Rogers, H. W., C. S. Tripp, R. D. Schreiber*, et al.* Endogenous IL-1 is required for neutrophil recruitment and macrophage activation during murine listeriosis. J Immunol, v.153, n.5, Sep 1, p.2093-2101. 1994.

Rogers, H. W. e E. R. Unanue. Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to Listeria monocytogenes in mice. Infect Immun, v.61, n.12, Dec, p.5090-5096. 1993.

Romagnani, S. The Th1/Th2 paradigm. Immunol Today, v.18, n.6, Jun, p.263-266. 1997.

Root, R. K., J. Metcalf, N. Oshino*, et al.* H2O2 release from human granulocytes during phagocytosis. I. Documentation, quantitation, and some regulating factors. J Clin Invest, v.55, n.5, May, p.945-955. 1975.

Rothe, J., W. Lesslauer, H. Lotscher*, et al.* Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by Listeria monocytogenes. Nature, v.364, n.6440, Aug 26, p.798-802. 1993.

Sa-Rocha, V. M., L. C. Sa-Rocha e J. Palermo-Neto. Variations in behavior, innate immunity and host resistance to B16F10 melanoma growth in mice that present social stable hierarchical ranks. Physiol Behav, v.88, n.1-2, Jun 15, p.108-115. 2006.

Sakai, M., E. S. Fonseca, M. L. Dagli*, et al.* Diazepam effects on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. Life Sci, v.78, n.16, Mar 13, p.1777-1783. 2006.

Sanders, V. M., R. A. Baker, D. S. Ramer-Quinn*, et al.* Differential expression of the beta2-adrenergic receptor by Th1 and Th2 clones: implications for cytokine production and B cell help. J Immunol, v.158, n.9, May 1, p.4200-4210. 1997.

Sapolsky, R., C. Rivier, G. Yamamoto*, et al.* Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. Science, v.238, n.4826, Oct 23, p.522-524. 1987.

Sapolsky, R. M., L. M. Romero e A. U. Munck. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. Endocr Rev, v.21, n.1, Feb, p.55-89. 2000.

Sato, N., Y. T. Shen, K. Kiuchi, *et al.* Splenic contraction-induced increases in arterial O2 reduce requirement for CBF in conscious dogs. Am J Physiol, v.269, n.2 Pt 2, Aug, p.H491-503. 1995.

Schedlowski, M., R. Jacobs, G. Stratmann, *et al.* Changes of natural killer cells during acute psychological stress. J Clin Immunol, v.13, n.2, Mar, p.119-126. 1993.

Scheinman, R. I., A. Gualberto, C. M. Jewell, *et al.* Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. Mol Cell Biol, v.15, n.2, Feb, p.943-953. 1995.

Seebach, J., D. Bartholdi, K. Frei, *et al.* Experimental Listeria meningoencephalitis. Macrophage inflammatory protein-1 alpha and -2 are produced intrathecally and mediate chemotactic activity in cerebrospinal fluid of infected mice. J Immunol, v.155, n.9, Nov 1, p.4367-4375. 1995.

Selye, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, v.10, n.2, Spring, p.230-231. 1998.

Serbina, N. V., W. Kuziel, R. Flavell, *et al.* Sequential MyD88-independent and -dependent activation of innate immune responses to intracellular bacterial infection. Immunity, v.19, n.6, Dec, p.891-901. 2003.

Sha, W. C., H. C. Liou, E. I. Tuomanen, *et al.* Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. Cell, v.80, n.2, Jan 27, p.321-330. 1995.

Shannon, R. P., W. T. Manders e Y. T. Shen. Role of blood doping in the coronary vasoconstrictor response to cocaine. Circulation, v.92, n.1, Jul 1, p.96-105. 1995.

Shen, Y., M. Naujokas, M. Park, *et al.* InIB-dependent internalization of Listeria is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. Cell, v.103, n.3, Oct 27, p.501-510. 2000.

Shiloh, M. U., J. D. Macmicking, S. Nicholson, *et al.* Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. Immunity, v.10, n.1, Jan, p.29-38. 1999.

Shimizu, N., T. Hori e H. Nakane. An interleukin-1 beta-induced noradrenaline release in the spleen is mediated by brain corticotropin-releasing factor: an in vivo microdialysis study in conscious rats. Brain Behav Immun, v.8, n.1, Mar, p.14-23. 1994.

Song, C., B. Earley e B. E. Leonard. Behavioral, neurochemical, and immunological responses to CRF administration. Is CRF a mediator of stress? Ann N Y Acad Sci, v.771, Dec 29, p.55-72. 1995.

Stankevicius, D., E. C. Rodrigues-Costa, J. Camilo Florio, *et al.* Neuroendocrine, behavioral and macrophage activity changes induced by picrotoxin effects in mice. Neuropharmacology, v.54, n.2, Feb, p.300-308. 2008.

Steegmaier, M., E. Borges, J. Berger, *et al.* The E-selectin-ligand ESL-1 is located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface. J Cell Sci, v.110 (Pt 6), Mar, p.687-694. 1997.

Stefanski, V. Social stress in laboratory rats: hormonal responses and immune cell distribution. Psychoneuroendocrinology, v.25, n.4, May, p.389-406. 2000.

Stoddard, S. L., V. K. Bergdall, D. W. Townsend*, et al.* Plasma catecholamines associated with hypothalamically-elicited defense behavior. Physiol Behav, v.36, n.5, p.867-873. 1986a.

_____. Plasma catecholamines associated with hypothalamically-elicited flight behavior. Physiol Behav, v.37, n.5, p.709-715. 1986b.

Straub, R. H., M. Dorner, J. Riedel*, et al.* Tonic neurogenic inhibition of interleukin-6 secretion from murine spleen caused by opioidergic transmission. Am J Physiol, v.274, n.4 Pt 2, Apr, p.R997-1003. 1998.

Straub, R. H., M. Herrmann, G. Berkmiller*, et al.* Neuronal regulation of interleukin 6 secretion in murine spleen: adrenergic and opioidergic control. J Neurochem, v.68, n.4, Apr, p.1633-1639. 1997.

Straub, R. H., M. Herrmann, T. Frauenholz*, et al.* Neuroimmune control of interleukin-6 secretion in the murine spleen. Differential beta-adrenergic effects of electrically released endogenous norepinephrine under various endotoxin conditions. J Neuroimmunol, v.71, n.1-2, Dec, p.37-43. 1996.

Straub, R. H., H. J. Linde, D. N. Mannel*, et al.* A bacteria-induced switch of sympathetic effector mechanisms augments local inhibition of TNF-alpha and IL-6 secretion in the spleen. Faseb J, v.14, n.10, Jul, p.1380-1388. 2000.

Straub, R. H., G. Pongratz, C. Gunzler*, et al.* Immunoregulation of IL-6 secretion by endogenous and exogenous adenosine and by exogenous purinergic agonists in splenic tissue slices. J Neuroimmunol, v.125, n.1-2, Apr, p.73-81. 2002.

Straub, R. H., T. Schaller, L. E. Miller*, et al.* Neuropeptide Y cotransmission with norepinephrine in the sympathetic nerve-macrophage interplay. J Neurochem, v.75, n.6, Dec, p.2464-2471. 2000.

Svensson, T. H. Peripheral, autonomic regulation of locus coeruleus noradrenergic neurons in brain: putative implications for psychiatry and psychopharmacology. Psychopharmacology (Berl), v.92, n.1, p.1-7. 1987.

Swerdlow, N. R., G. F. Koob, M. Cador*, et al.* Pituitary-adrenal axis responses to acute amphetamine in the rat. Pharmacol Biochem Behav, v.45, n.3, Jul, p.629-637. 1993.

Tak, P. P. e G. S. Firestein. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. J Clin Invest, v.107, n.1, Jan, p.7-11. 2001.

Teixeira, S. T., M. C. Valadares, S. A. Goncalves*, et al.* Prophylactic administration of Withania somnifera extract increases host resistance in Listeria monocytogenes infected mice. Int Immunopharmacol, v.6, n.10, Oct, p.1535-1542. 2006.

Tracey, K. J. The inflammatory reflex. Nature, v.420, n.6917, Dec 19-26, p.853-859. 2002.

Tripp, C. S., M. K. Gately, J. Hakimi*, et al.* Neutralization of IL-12 decreases resistance to Listeria in SCID and C.B-17 mice. Reversal by IFN-gamma. J Immunol, v.152, n.4, Feb 15, p.1883-1887. 1994.

Tripp, C. S., S. F. Wolf e E. R. Unanue. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. Proc Natl Acad Sci U S A, v.90, n.8, Apr 15, p.3725-3729. 1993.

Unanue, E. R. Macrophages, NK cells and neutrophils in the cytokine loop of Listeria resistance. Res Immunol, v.147, n.8-9, Oct-Dec, p.499-505. 1996.

_____. Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and the T-cell response. Immunol Rev, v.158, Aug, p.11-25. 1997.

Van Den Engh, G. e S. Bol. The presence of a CSF enhancing activity in the serum of endotoxin-treated mice. Cell Tissue Kinet, v.8, n.6, Nov, p.579-587. 1975.

Vellucci, S. V. The effects of ether stress and betamethasone treatment on the concentrations of noradrenaline and dopamine in various regions of the rat brain. Br J Pharmacol, v.60, n.4, Aug, p.601-605. 1977.

Wagner, R. D., H. Steinberg, J. F. Brown*, et al.* Recombinant interleukin-12 enhances resistance of mice to Listeria monocytogenes infection. Microb Pathog, v.17, n.3, Sep, p.175-186. 1994.

Weiss, S. J., J. Young, A. F. Lobuglio*, et al.* Role of hydrogen peroxide in neutrophil-mediated destruction of cultured endothelial cells. J Clin Invest, v.68, n.3, Sep, p.714-721. 1981.

Wing, E. J., L. C. Barczynski, A. Waheed*, et al.* Effect of Listeria monocytogenes infection on serum levels of colony-stimulating factor and number of progenitor cells in immune and nonimmune mice. Infect Immun, v.49, n.2, Aug, p.325-328. 1985.

Wing, E. J., A. Waheed e R. K. Shadduck. Changes in serum colony-stimulating factor and monocytic progenitor cells during Listeria monocytogenes infection in mice. Infect Immun, v.45, n.1, Jul, p.180-184. 1984.

Witko-Sarsat, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha*, et al.* Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. Lab Invest, v.80, n.5, May, p.617-653. 2000.

Wood, P. R., A. M. Young, J. L. Mckimm-Breschkin*, et al.* Effect of splenectomy on production of interferon and colony-stimulating factor in Listeria monocytogenes-infected mice. Infect Immun, v.46, n.3, Dec, p.860-861. 1984.

Woodfin, A., M. B. Voisin e S. Nourshargh. Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. Curr Opin Hematol, v.17, n.1, Jan, p.9-17. 2010.

Wrona, D. Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. J Neuroimmunol, v.172, n.1-2, Mar, p.38-58. 2006.

Yin, J. e T. A. Ferguson. Identification of an IFN-gamma-producing neutrophil early in the response to Listeria monocytogenes. J Immunol, v.182, n.11, Jun 1, p.7069-7073. 2009.

Zenewicz, L. A. e H. Shen. Innate and adaptive immune responses to Listeria monocytogenes: a short overview. Microbes Infect, v.9, n.10, Aug, p.1208-1215. 2007.

Zhan, Y., G. J. Lieschke, D. Grail*, et al.* Essential roles for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and G-CSF in the sustained hematopoietic response of Listeria monocytogenes-infected mice. Blood, v.91, n.3, Feb 1, p.863-869. 1998.

Zwick, O. M., D. H. Fischer e J. C. Flanagan. "Ecstasy" induced immunosuppression and herpes zoster ophthalmicus. Br J Ophthalmol, v.89, n.7, Jul, p.923-924. 2005.