UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a migração
leucocitária: participação de receptores de
glicocorticóides**

Camila Bento de Lima

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky

São Paulo
2012

Camila Bento de Lima

Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a migração leucocitária: participação de receptores de glicocorticóides

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky
orientador

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, janeiro de 2012

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Lima, Camila Bento de
L732ef Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a migração leucocitária:
participação de receptores de glicocorticóides / Camila Bento de
Lima. -- São Paulo, 2012.
122p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Farsky, Sandra Helena Poliselli

1. Toxicologia : Aspecto imunológico I. T. II. Farsky, Sandra
Helena Poliselli, orientador.

615.9

CDD

À minha mãe e ao meu pai

Primeiramente devo agradecê-los pela educação que me deram e pela formação que me proporcionaram. Todos seus incentivos para que eu pudesse seguir neste caminho de estudos e mais estudos, quase sem fim.

Foi assim durante toda a minha vida e agora não poderia ter sido diferente. Quero que saibam que não há ciência, graduação, mestrado, doutorado ou afim que possa ensinar os valores e princípios que vocês me ensinaram.

Espero, um dia, poder retribuir com a mesma dedicação, carinho e amor tudo o que recebi de vocês. Vocês são mais do que fundamentais em minha vida, e se me dessem a chance de escolher, não teria dúvidas e nem pensaria duas vezes, não os troco por nada.

AMO VOCÊS!!!

Agradecimentos

Os anos se passaram, pessoas entraram e saíram de minha vida e ali eu estava, sobre livros, cadernos, papers e/ou bancadas. Foram longos anos dedicados aos estudos, alguns deles dedicados a pesquisa. Muitos pensaram que eu nunca deixaria esta vida, a eterna estudante, e para estes eu digo... enfim, o FIM.

Como todo bom ser humano, pensei muitas vezes em desistir e jogar tudo para o alto, mas nessas horas pude contar com todos os amigos, colegas e, principalmente, com minha família, que me mostraram ou pelo menos tentaram me mostrar o quanto o meu esforço valeria a pena. A tese é minha, mas ela não teria sido realizada sem a ajuda de cada um de vocês.

Devo agradecer primeiramente à Deus, que me guiou desde o início nesta longa e difícil jornada, mostrando-me o caminho nas horas incertas.

À Profa Sandra H. P. Farsky, que aceitou a orientação deste trabalho, agradeço a sua total disponibilidade desde o começo, as críticas e sugestões relevantes, a enorme dedicação. Obrigada por todo o apoio e por me amparar durante as intercorrências, que não foram poucas. Uma excelente orientadora e um exemplo de dedicação profissional. Não há como agradecer por todo o suporte que me deu durante esses anos e tenho certeza que sem a sua ajuda, fundamental, nada disso teria acontecido.

Ao Prof. João Palermo Neto, que acreditou em mim desde o início da minha carreira acadêmica, aceitando-me em seu laboratório, em seu grupo e que em muito contribuiu para o meu crescimento profissional.

Aos colaboradores Profa. Regina P. Markus e Eduardo K. Tamura, que me disponibilizaram seu laboratório e me auxiliaram nos experimentos.

À Aparecida que me aguentou por muitos dias em seu laboratório, me ensinando com toda a paciência do mundo a técnica de microscopia intravital.

Aos amigos, Andreia Latorre, Camila Moreira, Carol Dizioli, Felipe Santos, Fernando Pipole, Luciana Cunha e Luciana Lippi, que encontrei no início desta

jornada e que agora fazem parte da minha vida. Vocês foram fundamentais durante toda esta caminhada, incentivando-me, ouvindo-me, entendendo minhas angústias e desesperos. Obrigada por todas as risadas e momentos de diversão, que não foram poucos. Como bem disse o poeta, “Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos”.

A todos do Laboratório de Toxicologia Experimental, Andrezinho, André Shimo, Aninha, Carine, Cris, Isabel, Mila, Gabi, Simoninha, Zeca, por terem me recebido tão bem e compartilhado deste momento.

A todos os colegas do VPT e do Departamento de Toxicologia pela convivência.

A todos os meus amigos que mais uma vez estiveram ao meu lado me entendendo e incentivando, mesmo que sem entender muito bem o que tanto eu fazia dentro dos laboratórios.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP por me cederem espaço para que eu pudesse realizar o meu trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Toxicologia e aos funcionários do Biotério do VPT por me ajudarem nos cuidados com os animais utilizados nos experimentos e pelo apoio fornecido durante os experimentos.

Agradeço a todos que, muito embora não tenham seus nomes impressos, estão, com certeza, guardados em meu coração.

RESUMO

DE LIMA, C.B. **Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a migração leucocitária: participação de receptores de glicocorticoides.** 2012. 120f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo

Além dos receptores no sistema nervoso central (SNC), acoplados a receptores GABA_A (CBR - central benzodiazepine receptor), outros sítios periféricos de ligação para os benzodiazepínicos (BDZ) foram descritos e denominados de “periféricos” (PBR – *peripheral benzodiazepine receptor*) ou TSPO – *Translocator protein*. Sua função como modulador do sistema imune tem sido proposta, com a participação, pelo menos em parte, de glicocorticóides endógenos (GE). No entanto, os mecanismos da modulação dos TSPO sobre o processo inflamatório e a relação destes receptores com os GE ainda não estão totalmente estabelecidos.

Desta forma, este trabalho visou investigar os efeitos de dois ligantes sintéticos de TSPO, um benzodiazepínico, Ro5-4864, e uma isoquinolona carboxamida, PK 11195, e suas relações com os GE, sobre os eventos da migração leucocitária.

Para tanto, ratos Wistar machos foram tratados *in vivo* com RU 38486 (antagonista de receptor de GE) ou com veículo e, adicionalmente, os ligantes de TSPO, Ro5-4864 e/ou PK 11195, foram aplicados topicamente sobre a microcirculação do mesentério dos animais para avaliação do comportamento *rolling* e aderência de leucócitos, por microscopia intravital, em condições basais ou após estimulação pelo peptídeo formil-metionil-leucilfenilalanina (fMLP). Leucócitos periféricos foram coletados e tratados *in vitro* com os ligantes de TSPO para avaliação da expressão de moléculas de adesão, quimiotaxia e influxo de cálcio em condições basais ou após estimulação pelo fMLP. Ainda, culturas primárias de células endoteliais da microcirculação de ratos foram tratadas *in vitro* com os ligantes de TSPO para avaliação da expressão de moléculas de adesão em condições basais ou após estimulação pelo lipopolisacarídeo de *E.coli* (LPS).

Os resultados obtidos mostraram que: 1) o ligante de TSPO, Ro5-4864, alterou a ação do fMLP, uma vez que inibiu a diminuição do *rolling*, o aumento de células aderentes, a clivagem de L-selectina, o aumento de expressão de PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule), a quimiotaxia e o influxo de cálcio em neutrófilos; não afetou a expressão de PECAM-1 e ICAM-1 (intracellular cell adhesion molecule) induzida pelo LPS em células endoteliais; 2) o PK 11195 aumentou o influxo de cálcio e a quimiotaxia de neutrófilos induzido pelo fMLP; 3) a co-administração dos ligantes de TSPO, Ro5-4864 e PK 11195, reverteu os efeitos do Ro5-4864 sobre a expressão de L-selectina e PECAM-1, o influxo de cálcio e a quimiotaxia de neutrófilos. A possível inter-relação dos TSPO e GE foi verificada uma vez que o Ro5-4864 inibiu o aumento do número de leucócitos *rolling* e aderidos à parede vascular *in vivo* causado pelo tratamento com RU 38486; inibiu o aumento da expressão de L-selectina em neutrófilos e de β_2 -integrina presente em linfócitos e de PECAM-1 em neutrófilos. Ainda, foi verificado que neutrófilos possuem expressões de TSPO maiores que linfócitos e células endoteliais e que esta expressão é aumentada em neutrófilos pela ação do fMLP. Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que os ligantes de TSPO modulam diferentemente as funções de adesão e mobilidade de leucócitos e de adesão da célula endotelial e que uma relação alostérica de agonismo/antagonismo entre estes pode ser sugerida. Adicionalmente, os resultados mostram uma possível relação entre os TSPO e os receptores de citoplasmáticos de GE no controle da interação leucócito-endotélio.

Palavras-chaves: benzodiazepínicos, inflamação, moléculas de adesão, TSPO, microscopia intravital

ABSTRACT

Besides central benzodiazepine receptor (CBR) found on central nervous system (CNS) coupled to GABA_A, another binding site for benzodiazepines was described and named peripheral benzodiazepine receptor (PBR) or Translocator protein (TSPO). The mainly function described to this TSPO is steroidogenesis. Additionally, its function as an immune modulator has been proposed with the involvement, at least in part, of endogenous glucocorticoids (EG). However, mechanisms of TSPO modulation on inflammatory process and the relation between the receptor and EG has not been totally established.

This study aimed investigate effects of two synthetic TSPO ligands, a benzodiazepine, Ro5-4864, and an isoquinoline carboxamide, PK 11195, and their relation with EG on leukocyte migration. For this purpose, male Wistar rats were in vivo treated with RU 38486 (EG antagonist receptor) or vehicle and, in addition, TSPO ligands, Ro5-4864 and/or PK 11195, were topically applied on animal mesentery microcirculation to evaluate leukocyte rolling and adhesion, by intravital microscopy, under basal conditions or after stimulation by N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine (fMLP). In addition, peripheral leukocytes were collected and in vitro treated with TSPO ligands to evaluate adhesion molecules expression, chemotaxis and calcium influx. Endothelial cells obtained from cremaster muscle were in vitro treated with TSPO ligands to evaluate adhesion molecules expression under basal conditions or after stimulation by lipopolysaccharide from E.coli (LPS).

Our results showed that: 1) TSPO ligand, Ro5-4864, altered the fMLP action since TSPO ligand inhibited the decrease of rolling, the increase of adherent cells, L-selectin cleavage, the increase of PECAM-1 expression, neutrophil chemotaxis and calcium influx; did not affect expression of PECAM-1 and ICAM-1 induced by LPS on endothelial cells; 2) PK 11195 increased fMLP-induced neutrophil calcium influx and chemotaxis; 3) co-administration of TSPO ligands, Ro5-4864 and PK 11195, reverted Ro5-4864 effects on L-selectin and PECAM-1 expression, neutrophil and calcium influx, as well as PECAM-1 and ICAM-1 expression on endothelial cells; 3) a possible inter-relation between TSPO and EG was observed since Ro5-4864 inhibited the

increase of in vivo leukocyte rolling and adhesion induced by RU 38486 in vivo treatment; it inhibited the increase of neutrophil L-selectin, lymphocyte β_2 -integrin and leukocyte PECAM-1 expressions; 4) It was showed that neutrophil have more TSPO than lymphocytes and endothelial cells, and this expression is increased by fMLP stimulation.

Taken together, our results suggest that TSPO ligands differently modulate leukocyte adhesion and motility functions and endothelial cells adhesion, and further, they suggest an allosteric agonist/antagonist relation. Additionally, they showed a relation between TSPO and EG cytoplasmic receptor on the control of leukocyte-endothelial interaction.

Keywords: benzodiazepines, inflammation, adhesion molecules, TSPO, intravital microscopy

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Citograma de leucócitos circulantes de animal controle; R1= neutrófilos; R2= linfócitos; R3= monócitos	49
FIGURA 2 – Citograma de células endoteliais de animal controle	51
FIGURA 3 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre o comportamento <i>rolling</i> de leucócitos <i>in vivo</i> após a aplicação tópica dos ligantes de TSPO e de fMLP sobre vênulas pós-capilares do leito mesentérico de ratos	52
FIGURA 4 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a adesão de leucócitos <i>in vivo</i> após a aplicação tópica dos ligantes de TSPO e de fMLP sobre vênulas pós-capilares do leito mesentérico de ratos.....	53
FIGURA 5 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de L-selectina em condições basais e na vigência de estimulação pelo fMLP em neutrófilos de ratos	54
FIGURA 6 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de L-selectina em condições basais e na vigência de estimulação pelo fMLP em linfócitos de ratos	54
FIGURA 7 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de β_2 -integrina em condições basais e na vigência de estimulação pelo fMLP em neutrófilos de ratos	55
FIGURA 8 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de LFA-1 em condições basais e na vigência de estimulação pelo fMLP em neutrófilos de ratos	56
FIGURA 9 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de VLA-4 em condições basais e na vigência de estimulação pelo fMLP em neutrófilos de ratos	57
FIGURA 10 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de PECAM-1 em condições basais e na vigência de estimulação pelo fMLP em neutrófilos de ratos	58
FIGURA 11 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de PECAM-1 em condições basais e na vigência de estimulação pelo fMLP em linfócitos de ratos	58
FIGURA 12 – Efeitos da co-administração dos ligantes de TSPO sobre a expressão de L-selectina em neutrófilos	59
FIGURA 13 – Efeitos da co-administração dos ligantes de TSPO sobre a expressão de PECAM-1 em neutrófilos e linfócitos	60
FIGURA 14 – Expressão de TSPO em neutrófilos e linfócitos, em condições basais ou estimuladas por fMLP (10^{-8} M) por 1 hora	60
FIGURA 15 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a quimiotaxia de neutrófilos estimulados por fMLP (10^{-8} M)	61
FIGURA 16 - Efeitos da administração dos ligantes de TSPO sobre os níveis de cálcio intracelular em condições basais e estimulados por fMLP	62

FIGURA 17 – Efeitos da administração dos ligantes de TSPO sobre os níveis de cálcio intracelular em condições basais e estimulados por fMLP – curva tempo-resposta	63
FIGURA 18 – Efeitos da administração dos ligantes de TSPO sobre os níveis de cálcio intracelular em condições basais e estimulados por bradicinina – curva tempo-resposta	65
FIGURA 19 – Expressão de TSPO em cultura primária de célula endotelial de ratos, em condições basais ou estimuladas por LPS (1µg/mL) por 2 horas	66
FIGURA 20 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de PECAM-1 e ICAM-1 em cultura primária de célula endotelial em condições basais ou estimuladas por LPS (1µg/mL)	67
FIGURA 21 – Efeitos da co-administração dos ligantes de TSPO sobre a expressão de PECAM-1 e ICAM-1 em célula endotelial em cultura primária	67
FIGURA 22 – Efeito do tratamento <i>in vivo</i> com o RU 38486 (18 e 2 h antes dos ensaios; 10mg/kg, via i.p.) sobre o influxo de leucócitos para cavidade peritoneal induzido pela injeção local de LPS	69
FIGURA 23 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a interação leucócito-endotélio na vigência de tratamento com RU 38486	70
FIGURA 24 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a interação leucócito-endotélio na vigência de tratamento com RU 38486	71
FIGURA 25 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de L-selectina presente em neutrófilos na vigência de tratamento com RU 38486	72
FIGURA 26 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de L-selectina presente em linfócitos na vigência de tratamento com RU 38486	72
FIGURA 27 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de β_2 -integrina presente em neutrófilos na vigência de tratamento com RU 38486	73
FIGURA 28 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de β_2 -integrina presente em linfócitos na vigência de tratamento com RU 38486	74
FIGURA 29 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de LFA-1 presente em neutrófilos na vigência de tratamento com RU 38486	74
FIGURA 30 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de LFA-1 presente em linfócitos na vigência de tratamento com RU 38486	75
FIGURA 31 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de VLA-4 presente em neutrófilos na vigência de tratamento com RU 38486	76

FIGURA 32 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de VLA-4 presente em linfócitos na vigência de tratamento com RU 38486	76
FIGURA 33 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de PECAM-1 presente em neutrófilos na vigência de tratamento com RU 38486	77
FIGURA 34 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de PECAM-1 presente em linfócitos na vigência de tratamento com RU 38486	78
FIGURA 35 – Participação do receptor de GC sobre a expressão de TSPO em neutrófilos e linfócitos	78
FIGURA 36 – Participação do receptor de GC sobre a expressão de TSPO em cultura primária de célula endotelial	79
FIGURA 37 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de PECAM-1 presente em célula endotelial em cultura primária na vigência de tratamento com RU 38486	80
FIGURA 38 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de ICAM-1 presente em célula endotelial em cultura primária na vigência de tratamento com RU 38486	81

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Efeitos do diazepam, <i>in vitro</i> , sobre a toxicidade de leucócitos do sangue e de células endoteliais obtidas de cultura primária	49
TABELA 2 – Efeitos do diazepam, <i>in vitro</i> , sobre a viabilidade de neutrófilos do sangue periférico	50
TABELA 3 – Efeitos do diazepam, <i>in vitro</i> , sobre a viabilidade de linfócitos do sangue periférico	50
TABELA 4 – Efeitos do diazepam, <i>in vitro</i> , sobre a viabilidade de células endoteliais	51
TABELA 5 – Efeitos da administração dos ligantes de TSPO sobre os níveis de cálcio intracelular em neutrófilos após a estimulação <i>in vitro</i> com fMLP	64
TABELA 6 – Efeitos da administração dos ligantes de TSPO sobre os níveis de cálcio intracelular em neutrófilos após a estimulação <i>in vitro</i> com bradicinina	65

SUMARIO

1.0 REVISÃO DA LITERATURA	18
1.1 Neuroimunomodulação	18
1.2 Benzodiazepínicos (BZD)	20
1.2.1 Translocator Protein (18 kDa) – TSPO	21
1.3 Recrutamento Leucocitário	25
1.4. Glicocorticóides (GC) e Recrutamento Leucocitário	31
1.5 Relação dos BZD e GC no controle do recrutamento leucocitário	35
2.0 OBJETIVOS	36
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Animais	36
3.2 Fármacos empregados nos estudos <i>in vitro</i>	37
3.3 Tratamento com RU 38486 <i>in vivo</i>	37
3.4 Reagentes	37
3.5 Soluções	38
3.6 Coleta do Lavado Peritoneal	40
3.7 Obtenção de diferentes tipos celulares	40
3.7.1 Obtenção de leucócitos circulantes	40
3.7.2 Obtenção de cultura primaria de células endoteliais	41
3.8 Citotoxicidade	41
3.8.1 Leucócitos e células endoteliais	41
3.9 Citometria de Fluxo	42

3.9.1 Avaliação da viabilidade celular	42
3.9.1.1 Linfócitos, neutrófilos e células endoteliais	43
3.9.2 Avaliação da expressão de moléculas de adesão	44
3.9.2.1 Linfócitos e neutrófilos	44
3.9.3 Avaliação da expressão de TSPO	44
3.9.3.1 Linfócitos, neutrófilos e células endoteliais	45
3.10 Avaliação da expressão de moléculas de adesão por Microscopia Confocal	45
3.11 Microscopia Intravital	46
3.11.1 Quantificação de leucócitos “rollers” e aderidos em vênulas pós-capilares	46
3.12 – Avaliação da quimiotaxia <i>in vitro</i> de neutrófilos	47
3.13 – Avaliação do Influxo de cálcio intracelular em neutrófilos por microscopia confocal	47
4.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5.0 RESULTADOS	48
5.1 Efeitos do diazepam sobre a viabilidade de leucócitos periféricos e de células endoteliais primarias em cultura	48
5.2 Efeitos da administração <i>in vitro</i> dos ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, sobre a interação leucócito-endotélio <i>in vivo</i>	51
5.3 Efeitos dos tratamentos com os ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, sobre a expressão de moléculas de adesão em neutrófilos e linfócitos	53
5.3.1 L-selectina	53
5.3.2 β_2 -integrina	55
5.3.3 LFA-1	55
5.3.4 VLA-4	56
5.3.5 PECAM-1	57
5.4 Efeitos do tratamento simultâneo com os ligantes de TSPO, PK	59

11195 e Ro5-4864, sobre a expressão de L-selectina e PECAM-1 em neutrófilos e linfócitos	
5.5 Expressão de TSPO em neutrófilos e linfócitos	60
5.6 Efeitos dos ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, sobre a quimiotaxia de neutrófilos	61
5.7 Efeitos da administração dos ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, sobre a concentração de cálcio intracelular em neutrófilos	61
5.8 Expressão de TSPO em cultura primária de célula endotelial	66
5.9 Efeitos do tratamento com os ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, sobre a expressão de PECAM-1 e ICAM-1 em cultura primária de célula endotelial	66
5.10 Eficácia do tratamento <i>in vivo</i> com o RU 38 486 no bloqueio do receptor citoplasmático	68
5.11 Efeitos dos ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, sobre a interação leucócito-endotélio <i>in vivo</i> na vigência de tratamento com RU 38486	69
5.12 Efeitos dos ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, sobre a expressão de moléculas de adesão em leucócitos na vigência de tratamento com RU 38486	71
5.12.1 L-selectina	71
5.12.2 β_2 -integrina	73
5.12.3 LFA-1	74
5.12.4 VLA-4	75
5.12.5 PECAM-1	77
5.13 Efeitos do tratamento com RU 38486 sobre a expressão de TSPO em neutrófilos e linfócitos após a estimulação por fMLP	78
5.14 Efeitos do tratamento com RU 38486 sobre a expressão de TSPO em célula endotelial em cultura primária	79
5.15 Efeitos dos ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, sobre a expressão de moléculas de adesão em célula endoteliais após tratamento com RU 38486	79
5.15.1 PECAM-1	80
5.15.2 VCAM-1	80

6.0 DISCUSSÃO	81
7.0 CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
ANEXOS	113

1.0 – Revisão da Literatura

1.1 – Neuroimunomodulação

Nos últimos 50 anos tem-se abandonado a idéia de que os organismos sejam constituídos por órgãos e sistemas funcionalmente separados uns dos outros. Na atualidade, estudos que demonstram que os sistemas orgânicos são regulados reciprocamente e comunicantes entre si têm ganhado destaque. Aristóteles já afirmava que a “psique” (alma) e o corpo reagem complementarmente um com outro. Uma mudança no estado da psique produzia uma mudança na estrutura do corpo, e à inversa, uma mudança na estrutura do corpo produzia uma alteração na estrutura da psique. No entanto, embora muitos acreditassem na existência de comunicações entre o Sistema Nervoso (SN) e o Sistema Imune (SI), desconhecia-se qualquer base biológica para essas interações (SOLOMON, 1999).

A Neuroimunologia ou Psiconeuroimunologia é o ramo cada vez mais estudado da ciência que busca analisar o relacionamento recíproco entre os SN e os componentes do SI. Estudos recentes têm mostrado que estados emocionais, como depressão, estresse e ansiedade (SA-ROCHA et. al., 2006; ALVES et. al., 2006, 2008; PINHEIRO et. al., 2011) bem como medicamentos de ação central, como o diazepam (MASSOCO; PALERMO-NETO, 1999; LAZZARINI et. al., 2001, 2006; SILVA et. al., 2003; SAKAI et. al., 2006a, 2006b) e psicoestimulantes (LIGEIRO DE OLIVEIRA et. al., 2004; 2008; 2011 DE PAULA, 2009) interferem com a imunidade.

Esta inter-relação entre o sistema nervoso central (SNC) e o SI é denominada de neuroimunomodulação. O termo inter-relações foi empregado exatamente porque estas são relações bidirecionais (CONHEN et. al., 1996). Assim, como o SI é capaz de perceber alterações do SN, o SN pode, também, perceber e responder a sinais emitidos pela atividade do SI durante uma resposta a um estímulo imunogênico, sugerindo que o SI é capaz de agir como um “órgão sensorial” (BESEDOVSKY et. al., 1977).

Inúmeros trabalhos mostram que produtos liberados de processos imune/inflamatórios são capazes de modular ou influenciar a atividade de áreas específicas do SNC modificando, assim, o comportamento animal (BESEDOVSKY et. al., 1981; BASSO et. al., 2001; 2004); além de situações de estresse que alteram a reposta imune, como descrito a seguir: estados de ansiedade gerados experimentalmente em animais do laboratório estão correlacionados com um déficit pronunciado da imunidade inata (PALERMO-NETO et. al., 2003); alterações no comportamento e na imunidade de camundongos cujas mães foram submetidas a um estresse pré-natal (FONSECA et. al., 2002, 2005); alterações na imunidade de camundongos que conviveram prolongadamente com um conspecífico doente (ALVES, et. al., 2006; 2008); assim como alterações da resposta imune-endócrina e diminuição de resistência a tumor em animais alojados individualmente (PALERMO-NETO et. al., 2008).

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) é um dos mais importantes sistemas de integração dos organismos, sendo ativado em resposta a estresses ou distúrbios homeostáticos. A ativação do eixo HHA e a conseqüente liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e de glicocorticóides endógenos (GE) fazem parte das respostas neurovegetativas ligadas às situações de estresse e ansiedade (GRAEF, 1989). Em casos de ativação do sistema imune, como em casos de inflamações de diferentes origens, interleucinas (IL), como as IL-6, IL-2, IL-11 e IL-12, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e o interferon- γ (IFN- γ) secretados no foco de lesão, alcançam o hipotálamo e a hipófise e estimulam o eixo HHA via corrente sangüínea (HOLSBOER, et. al., 1988; NAITOH, et. al., 1988; SHARP et. al., 1989; BESEDOVSKY; DEL REY, 1986; TURNBULL; RIVIER, 1999), elevando as concentrações séricas de GC, que atuarão no sentido de limitar as repostas inflamatórias.

Além do eixo HHA, o Sistema Nervoso Autônomo (SNA) tem papel relevante na integração dos sistemas centrais e periféricos durante o estresse. Assim, a estimulação deste sistema culmina na liberação de noradrenalina nos terminais nervosos simpáticos e na secreção de adrenalina pelas glândulas

adrenais (MAIER, 2003). Sabe-se que o SNA simpático inerva diversos órgãos linfóides, como o baço (MADDEN;FELTEN, 1995) e, adicionalmente, que outros órgãos e células como o pulmão, macrófagos alveolares e linfócitos circulantes apresentam alta densidade de receptores β 2-adrenérgicos (RUGG;BARNETT;NAHORSKY, 1978; HENRICKS et. al., 1988; FELTEN et. al., 1987). Neste sentido, Selmechy e colaboradores (2003) observaram deficiência na produção de IL-1 e TNF- α em camundongos com deficiência para transportadores de noradrenalina ou em tratamento com desipramina, Já com relação ao SNA parassimpático, seu principal componente, o nervo vago inerva os principais órgãos e, a existência de uma via anti-inflamatória colinérgica tem sido proposta (TRACEY, 2002).

A exemplo da inter-relação entre o SI e o eixo HHA, outros agentes endógenos e exógenos que atuam no SNC podem, também, afetar o SI (LIGEIRO-OLIVEIRA et. al., 2004; 2008; 2011; DE PAULA, 2009). Neste contexto, os benzodiazepínicos (BDZ) podem modificar a imunidade por alterar, principalmente, as atividades do eixo HHA e/ou do SNA simpático (WEIZMAN et. al., 1997; RIGHI et. al., 1999; DOMINGUES-JUNIOR et. al., 2000; LAZZARINI et. al., 2001; 2003; 2006; 2010), além de poder agir diretamente em células imunes (RAMSEIER et. al., 1993; MASSOCO; PALERMO-NETO, 1999; 2003; MARINO et. al., 2001; SILVA et. al., 2003; SAKAI et. al., 2006a).

1.2 – Benzodiazepínicos (BZD)

Introduzidos na terapêutica no início da década de 60, os BZD representaram um grande avanço no tratamento da ansiedade por terem uma grande eficácia, relativa seletividade de efeitos, baixa toxicidade e menor capacidade de induzir dependência. Em decorrência destes fatos, estes medicamentos figuram entre as classes de fármacos psicotrópicos mais prescritos e utilizados na atualidade pela população brasileira e mundial; sendo que seu uso não se restringe aos efeitos ansiolíticos, mas também por seus efeitos anticonvulsivante, sedativo e relaxante muscular (GRAEF, 1989; RUIZ et. al., 1993). De acordo com alguns autores, os BZD vêm ocupando lugar de destaque na medicina, no tratamento farmacológico dos distúrbios

neuropsíquicos, com excelentes resultados (WOODS et. al., 1992; KINANI et. al., 2007; RISS et. al., 2008).

De fato, os BZD vêm sendo prescritos com frequência cada vez maior, sendo até mesmo usados de forma indiscriminada (CABRERA et. al., 1993), talvez em decorrência do processo evolutivo das sociedades, que dia a dia gera situações de tensão emocional crônica e estresse. Uma pesquisa realizada pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas – CEBRID revelou que os ansiolíticos aparecem como um dos medicamentos mais utilizados no Brasil, mostrando, ainda, que houve aumento significativo do uso entre os anos de 2001 e 2005 (CEBRID, 2005). Os BZD atuam em sítios receptores de alta afinidade localizados no SNC, conhecidos como receptores centrais para benzodiazepínicos (CBR) e que se encontram acoplados aos receptores GABA_A (BORMANN, 1988), sendo estes os responsáveis pelos principais efeitos clínicos dos BZD.

Porém, sítios de ligação periféricos para os BDZ (PBR – *peripheral benzodiazepine receptor*) (MARANGOS et. al., 1982), atualmente chamados de TSPO – *Translocator protein* (18 kDa) (PAPADOPOULOS et. al., 2006) foram identificados em vários órgãos como rins, fígado e pulmões (SAANO, 1988), em tecidos esteroideogênicos como adrenal e testículos (OKE et. al., 1992; GARNIER et. al., 1993; PAPADOPOULOS, 1993) e, também, em várias células do sistema imune como linfócitos, monócitos, macrófagos, leucócitos polimorfonucleares, além de células endoteliais (ZAVALA et. al., 1984; FERRARESE et. al., 1990; SCHLUMPF et. al., 1990, 1992; LAZZARINI et. al., 2006).

1.2.1 – Translocator Protein (18 kDa) – TSPO

Apesar de serem extensamente caracterizados do ponto de vista farmacológico e bioquímico e implicados em vários processos biológicos, a potencialidade das ações dos TSPO não está totalmente elucidada (CASELLAS et. al., 2002). A maioria dos estudos realizados tem mostrado a presença de TSPO junto à membrana externa das mitocôndrias, sendo denominados muitas vezes de receptores mitocondriais, e estão envolvidos

com a modulação da respiração celular e na translocação do colesterol (CALVO et. al., 1983; ANHOLT, 1985; HIRSCH et. al., 1988a; 1988b; ZISTERER et. al., 1992; LIU et. al., 2006). Adicionalmente, outros trabalhos têm indicado a presença desses receptores no núcleo, no complexo de Golgi, nos lisossomos, nos peroxissomos (O'BEIRNE et. al., 1990) e, até mesmo, na membrana plasmática (CANAT, et. al., 1992; OKE et. al., 1992).

Os TSPO distinguem-se farmacologicamente dos CBR localizados nos neurônios e não têm relação com o GABA ou com os íons cloro (ANHOLT et. al., 1984; AWAD; GARISH, 1987). Além disso, diferenciam-se, também, desses receptores quanto aos aspectos anatômicos, estruturais e fisiológicos (PIERRE et. al., 2000). Alguns trabalhos relatam que os ligantes de TSPO afetam várias funções celulares, dependentes do tipo celular em que está expresso e de suas densidades de expressão (IKEZAKI; BLACK, 1990; GAVISH, et. al., 1992).

Vários estudos têm relatado que ligantes seletivos de TSPO podem induzir efeitos em células não-neuronais, incluindo-se entre eles, regulação do crescimento e diferenciação celular (CLARKE; RYAN, 1980; MATTHEW et. al., 1981; PAWLIKOWSKI et. al., 1988), expressão de protooncogenes (CURRAN; MORGAN, 1985) e interações com respostas imunes (LENFANT et. al., 1988; ZAVALA; LENFANT, 1987; LAZZARINI et. al., 2003, 2006, 2010; DE LIMA et. al., 2010).

Tem sido mostrado que os TSPO modulam a produção de esteróides por facilitar a ligação e a translocação do colesterol do meio extracelular para o meio intracelular da mitocôndria, onde é transformado em pregnenolona, que é a forma primária da síntese de todos os hormônios esteroidais (PAPADOPOULOS, 1990; LACAPERE; PAPADOPOULOS, 2003; RONE et. al., 2009). Neste sentido, alguns trabalhos demonstraram que a administração de diazepam estimulou a produção de testosterona em homens (ARGUELLES; ROSNER, 1975) e de glicocorticóides em ratos (MARC; MARSELLI, 1969; LAZZARINI et. al., 2001). Adicionalmente, outros estudos têm mostrado que baixas concentrações de ligantes de TSPO *in vitro* estimularam a esteroidogênese (HAUET et. al., 2005; VEENMAN et. al., 2007). No SNC, os TSPO foram localizados mais especificamente nas células da glia, estando,

neste local, envolvidos com a produção de neuroesteróides (PAPADOPOULOS, 1993).

Por estarem envolvidos em diversos processos fisiológicos, alterações na expressão de TSPO têm sido relacionadas a diversas doenças, incluindo câncer, doenças endócrinas e neurológicas. Sob condições fisiológicas, estes receptores estão presentes em pequenas quantidades no SNC, entretanto, esses níveis são aumentados na vigência de uma injúria ou inflamação cerebral (CHEN;GUILARTE, 2006). Assim, diversos trabalhos têm mostrado a relação entre estes receptores e doenças como Alzheimer, Parkinson, isquemias, esclerose múltipla, dentre outras (VEENMAN;GAVISH, 2000; PAPADOPOULOS et. al., 2006; CHEN;GUILARTE, 2008; OH et. al., 2011). Por estas razões, a expressão de TSPO tem sido proposta como um biomarcador para estas doenças neurológicas (CHEN;GUILARTE, 2008; DOORDUIN et. al., 2008; PAPADOPOULOS;LECANU, 2009; RUPPRECHT et. al., 2010).

Nesta mesma linha de evidências, trabalhos também têm relacionado o aumento na expressão de TSPO com diversos tipos de cânceres e, ainda, sabe-se que esta expressão está relacionada com o grau de malignidade (MAASER et. al., 2005; VLODAVSKY; SOUSTIEL, 2007).

Estudos de ligação ao receptor (*binding*) mostraram que o diazepam liga-se com alta afinidade tanto em CBR como em TSPO, sendo por isto chamado de agonista misto. Já o composto 4' clordiazepam, também conhecido como Ro5-4864 liga-se com alta afinidade aos TSPO, mas com baixa afinidade aos CBR (SYAPIN; SKOLNICK, 1979). Além dos BDZ, existem outras substâncias que apresentam uma afinidade pelos TSPO, como os derivados da isoquinolona carboxamida. Um destes derivados, o composto PK 11195 (1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolona carboxamida), mesmo que estruturalmente diferente dos BDZ, é considerado o ligante padrão para o estudo destes receptores por apresentar alta afinidade ao receptor (Lê FUR et. al., 1983).

Apesar das mais diversas substâncias apresentarem afinidade ao TSPO, sem dúvida alguma o PK 11195 e o Ro5-4864 são as mais utilizadas

para o estudo desses receptores. Com base em alguns estudos de entalpia e entropia da interação agonista-receptor, verificou-se que o Ro5-4864 atua como um agonista de TSPO, enquanto que o PK 11195 tem ação antagonista (Lê FUR et. al., 1983). Contudo, esta classificação ainda é duvidosa, pois sob algumas condições fisiológicas e dependendo da concentração utilizada, do tipo de tecido ou da célula analisada, ambos podem apresentar efeitos similares (SHANY et. al., 1994). Neste sentido, foi mostrado que o Ro5-4864 aumentou a atividade quimiotóxica de monócitos e que este efeito foi revertido pelo PK 11195 (RUFF et. al., 1985). Da mesma forma, observou-se um aumento de quimiotaxia e fagocitose, de neutrófilos humanos, promovido pelo diazepam, efeito este revertido pelo PK 11195 (MARINO et. al., 2001). Entretanto, observou-se aumento de *burst* oxidativo e diminuição de fagocitose de neutrófilos de ratos após a administração *in vitro* de Ro5-4864 e PK 11195, mostrando, então, que o PK 11195 neste caso não foi capaz de antagonizar os efeitos do Ro5-4864 (Silva, F. R., 2003 – Tese de doutorado).

Além dos ligantes exógenos, existem também moléculas endógenas que apresentam afinidade pelos TSPO. Assim, o DBI (*diazepam binding inhibitor*), descrito originalmente como um ligante endógeno com capacidade de inibir a ligação do diazepam aos CBR, também apresenta afinidade pelos TSPO (GUIDOTTI et. al., 1983). Além deste, outros ligantes endógenos como as porfirinas apresentam alta afinidade de ligação a estes receptores (VERMA et. al., 1987).

Os TSPO foram identificados em linfócitos (ROCCA et. al., 1993), monócitos, granulócitos (ZAVALA et. al., 1984; ZAVALA; LENFANT, 1987; SCHLUMPF et. al., 1990, 1992) e células endoteliais (LAZZARINI et. al., 2006). No entanto, a densidade destes é variável entre os diferentes tipos celulares. Monócitos e granulócitos apresentam densidade semelhante entre si e maior que a observada em linfócitos B, T (CD4 e CD8) e células *natural killers* (NK) (ZAVALA et. al., 1987; 1990; CANAT et. al., 1992; ROCCA et. al. 1993).

Em conjunto, a literatura apresentada acima amplia as ações dos BZD e mostra que as ações periféricas e centrais dos BZD ligadas à modulação da resposta imune são dependentes de suas ligações aos TSPO. Esta nova

interpretação da ação dos BZD abre perspectivas interessantes na modulação das ações celulares centrais e periféricas e, neste contexto, se encaixa a neuroimunomodulação. Estudos que elucidem esta interação poderão contribuir para o esclarecimento do controle fisiológico e farmacológico das funções do sistema imune.

1.3 Recrutamento Leucocitário

Em condições normais, a interação dos leucócitos circulantes com o endotélio da microcirculação é pequena. Entretanto, em uma resposta inflamatória, a interação dos leucócitos ao endotélio é exacerbada e envolve a interação dos leucócitos circulantes com o endotélio de vênulas pós-capilares, mediada pela expressão de moléculas de adesão (CAMs), que permite aos leucócitos interagirem com a parede do vaso (ALI et. al., 1999; FRANGOIANNIS et. al., 2001; WIEDLE et. al., 2001; KUBES, 2002). Este fenômeno, em parte, é decorrente de modificações em propriedades reológicas que ditam condição *low shear stress* (baixa força de cisalhamento), observada nas etapas iniciais do processo inflamatório. Como resultado, as hemácias, que neste momento se agregam, movem-se em direção ao centro do vaso, enquanto os leucócitos são dispostos na parede do vaso (KELLY et. al., 2007). Desta forma, o movimento rotacional dos leucócitos ao longo da parede vascular é chamado *rolling*. Os passos seguintes deste processo compreendem a firme adesão e a transmigração celular pela parede vascular (ALON;LEY, 2008). Com base nas suas características funcionais e bioquímicas, as CAMs têm sido classificadas em diferentes famílias, sendo membros de pelo menos três famílias que medeiam a interação leucócito-endotélio: selectinas, integrinas e a super-família das imunoglobulinas (KRIEGLSTEIN; GRANGER, 2001).

A adesão dos leucócitos circulantes ao endotélio vascular é fundamental para uma efetiva defesa contra infecção e injúria. Neste período a expressão de selectinas na superfície de leucócitos ou em células endoteliais é aumentada, sendo responsáveis, principalmente, pelo contato inicial dos leucócitos com o endotélio vascular ao longo da margem da vênula (“tethering” e comportamento “rolling”) (BUTCHER, 1991; SPRINGER, 1994; RANKIN,

2004). A família das selectinas compreende 3 membros: L-selectina, E-selectina e P-selectina (SMALLEY; LEY, 2005; SPERANDIO, 2006). As interações das selectinas aos seus ligantes, em geral carboidratos sialilados ou fucosilados, expressos nas membranas de células adjacentes são fracas, o que permitem o deslizamento dos leucócitos sobre a parede vascular (LEY et. al., 2007). O passo seguinte do processo envolve a expressão e/ou ativação das integrinas nos leucócitos, sendo estas fundamentais para a firme adesão destes ao endotélio e para a migração celular na matriz extravascular, pois controlam as interações célula-célula e matriz extracelular-célula na vigência de do processo inflamatório (VON ADRIAN et. al., 1995). Na vigência de estímulo, ocorre expressão das qual e quantitativa das integrinas, dependentes da ativação de moléculas expressas nas membranas celulares e da externalização de estoques intracelulares, respectivamente (CAMPBELL et. al., 1998).

As integrinas são compostas por heterodímeros com uma cadeia α e outra β , associadas de maneira não-covalentes. A perfeita interação destas no domínio extracelular compreende o sítio de ligação ao ligante contra-lateral e os domínios intracelulares são responsáveis pela ligação a componentes do citoesqueleto e pela sinalização intracelular (RUOSLAHTI et. al., 1994; BRUJIN; HEER, 1995). As subfamílias das integrinas são agrupadas de acordo com a sua cadeia β , assim os leucócitos expressam quatro subunidades diferentes de cadeias β (β_1 , β_2 , β_3 , e β_7), sendo a expressão de β_2 e β_7 limitada a leucócitos, enquanto que a expressão de β_1 é observada na maioria dos tipos celulares (HUMPHRIES et. al., 2006; LUO et. al., 2007; KINASHI, 2007). Assim, já foram identificadas pelo menos 18 subunidades de cadeia α e 8 subunidades de cadeia β , onde a combinação destas varias subunidades formam pelo menos 26 integrinas (RUOSLAHTI et. al., 1994; BRUJIN; HEER, 1995; ARNAOUT et. al., 2007; LUO et. al., 2007; HOGG et. al., 2011).

A subfamília β_2 é composta por 4 membros distintos, LFA-1 (leukocyte function antigen- 1), Mac-1, gp150,95 e $\alpha_d\beta_2$. A subfamília β_1 , também chamada de proteínas *very late antigen* (VLA), são expressas em diversos

leucócitos, incluindo linfócitos, monócitos, assim como basófilos e eosinófilos (HEMLER et. al., 1990; BOCHNER et. al., 1991). A exceção são os neutrófilos, que não expressam níveis detectáveis de β_1 -integrina. Entretanto, estas células podem ser induzidas *in vitro* a produzir pequenas quantidades, porém detectáveis níveis de β_1 -integrina (ARNAOUT et. al., 1988; BERGER et. al., 1984; FREYER et. al., 1988).

A LFA-1 (CD11a/CD18) é expressa em todos os leucócitos e possui papel importante na proliferação *in vitro* de células T (BERZINS et al., 1988; SCHWARTZ et al., 1989), na interação de células T e NK com suas células alvos (DAVIGNON et al., 1981; SCHMIDT et al., 1985), na ativação de células B e sua diferenciação em plasmócitos (HOWARD et al., 1986; FISHER et al., 1986) e na interação leucócito-endotélio, sendo fundamental na recirculação de linfócitos pela sua interação com moléculas de adesão expressas nas células endoteliais de linfonodos (MENTZER et al., 1986; ARNAOUT et al., 1988).

A MAC-1 (CD11b/CD18), já foi identificada em diferentes tipos de leucócitos como neutrófilos, monócitos, macrófagos, eosinófilos e alguns linfócitos T (SMITH, 2008). Esta molécula é armazenada em grânulos, sendo liberada após ativação celular (BORREGAARD et. al., 1994). Ainda, se liga a diferentes glicoproteínas de bactérias e fungos, fator de coagulação Xa, fibrinogênio e complemento (ROSS, 2000). É responsável pela regulação da velocidade de rolling dos leucócitos e, em alguns casos, participa da migração de neutrófilos. Ainda, esta envolvida na interação neutrófilo-plaqueta e na fagocitose 56, (MAYADAS; CULLERE, 2005; ZARBOCK et. al., 2007). Já a molécula gp150,95 (CD11c/CD18) e $\alpha_d\beta_2$ (CD11d/CD18) foram identificadas em monócitos, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos (ELANGBAM et. al., 1997; SMITH, 2008) .

A VLA-4, também conhecida como CD49d/CD29 ou $\alpha_4\beta_1$, assim como as demais moléculas pertencentes a esta subfamília, atuam como moléculas de adesão e de sinalização e estão amplamente distribuídas entre os tecidos, interagindo predominantemente com as proteínas da matriz extracelular como

a laminina, colágeno e fibronectina (DE GRAAF et. al., 1995; WALSH et. al., 1990).

As integrinas ligam-se a diferentes componentes da membrana celular, como a fração do complemento, além de moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas, que são expressas por células endoteliais, sendo que alguns dos seus constituintes também são expressos por leucócitos e plaquetas. A superfamília das imunoglobulinas é caracterizada pela presença de domínios de imunoglobulinas e compreendem as moléculas de adesão intracelular (ICAM-1 e 2), molécula de adesão celular vascular (VCAM) e molécula de adesão plaqueta-célula endotelial (PECAM-1) (ELANGBAM et. al., 1997).

A ICAM-1 (CD54) possui 5 domínios extracelular de imunoglobulina e é expressa de maneira constitutiva no endotélio e alguns leucócitos. Após estimulação com diferentes citocinas inflamatórias, como o TNF, grande maioria das células do organismo podem expressar esta molécula (SMITH, 2008). Já a ICAM-2 (CD102,) constitutiva em plaquetas e células endoteliais, possui 2 domínios extracelular de imunoglobulina, sendo encontrada próxima as junções intercelulares. Diferente da ICAM-1, a expressão desta molécula não é aumentada por citocinas inflamatórias (SMITH, 2008). Ambas moléculas contribuem para a adesão e transmigração da maioria dos leucócitos por meio da interação com β 2-integrinas (BEVILACQUA, 1993). Assim, animais knockout para ICAM-1 apresentaram diminuição do recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal quando desafiados pela inoculação de *Streptococcus pneumoniae* (BULLARD et. al., 1995).

A VCAM-1 (CD106), que possui 6 ou 7 domínios de imunoglobulinas, é expressa em células endoteliais após a exposição a citocinas inflamatórias como IL-1, TNF e LPS e se liga a VLA-4 (CARLOS et. al., 1990). Medeia o recrutamento, principalmente, de linfócitos e monócitos para o foco inflamatório (COLLINS et. al., 1995).

A PECAM-1 (CD31), composta por 6 domínios de imunoglobulinas, é pouco expressa na superfície de leucócitos e plaquetas, mas muito expressa (>

10^6 moléculas/célula) no endotélio (DE LISSER et. al., 1993). Sua localização nas junções entre células endoteliais confere seu papel primordial com a migração transendotelial. A PECAM-1 é armazenada em estoques que ficam concentrados na superfície celular, conectado a invaginações vesiculares nas junções de células endoteliais. Assim, essa molécula recicla sobre a membrana celular e durante a migração transendotelial e é direcionada às áreas de junções celulares. Estas funções da PECAM-1 foram obtidas em ensaios com anticorpos monoclonais e animais geneticamente modificados. Muller e colaboradores (1993) demonstraram que o uso de anticorpo anti PECAM-1 bloqueou a transmigração de leucócitos frente a células endoteliais estimuladas pelo TNF. Ainda, animais deficientes de PECAM-1 apresentaram diminuição da migração de neutrófilos (SCHENKEL et. al., 2006). Ainda, sabe-se que esta molécula está relacionada com a patogenia de doenças como aterosclerose, isquemia/reperfusão e doenças autoimunes (WOODFIN et. al., 2007).

Na matriz extravascular os leucócitos migram, orientadamente, em direção ao foco de lesão, respondendo a um gradiente de moléculas dispersas ou ligadas à matriz extravascular, que são denominadas, coletivamente de substâncias com atividades quimiotáticas. Neste sentido, vale ressaltar que a migração no interstício é a resposta celular a um gradiente de substâncias químicas dispersas ou imobilizadas na matriz extravascular que induzem mecanismos intracelulares responsáveis pela motilidade, senso de direção e polaridade celular (LI et. al., 2005). A motilidade é conferida pela emissão de pseudópodes, gerados pelas ondas espontâneas de filamentos e actina, que são propagadas pelo citoesqueleto e o senso de direção é mediado por um sistema que detecta variações temporais e espaciais pelo gradiente de concentração e que altera a sensibilidade e localização dos receptores de membrana, sendo estas modificações responsáveis por alterações morfológicas e funcionais para a polaridade celular (SWANEY et. al., 2010). Esta polarização está associada a uma reorganização da membrana plasmática, com agrupamento de receptores de membrana, além da alteração intracelular do citoesqueleto (ZIGMOND et. al., 1981), que, em conjunto, formam pontos de adesão focais, que permitem a adesão e locomoção no interstício extravascular.

Dentre as substâncias quimiotáticas para neutrófilos destacam-se o fator de agregação plaquetária (PAF), peptídeos formilados constituintes da parede bacteriana, como o formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), fator C5a do sistema complemento e a interleucina-8 (IL-8). Em comum, estes agentes ligam-se à receptores de membrana acoplados a proteína G (STILLIE et. al., 2009). A ativação destes receptores leva a sinalizações intracelulares complexas, que desencadeiam não somente a migração orientada, mas também a desgranulação, a secreção de mediadores inflamatórios e a ativação do *burst* respiratório (JANETOPOULOS; FIRTEL, 2008).

A ligação dos fatores quimiotáticos aos seus receptores acoplados a proteína G (GPCR) ativa vias sinalizações distintas. De maneira generalizada, focando somente a via envolvida na quimiotaxia, a interação do fMLP ao GPCR ativa a fosfolipase C, que por sua vez promove a hidrólise do fosfatidilinositol bifosfato, gerando diacilglicerol. Este irá ativar isoformas de fosfoquinases, bem como o inositol trifosfato, sendo este o responsável pela liberação de cálcio dos estoques intracelulares (NIGLLI, 2003). Sabe-se que o pulso de aumento rápido do cálcio intracelular é necessário para fosforilação de proteínas que levam à orientação celular, embora a orientação ocorra mesmo que com baixos níveis de cálcio intracelular (MALCHOW et. al., 1996).

Ainda, o aumento dos níveis de cálcio intracelular no endotélio também é fundamental, pois este parece ser o responsável pela fosforilação da cadeia leve da miosina mediada por quinases dependentes de Ca^{+2} /calmodulina e subsequente contração da célula endotelial para transmigração leucocitária (HUANG et. al., 1993). Etienne-Manneville e colaboradores (2000) mostraram que o uso de quelantes de cálcio ou de inibidores de fosfoquinases diminuiu a transmigração leucocitária, enaltecendo, assim, a importância da sinalização mediada pelo cálcio.

A literatura exposta acima, embora que de maneira resumida, mostra que os processos de migração leucocitária para o foco de lesão é dependente de interações celulares mediadas por ações de membrana, citoplasmática e nucleares complexas e que ocorrem de maneira seqüencial no processo inflamatório. Modificações nos eventos de migração leucocitária podem ser

benéficos quando a resposta inflamatória é exacerbada, mas prejudicial ao organismo se o processo é ineficiente. Assim, as funções celulares nas diferentes etapas do processo devem responder à característica temporal da inflamação e à sua intensidade.

1.4 – Glicocorticóides (GC) e Recrutamento Leucocitário

Uma vez que a resposta inflamatória deve ser adequada à intensidade do estímulo, diferentes células do sistema imune ou de outros tecidos secretam substâncias químicas que regulam a resposta do organismo ao trauma e que promovam o retorno à homeostasia (CABRAL et. al., 2005).

Dentre estes agentes químicos, os glicocorticóides endógenos (GE) são moduladores importantes do recrutamento leucocitário para o foco de lesão por interferirem diretamente sobre as propriedades de adesão e/ou locomoção celular ou por inibirem a secreção de mediadores inflamatórios envolvidos no processo (PERRETI et. al., 1989; PIPITONE et. al., 2001). As bases moleculares de ação dos GE são as mesmas dos glicocorticóides (GC) exógenos empregados na terapia, como um dos mais potentes antiinflamatórios conhecidos.

Os GC exercem a maioria de seus efeitos pela ativação de receptores glicocorticóides (GR), localizados no citoplasma de inúmeras células. A interação com o agonista faz com que o GR seja liberado da proteína pertencente à família das *heat-shock proteins* (HSP 90) e outras proteínas regulatórias, permitindo que este alcance o núcleo. O domínio da região N-terminal do receptor liga-se a seqüências específicas do DNA (*glucocorticoid responsive element*, GRE), positivas ou negativas, nas regiões promotoras dos genes, iniciando ou impedindo a transcrição (ADCOCK, 2000; LU; CIDLOWSKI, 2004). Apesar deste clássico mecanismo de ação, tem sido sugerido que a ativação do GR atua diretamente sobre fatores de transcrição, como o Fator Nuclear κ B (NF- κ B) ou sobre a ativação da proteína-1 (AP-1), inibindo suas ligações ao DNA e impedindo, consequentemente, a

transcrição gênica (REICHARDT et. al., 2001; LU; CIDLOWSKI, 2004). Adicionalmente, outro mecanismo, não-genômico, tem sido proposto e está relacionado, até o momento, a doses elevadas de hormônios empregados na terapia. Neste caso, os efeitos antiinflamatórios são muito rápidos e não são abolidos pela ação de inibidores da transcrição gênica e de síntese proteica (LIU et. al., 2005; LONG et. al., 2005). O mecanismo molecular destas ações ainda não é conhecido, mas há evidências da participação de receptor de superfície ou da interação dos GC com os fosfolipídios de membrana (BARTHOLOME et. al., 2004; STELLATO, 2004; ZANCHI et. al., 2010).

Os mecanismos de ação dos GC sobre o controle do recrutamento leucocitário têm sido bastante estudados e mostram que GC secretados controlam, via mecanismo genômico, o comportamento “*rolling*” em condição basal, assim como a adesão e a transmigração na vigência de resposta inflamatória (FARSKY et. al., 1995). A literatura mostra que os GC modulam negativamente a expressão de moléculas de adesão, embora os resultados possam ser controversos, dependentes, na sua maioria, de condições experimentais que envolvem diferentes concentrações hormonais, períodos de incubação e influência de outras substâncias químicas secretadas em conjunto com os GC em situações de estresse (WEBER et. al., 2004; CAVALCANTI et. al., 2006, 2007).

Dentro das ações dos GC sobre as moléculas de adesão, já é bem estabelecido o papel dos GE sobre a expressão de L-selectina em neutrófilos. Alguns trabalhos relatam que animais com aumento ou redução dos níveis circulantes de GC apresentam redução ou aumento de expressão de L-selectina na membrana celular, respectivamente (FARSKY et. al., 1995; PITZALIS et. al., 2002; CAVALCANTI et. al., 2006; KONIG et. al., 2006). Adicionalmente, tem sido mostrado que o receptor de GC está envolvido neste controle, já que animais tratados com RU 38486 apresentam aumento na expressão da molécula (CAVALCANTI et. al., 2007) e ainda, que a anexina-1, proteína antiinflamatória secretada pela ação dos GC, participa deste controle (PERRETTI; D’ACQUISTO, 2009)

Ainda, tem sido bem mostrado que estes GE inibem a clivagem da L-selectina em neutrófilos e inibem a expressão e expressão gênica de imunoglobulinas (FARSKY et. al., 1995; CAVALCANTI et. al., 2006, 2007). Apesar destes efeitos serem mediados pelo receptor citoplasmático, os mecanismos intracelulares diferem. Tem sido mostrado que os GE inibem a translocação nuclear do fator de transcrição NF κ B na célula endotelial, que inibe a expressão gênica de imunoglobulinas (CAVALCANTI et. al., 2007), e que a modulação sobre a L-selectina é dependente da anexina-1 (ANXA1), uma proteína antiinflamatória sintetizada pela ação dos GC (CAVALCANTI et. al., 2007; PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009).

A literatura é controversa quanto aos efeitos dos GC sobre a expressão de β_2 -integrina presente nas células imunes. Filep e colaboradores (1997) mostraram que em condições basais, os GC exógenos não alteraram a expressão da molécula em neutrófilos humanos, fato corroborado em neutrófilos provenientes de ratos adrenalectomizados ou tratados por períodos prolongados com RU 38486 (CAVALCANTI et. al., 2006; 2007). Diferentemente, Burton e colaboradores (1995) observaram diminuição na expressão da molécula em neutrófilos bovinos após tratamento *in vivo* com GC exógenos.

Além da ação sobre a interação leucócito-endotélio, as ações dos GC sobre a migração orientada de leucócitos está bem documentada e, da mesma forma, as controvérsias de resultados estão ligados à protocolos de experimentação diversos. Sabe-se que os GC podem ativar e liberar mediadores de granulócitos. Assim, a literatura tem mostrado a ação dos GC sobre a inibição de diversos mediadores como IL-8, fator de necrose tumoral (TNF), fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), MCP-3, dentro outras (ZENTAY et. al., 1999, DONNELLY et. al., 2010)

Já foi mostrado que o tratamento com GC exógenos aumentou a expressão do receptor tipo I de leucotrieno em células HL-60, sendo este efeito associado a indução da quimiotaxia e mobilização intracelular de cálcio (OBINATA et. al., 2003). Os GC exógenos também inibiram a quimiotaxia de

eosinófilos induzida por LTB-4 e PAF, mas não foram capazes de alterar a produção de superóxido (SUGIMOTO et. al., 2003). Ainda, o tratamento com GC foi capaz de diminuir a expressão de receptor de quimiocina presente em eosinófilos, mas não em neutrófilos, mostrando uma ação dependente do tipo celular (NAGASE et. al., 2000).

Também já foi relatado o envolvimento dos GC com níveis de cálcio, assim, Gardner e Zhang (1999) mostraram que o tratamento de células B com GC diminuiu os níveis basais de cálcio intracelular e mais, o tratamento com o bloqueador do receptor de GC, RU 38486, impediu este efeito.

Ainda, foi observada diminuição na expressão de imunoglobulinas presentes em células endoteliais cerebrais após tratamento com altas doses de GC, levando a uma diminuição de transmigração de células mononucleares (GELATI et. al., 2000). Tailor e colaboradores (1999) mostraram uma diminuição na expressão de ICAM-1 em células endoteliais de mesentério após tratamento com CG exógenos. Da mesma forma, também foi observada diminuição da expressão desta molécula em linhagem de célula endotelial (A549) (WHELLER;PERRETTI, 1997).

Associados, os dados da literatura são bastante evidentes quanto a ação do GC, quer sejam como moduladores endógenos, ou como antiinflamatórios, na migração neutrofílica e que as secreções e ações destes hormônios possam ser responsáveis pelos mecanismos de antiinflamatórios de compostos exógenos ou endógenos.

1.5 – Relação dos BZD e GC no controle do recrutamento leucocitário

Trabalhos experimentais têm mostrado que os BZD modulam a resposta imune-inflamatória. O tratamento de ratos com doses elevadas ou baixas de diazepam diminuiu eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória induzida por carragenina ou outros agentes vasoativos (LAZZARINI et. al., 2001; 2003; TORRES et. al., 1999; 2000). Estes efeitos parecem ser mediados pelos seus receptores periféricos, uma vez que o pré-tratamento *in vivo* com

PK 11195 e Ro5-4864 também foi capaz de diminuir a exsudação pleural induzida por carragenina, o recrutamento leucocitário e a secreção de IL-13 e IL-6 (TORRES et. al., 2000).

Adicionalmente, Massoco e Palermo-Neto (1999) mostraram que a administração de diazepam diminuiu também a atividade de macrófagos de camundongos, como demonstrado pela medida do espriamento, da fagocitose e produção de H_2O_2 . Mais recentemente este mesmo grupo mostrou que tratamento com midazolam diminuiu a produção de $TNF-\alpha$ por macrófagos peritoneais de eqüinos e a fagocitose por macrófagos e neutrófilos sanguíneos (MASSOCO; PALERMO-NETO, 2003). Estes trabalhos são corroborados por dados da literatura que mostraram que o diazepam é capaz de diminuir a produção de interleucinas por leucócitos (SCHLUMPF et. al., 1990; SCHREIBER et. al., 1993).

O efeito dos BZD sobre a resposta imune parece ser mantido por período de tempo prolongado e durante o desenvolvimento. Macrófagos peritoneais de ratos adultos que foram tratados durante o período peri-natal com diazepam apresentaram atividade fagocítica reduzida (SILVA; PALERMO-NETO, 1999).

A participação dos GC nos efeitos antiinflamatórios dos BZD foi sugerida devido ao aumento de corticosterona circulante em animais tratados agudamente com diazepam (LAZZARINI et. al., 2003; SILVA et. al., 2003; DE LIMA, C. B., 2009). Adicionalmente, foi observado em animais tratados com antagonista de receptor de GC ou animais adrenalectomizados e, posteriormente, tratados com o diazepam, reversão parcial da inibição do recrutamento leucocitário provocado pela carragenina (LAZZARINI et. al., 2006). É importante ressaltar que a elevação da concentração de GC não é observada após o tratamento crônico com o BZD.

Associados, os dados apresentados permitem inferir a relação da ação BZD, via TSPO, e a secreção/ação dos GE, e que esta relação possa estar envolvida, pelo menos em parte, na ação moduladora dos BZD sobre os sistema imune.

2.0 – OBJETIVOS

Como já salientado, os ligantes de TSPO modulam o processo inflamatório, mas os mecanismos envolvidos nestas ações não estão esclarecidos. Desta forma, o presente trabalho visou elucidar o papel de dois ligantes de TSPO de classes químicas diferentes sobre os eventos da migração neutrofílica, além de estabelecer o papel dos GE sobre as ações dos TSPO neste processo.

3.0 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 180 - 220g, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Todos os animais foram utilizados seguindo as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), tendo sido aprovado perante o Comitê de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP (nº 1690/2009) e pela Comissão Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP (nº 262/2009).

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

3.2 – Fármacos empregados nos estudos *in vitro*

Foram utilizados o Diazepam (Roche), um agonista de receptores benzodiazepínicos centrais e periféricos, diluído em etanol a 0,01% e 0,001%, assim como o PK 11195 (Sigma) e o Ro5-4864 (Sigma), ligantes de receptores benzodiazepínicos periféricos, diluídos em etanol a 0,001%. As concentrações de diazepam utilizadas, *in vitro*, foram de 10 nM, 100 nM e 1000 nM, já a do PK 11195 e do Ro5-4864 foi de 100 nM.

3.3 – Tratamento com RU 38486 *in vivo*

O RU 38 486 (Sigma, St.Louis, MO, USA), bloqueador de receptores de glicocorticóides, foi dissolvido em solução salina, onde para cada 1 mL de solução foram adicionados 2 mg de carboximetilcelulose, 40µL de etanol e Tween 20. Foi utilizada a dose de 10 mg/kg administrada 18 horas e 1 hora antes de cada experimento, por via intraperitoneal (i.p.). Animais controles receberam igual volume do veículo pela mesma via, durante o mesmo período de tempo.

3.4 – Reagentes

- **Amarelo de tetrazólio – MTT (SIGMA):** utilizado para avaliação da citotoxicidade;
- **Anexina V conjugada ao fluorocromo FITC (BD):** utilizada como marcador indicativo de processo de apoptose;
- **Anticorpos conjugados aos marcadores de superfície celular anti-CD11a, anti-CD18, anti-CD49d, anti-CD62L, anti-CD31, anti-CD54 e isotípicos controles (Pharmingen – BD):** utilizados para marcação das moléculas de adesão;
- **Anticorpo anti-TSPO (Abcam):** utilizado para a marcação do TSPO;
- **Azul de Trypan (GIBCO):** corante utilizado para contagem celular;
- **DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Médium (GIBCO):** meio de cultura para células endoteliais;

- **EDTA (MERCK):** anticoagulante para coleta de sangue;
- **fMLP (N-Formyl-Met-Leu-Phe;SIGMA):** utilizado para estimular a expressão de moléculas de adesão;
- **Fungizone (GIBCO):** antifúngico para cultura de leucócitos;
- **Gentamicina (GIBCO):** antibiótico para cultura de células endoteliais;
- **Hepes (GIBCO):** tampão para meio de cultura de células;
- **Iodeto de propídeo (SIGMA):** fluorocromo utilizado como indicativo de morte celular (necrose);
- **Isopropanol ácido (0.04M HCl em isopropanol absoluto – LabSynth):** utilizado para solubilizar os cristais formados pelo amarelo de tetrazólio;
- **LPS – E26:B6 (SIGMA):** utilizado para estimular a expressão de moléculas de adesão;
- **NaCl 0,2% e 1,6% (SIGMA):** soluções utilizadas para romper as hemácias presentes nas amostras;
- **RPMI 1640 (GIBCO):** meio de cultura para leucócitos;
- **Soro bovino fetal (GIBCO):** utilizado como suplemento para enriquecer o meio de cultura celular;
- **Fura 3-AM (SIGMA):** utilizado para a marcação de cálcio intracelular

3.5 – Soluções

- **PBS (Phosphate buffered saline): solução estoque 10 x concentrada.**

Na ₂ PO ₄ .7H ₂ O	Sigma	26,70g
Na ₂ PO ₄ .H ₂ O	Sigma	4,14g
NaCl	Sigma	82,0g
H ₂ O deionizada		1000mL

- Soluções de lise**

- Salina 0.2%

NaCl	Sigma	2g
H ₂ O deionizada		100mL

- Salina 1,6%

NaCl	Sigma	1,6g
H ₂ O deionizada		100mL

- Solução Salina Balanceada de Hanks (Sol. Estoque, pH 7,4)**

NaCl	Sigma	8,12g
KCl	Sigma	0,4g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	Sigma	0,18g
KH ₂ PO ₄	Sigma	0,06g
NaHCO ₃	Sigma	0,25g
Glicose	Sigma	1g
H ₂ O deionizada		200mL

- Solução de Hanks**

Sol. Estoque		40mL
CaCl ₂	Sigma	28,8mg
MgSO ₄	Sigma	24,0mg
H ₂ O deionizada		200mL

- Solução de Krebs-HEPES**

NaCl	Sigma	3,5g
KCl	Sigma	178,8mg
KH ₂ PO ₄	Sigma	81,6mg
MgSO ₄	Sigma	72,25mg
CaCl ₂	Sigma	72,15mg
HEPES	Sigma	3g

H ₂ O deionizada		500mL
BSA	Sigma	0,1%

- **Solução de Ringer**

NaCl	Sigma	1,8g
KCl	Sigma	84mg
NaHCO ₃	Sigma	100mg
Glicose	Sigma	60mg
CaCl ₂	Sigma	60mg
Ac. Ascórbico	Sigma	3,25mg
H ₂ O deionizada		200mL

3.6 – Coleta do Lavado Peritoneal

Após tratamento *in vivo* dos animais com o RU 38 486 ou veículo, conforme método descrito no item 3.3, estes receberam 1 mL de uma solução de LPS 250 µg/mL, via i.p. Aguardou-se um período de 4 horas. Em seguida, os animais foram anestesiados e eutanasiados e, posteriormente, injetou-se 10 mL de PBS no peritônio. Essa solução foi coletada, centrifugada (10min, 4°C, 1500 rpm) e ressuspensa em 1 mL de PBS. Realizou-se a contagem total de leucócitos no lavado peritoneal.

3.7 – Obtenção de Diferentes Tipos Celulares

3.7.1 – Obtenção de Leucócitos Circulantes

Após os animais serem anestesiados com solução de ketamina/xilazina (0.2 g/kg:0.02 g/kg), foi realizada a punção da aorta abdominal para obtenção dos leucócitos circulantes. 200 µL de sangue foram pipetados e procedeu-se a lise hipotônica das hemácias, utilizando-se soluções salinas 0,2% e 1,6%. Logo após, foi realizada uma lavagem com PBS, seguida de centrifugação (10min, 4°C, 1500rpm).

3.7.2 – Obtenção de cultura primária de células endoteliais

A cultura de células endoteliais foi obtida a partir do músculo cremaster dos animais (CHEN et. al., 1995; LOTUFO et. al., 2006). Após anestesia dos animais, foi realizada uma incisão cirúrgica na bolsa escrotal para remoção do músculo cremaster. Em fluxo laminar, o tecido foi lavado com solução de PBS estéril e cortado em pequenos fragmentos. Dois fragmentos de tecido foram transferidos para cada poço de placa de cultura (24 poços) e após aderência foi adicionado meio de cultura (DMEM) estéril, contendo 20% de SFB (Soro Fetal Bovino) e gentamicina. Os fragmentos de tecido foram incubados por 48h em estufa de CO₂ (5%) em atmosfera úmida. A placa foi mantida em estufa até que as células atingissem confluência quantificada em microscópio invertido (Leica DMI 4000B), sendo o meio de cultura trocado a cada 48 horas. Após a confluência, as células foram repicadas em uma nova placa de (24 wells) para realização dos experimentos.

3.8 – Citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade, foi utilizado o amarelo de tetrazólio (MTT), o qual é reduzido por células metabolicamente ativas, em parte devido à ação de enzimas desidrogenases, gerando equivalentes reduzidos como o NADH e NADPH. O resultado intracelular, o composto roxo de formazan, é solubilizado e quantificado por espectrofotometria.

3.8.1 – Leucócitos e células endoteliais

Os leucócitos circulantes previamente obtidos foram ajustados para 1.0×10^6 células, e incubados com o diazepam ou seu veículo, nas diferentes concentrações, por 1 hora.

Em seguida, as células foram lavadas com RPMI, centrifugadas (10min, 4°C, 1200rpm) e ressuspensas em RPMI completo (10% SFB). Posteriormente, foram plaqueadas em triplicata em placas de 96 poços, e mantidas em estufa a 37° C, 5% de CO₂ por 15 horas. Após esse período de incubação, adicionou-se 10µL de MTT e as células foram incubadas por mais 3 horas a 37° C e 5% de CO₂. Após esse período, adicionou-se 100µL do

isopraonol ácido, permanecendo as células incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, fez-se a leitura em espectrofotômetro, 570nm.

As células endoteliais confluentes obtidas foram incubadas com o diazepam ou seu veículo, nas diferentes concentrações, por 1 hora. Em seguida, essas células foram lavadas com tampão PBS e incubadas com meio DMEM completo (20% SFB) em estufa a 37°C, 5% de CO₂ por 15 horas. Após o período de incubação, as células foram desprendidas da placa utilizando tripsina e transferidas para placas de 96 poços, em triplicata. Em seguida, adicionou-se 10 µL de MTT e as células foram incubadas por mais 3 horas a 37° C e 5% de CO₂. Após esse período, adicionou-se 100L do isopraonol ácido, permanecendo as células incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, fez-se a leitura em espectrofotômetro, 570nm.

3.9 – Citometria de Fluxo

Foi utilizado o aparelho *Scalibur Becton Dickinson Immunocytometry Systems*, San José, CA, USA. A transmissão ou a refração da luz pelas células foram captadas por meio de quatro detectores: *Side Scatter* (SSC) – tamanho das células; *Forward Scatter* (FSC) – complexidade celular; e os detectores de fluorescência FL1 (verde) e FL2 (vermelha). Estes sinais ópticos foram convertidos em sinais eletrônicos, permitindo sua leitura computadorizada (*Macintosh Apple*, CA, USA). pelo software *Cell Quest Pro* (Becton Dickinson Immunocytometry Systems). Os dados foram coletados por meio da análise de *gates*, sendo os resultados analisados pelo uso do programa *FlowJo* (*Treestar* – Versão 7.2.5 para Windows).

Esta técnica foi utilizada para a avaliação da viabilidade de neutrófilos, linfócitos e células endoteliais e para a avaliação da expressão das diferentes moléculas de adesão em leucócitos.

3.9.1 – Avaliação da Viabilidade Celular

Para verificar a apoptose e necrose das células, foi adaptado o modelo descrito por Navarro (2005). Assim, foram utilizados os fluorocromos PI-PE

(iodeto de propídeo conjugado com ficoeritrina), indicador de perda de seletividade de membrana e conseqüentemente, células inviáveis (necrose) e Anexina V-FITC, marcador específico de fosfatidilserina, proteína fisiologicamente expressa na parte intracelular da membrana que se torna externalizada quando se inicia o processo apoptótico mediado por caspases (BEHBAHANI *et al.*, 2005).

Devido à dupla marcação celular com os fluorocromos, foram obtidas quatro possíveis análises. As células duplo-negativas, ou seja, aquelas que não foram marcadas com nenhum dos fluorocromos, foram ditas como células viáveis; as células marcadas apenas com PI como células necróticas; as células marcadas apenas com Anexina V-FITC como células apoptóticas, e por fim, as células duplo-positivas, ou seja, aquelas marcadas tanto com PI quanto com Anexina V-FITC foram nomeadas células em apoptose tardia/necrose.

3.9.1.1 – Linfócitos, neutrófilos e células endoteliais

Os leucócitos circulantes previamente obtidos incubados com o diazepam ou seu veículo, nas diferentes concentrações, por 1 hora. Em seguida, essas células foram lavadas com RPMI, centrifugadas (10min, 4°C, 1200rpm) e ressuspensas em RPMI completo (10% SFB). Em triplicata, essas células foram plaqueadas, em placas de 96 poços, e mantidas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ por 18 horas. Após esse período de incubação, as células foram lavadas em tampão de ligação e incubadas com 100µL de Anexina (1:500) e 10µl de PI (50µg/mL) em temperatura ambiente e no escuro por 20 min. As células foram, então, lavadas e ressuspensas em tampão de ligação para posterior leitura em citômetro de fluxo.

Da mesma forma, as células confluentes obtidas foram incubadas com o diazepam ou seu veículo, nas diferentes concentrações, por 1 hora. Em seguida essas células foram lavadas com tampão PBS e incubadas com meio DMEM completo (20% SFB) em estufa a 37°C, 5% de CO₂ por 18 horas. Após o período de incubação, essas células foram desprendidas da placa utilizando Tripsina e, posteriormente, lavadas com tampão de ligação. Em seguida, as células foram incubadas com 100 µl de Anexina (1:500) e 10 µL de PI (50

µg/mL) em temperatura ambiente e no escuro por 20 min. As células foram, então, lavadas e ressuspensas em tampão de ligação para posterior leitura em citômetro de fluxo.

3.9.2 – Avaliação da Expressão de Moléculas de Adesão

Para avaliar a expressão das diferentes moléculas de adesão, foram utilizados anticorpos conjugados a fluorocromos. Foram avaliadas as expressões de L-selectina, β_2 -integrina, LFA-1, VLA-4, PECAM-1.

3.9.2.1 – Linfócitos e neutrófilos

Os leucócitos circulantes provenientes de animais tratados *in vivo* com o RU 38486 ou veículo, conforme item 3.3, foram incubados com o PK11195 e/ou Ro5-4864, conforme item 3.2, por 1h. Em seguida, essas células foram lavadas com solução de Hanks (0,1% BSA), centrifugadas (10min, 4°C, 1500rpm) e ressuspensas em Hanks (0,1% BSA). Em seguida, foram estimuladas ou não com fMLP (10^{-8}), por 1h, para a avaliação da expressão de L-selectina, β_2 -integrina e PECAM-1, ou estimuladas com LPS(100 ng/mL), por um período de 30min, seguido da estimulação com fMLP (10^{-8}), por 10 min, para a avaliação da expressão de VLA-4 e LFA-1. Após a estimulação, adicionou-se solução de Hanks (0,1% BSA) gelado, seguido de centrifugação (10min, 4°C, 1500rpm). As amostras foram, então, marcadas com os anticorpos anti-CD18, anti-CD62L, anti-CD49d, anti-CD11a e anti-CD31, por 20 min, a 4°C, no escuro. Em seguida, as amostras foram fixadas com solução de paraformaldeído 1% para posterior leitura em citômetro de fluxo.

3.9.3 – Avaliação da expressão de TSPO

Para avaliar a expressão de TSPO, foram utilizados o anticorpo primário policlonal anti-TSPO e o anticorpo secundário FITC-donkey anti-goat IgG (Abcam).

3.9.3.1 – Linfócitos, neutrófilos e células endoteliais

Os leucócitos circulantes provenientes de animais tratados *in vivo* com o RU 38486 ou veículo, conforme item 3.3, previamente obtidos, foram estimulados ou não com fMLP (10^{-8} M), por 1 hora. Após a estimulação, essas células foram lavadas com PBS e centrifugadas (10min, 4°C, 1500rpm). Em seguida, foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 15 minutos e permeabilizadas com 0,5% de Saponina por 10 minutos. Essas células foram, então, incubadas com 3% de BSA por 30 minutos para bloquear ligações inespecíficas dos anticorpos. Depois de lavadas, as células foram incubadas por 60 minutos à temperatura ambiente com o anticorpo anti-TSPO e, em seguida, incubadas com o anticorpo FITC anti-IgG. Após serem lavadas com PBS, procedeu-se a leitura em citômetro de fluxo.

As células endoteliais confluentes provenientes de animais tratados *in vivo* com o RU 38486 ou veículo, conforme item 3.3, previamente obtidos, foram estimulados ou não com LPS (1 µg/mL) por 2 horas. Após a estimulação, essas células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas (10min, 4°C, 1500rpm). Em seguida, foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 15 minutos e permeabilizadas com 0,5% de Saponina por 10 minutos. Essas células foram, então, incubadas com 3% de BSA por 30 minutos para bloquear ligações inespecíficas dos anticorpos. Depois de lavadas, as células foram incubadas por 60 minutos a temperatura ambiente com o anticorpo anti-TSPO e em seguida, incubadas com o anticorpo FITC anti-IgG. Após serem lavadas com PBS, procedeu-se a leitura em citômetro de fluxo.

3.10 – Avaliação da expressão de moléculas de adesão por Microscopia Confocal

As células endoteliais confluentes provenientes de animais tratados *in vivo* com o RU 38486 ou veículo, conforme item 3.3, foram incubadas com PK11195 e/ou Ro5-4864, conforme item 3.2, por 1h. Essas células foram lavadas com solução de PBS e, em seguida, estimuladas ou não com LPS (1 µg/mL) por 2h, para a avaliação da expressão de PECAM-1 e ICAM-1. Após a estimulação, as células foram lavadas com PBS e marcadas com os anticorpos

anti-CD31 e anti-CD54, por 20 min, a 4°C, no escuro. Em seguida, as amostras foram fixadas com solução de paraformaldeído 1% para posterior leitura. As leituras foram realizadas em microscópio confocal com a objetiva de imersão em óleo (40x).

3.11 – Microscopia Intravital

Para a avaliação da interação entre os leucócitos e o endotélio da parede vascular foi utilizada a técnica de microscopia intravital, onde foi possível avaliar a dinâmica dos eventos da microcirculação em animais vivos.

Os animais foram anestesiados com solução de ketamina/xilazina e, em seguida, foi feita uma incisão longitudinal na parede abdominal para exposição da microcirculação do mesentério que foi, então, transiluminado em microscópio. Os animais foram mantidos em placa de acrílico com temperatura controlada e o tecido foi mantido úmido pela irrigação com a solução de Ringer.

As imagens foram obtidas em microscópio óptico (Axioplan II, Carl-Zeiss equipado com x 5,0/0,30 Plan-neofluar ou x 10,0/0,25 Achromplan objetivas/abertura numérica e x 1,0, 1,25 ou 1,60 optovar) e as imagens foram capturadas em câmera de vídeo (ZVS, 3C75DE, Carl-Zeiss) e transmitidas simultaneamente ao computador. As imagens obtidas foram analisadas por software (AxionVision).

3.11.1 Quantificação de leucócitos “rollers” e aderidos em vênulas pós-capilares

Vênulas pós-capilares (20 – 30 µm de diâmetro) do mesentério foram selecionadas, sendo o número de leucócitos em comportamento *rolling* quantificados no período de 5 minutos e, logo após, fez-se a contagem dos aderidos à parede vascular. Os fármacos descritos no item 3.2 foram aplicados topicamente (10 µL) na microcirculação exposta, assim como o fMLP (10^{-8} M), para induzir uma resposta inflamatória. As quantificações foram realizadas em três intervalos consecutivos de 5 minutos.

Os leucócitos em movimento na periferia do fluxo sanguíneo, em contato com o endotélio, foram considerados em comportamento *rolling*. Essas células foram observadas individualmente e contadas a partir de sua passagem por um ponto fixo selecionado na vênula. Foram considerados leucócitos aderidos aqueles que permanecerem por mais de 1 minuto fixo à parede vascular durante o período de 5 minutos (DAHLEN et. al., 1981; FORTES et. al., 1991; FARSKY et. al., 1995; 2004).

3.12 – Avaliação da quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos

Para avaliar a quimiotaxia, os animais receberam 10 mL de Solução de glicogênio de ostra a 1%, via i.p. e aguardou-se um período de 4h para a coleta dos neutrófilos. As células foram coletadas por lavagem da cavidade abdominal com 20mL de PBS estéril e centrifugadas. Em seguida, foram incubadas com o veículo, PK11195 e/ou Ro5-4864 (100 nM), descritos no item 3.2, por 1 hora (37°C, 5% CO₂). Depois de lavadas, as células foram ressuspensas a uma concentração de 6×10^6 cells/mL em RPMI contendo 0.1% de BSA e 25 µL foram colocados no poço superior de uma placa de cultura (Neuroprobe ChemoTx-101-3™ 96-well). Como agente quimiotático 30 µL de fMLP 10^{-8} M foi adicionado ao poço inferior e incubado por 2 horas (37°C, 5% CO₂). Os neutrófilos migrados foram contados a partir da diluição em Solução de Turk, usando câmara de Neubauer.

3.13 – Avaliação do influxo de cálcio intracelular em neutrófilos por microscopia confocal

O influxo de íons cálcio em neutrófilos de ratos foi analisado por microscopia confocal. Os animais receberam 10 mL de solução de glicogênio de Ostra a 1%, via i.p. e aguardou-se um período de 4h para a coleta dos neutrófilos.

As células foram coletadas por lavagem da cavidade abdominal com 20mL de tampão Krebs-Hepes estéril e centrifugadas. Incubou-se 1×10^7 células/mL com o indicador de cálcio Fluo-3AM (10 µM) por 45 min, a temperatura ambiente. Após o período de incubação, as células foram lavadas

e ressuspensas com tampão Krebs-Hepes. Para cada experimento, 90 μ L de suspensão celular foram adicionados a uma placa de cultura com centro de vidro. As células foram analisadas em microscópio confocal usando objetiva de 63x. Adicionou-se ao disco o veículo (etanol 0.001%) ou os fármacos, PK11195 e/ou Ro5-4864 (100 nM), descritos no item 3.2 para obtenção das imagens. Em seguida, adicionou-se o fMLP (10^{-8} M) ou bradicinina e uma nova aquisição de imagens foi realizada. Os valores de 10 a 15 células por grupo experimental foram obtidos e a média $\pm$ SE da intensidade de fluorescência emitida por essas células foram, então, avaliadas por meio do programa LSM 510 (Zeiss). A análise foi feita com objetiva de imersão em água (63x), utilizando um laser argônio para excitação em 488 nm.

4.0 – Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste de Bartlett, para verificação de homocedasticidade. Os dados paramétricos foram previamente submetidos ao teste de Bonferroni e, a seguir, analisados através do teste “t” de Student ou através de uma análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas. Já os resultados não paramétricos foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney ou pelo teste de Kruskal-Wallis. Foram consideradas significantes as análises que apresentaram nível de significância $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

5.0 – RESULTADOS

5.1 – Efeitos do diazepam sobre a viabilidade de leucócitos periféricos e de células endoteliais primárias em cultura

Com o objetivo inicial de avaliar se a concentração do ligante de TSPO pudesse causar toxicidade nas células empregadas, leucócitos circulantes e células endoteliais provenientes de cultura primária foram incubados com o diazepam, nas concentrações de 10nM, 100nM e 100nM, e avaliados quanto a toxicidade e viabilidade, conforme descrito nos itens 3.8 e 3.9.1.

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que nenhum dos tratamentos empregados promoveu toxicidade tanto de leucócitos como de células endoteliais.

Tabela 1: Efeitos do diazepam, *in vitro*, sobre a toxicidade de leucócitos do sangue e de células endoteliais obtidas de cultura primária

	Basal	Diazepam			Etanol	
		10nM	100nM	1000nM	0,01%	0,001%
Leucócitos sangue periférico (Abs)	0.247 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.19 ± 0,03	0.16 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.20 ± 0.02
Células endoteliais (Abs)	0.293 ± 0.05	0.46 ± 0.10	0.34 ± 0,03	0.27 ± 0.04	0.19 ± 0.01	0.25 ± 0.02

Os valores representam média ± erro padrão da média de 3 animais.

Como mencionado, fez-se a avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo. Assim, a Figura 1 ilustra o citograma ilustrativo dos dados referentes a SSC (Side Scatter) e FSC (Forward Scatter) de leucócitos de sangue de ratos. Citogramas como este foram utilizados para análise individual das populações celulares, que foram previamente separadas pelo método de *sorting*, utilizado pelo FACSCALIBUR. Sendo assim, o citograma ilustrado na Figura 1 corresponde às populações de leucócitos periféricos e mostra, especificamente, a seleção das populações de interesse (neutrófilos e linfócitos) usadas nas análises por citometria de fluxo.

Figura 1 – Citograma de leucócitos circulantes de animal controle; R1= neutrófilos; R2= linfócitos; R3= monócitos

Os resultados apresentados na Tabela 2 e 3 mostram que nenhuma das concentrações de diazepam empregadas alterou a viabilidade, apoptose ou necrose, dos leucócitos periféricos.

Tabela 2: Efeitos do diazepam *in vitro* sobre a viabilidade de neutrófilos do sangue periférico

Parâmetro	Basal	Diazepam			Etanol	
		10nM	100nM	1000nM	0,01%	0,001%
Apoptose (%)	1.50 ± 0.50	2.94 ± 1.04	3.55 ± 1.67	2.90 ± 1.27	2.81 ± 1.27	3.26 ± 1.05
Necrose (%)	7.58 ± 2.03	8.08 ± 2.58	8.64 ± 2.47	9.74 ± 3.10	10.41 ± 2.57	10.64 ± 2.31
Apoptose tardia/Necrose (%)	3.04 ± 0.77	3.60 ± 1.05	5.93 ± 1.95	6.04 ± 3.03	7.02 ± 3.14	5.46 ± 1.62
Células Viáveis (%)	87.88 ± 1.50	84.67 ± 1.68	81.27 ± 3.25	77.15 ± 3.68	76.53 ± 4.89	79.40 ± 2.33

Os valores representam média ± erro padrão da média de 6 animais

Tabela 3: Efeitos do diazepam, *in vitro*, sobre a viabilidade de linfócitos do sangue periférico

Parâmetro	Basal	Diazepam			Etanol	
		10nM	100nM	1000nM	0,01%	0,001%
Apoptose (%)	1.01 ± 0.15	1.40 ± 0.34	1.41 ± 0.32	1.27 ± 0.29	1.78 ± 0.37	1.77 ± 0.42
Necrose (%)	2.07 ± 0.17	3.16 ± 0.36	3.26 ± 0.60	3.05 ± 0.63	3.36 ± 0.67	3.80 ± 0.79
Apoptose tardia/Necrose (%)	0.18 ± 0.02	0.37 ± 0.06	0.50 ± 0.12	0.53 ± 0.20	0.66 ± 0.20	0.72 ± 0.17
Células Viáveis (%)	95.74 ± 0.90	93.19 ± 1.36	93.97 ± 0.43	94.85 ± 0.36	93.78 ± 0.58	91.82 ± 1.95

Os valores representam média ± erro padrão da média de 6 animais

Com relação às células endoteliais, a Figura 2 ilustra o citograma ilustrativo do dado referente à SSC e FSC destas células. Citogramas como este foram utilizados para análise individual da população celular, que foi previamente separada pelo método de *sorting*, utilizado pelo FACSCALIBUR. Sendo assim, o citograma ilustrado na Figura 2 mostra a seleção da população de interesse usada para a realização das análises por citometria de fluxo.

Figura 2 – Citograma de células endoteliais de animal controle

A Tabela 4 mostra que os tratamentos *in vitro* com diazepam nas concentrações de 10nM, 100nM ou 1000nM não produziram qualquer tipo de alteração na viabilidade das células endoteliais.

Tabela 4: Efeitos do diazepam, *in vitro*, sobre a viabilidade de células endoteliais

Parâmetro	Basal	Diazepam			Etanol	
		10nM	100nM	1000nM	0,01%	0,001%
Apoptose (%)	1.58 ± 0.35	1.76 ± 0.61	1.85 ± 0.32	1.72 ± 0.35	2.08 ± 0.52	1.84 ± 0.22
Necrose (%)	1.22 ± 0.46	1.52 ± 0.31	1.04 ± 0.48	1.75 ± 0.70	1.50 ± 0.79	1.69 ± 0.17
Apoptose tardia/Necrose (%)	3.50 ± 2.00	6.42 ± 2.23	5.42 ± 1.14	6.43 ± 1.92	3.89 ± 1.63	3.99 ± 2.04
Células Viáveis (%)	93.45 ± 1.20	83.63 ± 6.64	91.68 ± 1.57	90.10 ± 3.07	92.53 ± 2.39	89.88 ± 2.49

Os valores representam média ± erro padrão da média de 6 animais

5.2 – Efeitos da administração *in vitro* dos ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864 sobre a interação leucócito-endotélio *in vivo*

O número de leucócitos *rollers* e aderidos em vênulas pós-capilares frente à aplicação tópica de PK 11195, Ro5-4864 ou veículo na presença ou

ausência de fMLP foram avaliados no leito mesentérico por microscopia intravital, conforme métodos descritos nos itens 3.11 e 3.11.1.

Os dados obtidos mostraram que a administração *in situ* dos ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, não foi capaz de alterar o *rolling* de leucócitos desses animais. Ainda, observou-se que nestes animais, o tratamento com fMLP reduziu o número de leucócitos *rolling* nos animais tratados *in situ* com o RPMI, etanol ou PK 11195, mas não em animais tratados com o Ro5-4864.

Figura 3 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre o comportamento *rolling* de leucócitos *in vivo*, após a aplicação tópica dos ligantes de TSPO e de fMLP sobre vênulas pós-capilares do leito mesentérico de ratos. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 3 animais em cada grupo. * $p < 0,05$ vs basal; ** $p < 0,01$ vs basal

Adicionalmente, a administração *in situ* dos ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, não foi capaz de alterar a adesão de leucócitos em animais controles. Ainda, a aplicação do fMLP promoveu o aumento na adesão nos animais tratados *in situ* com o RPMI, etanol e PK 11195, mas não em animais tratados com o Ro5-4864 (Fig. 4).

Figura 4 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a adesão de leucócitos *in vivo* após a aplicação tópica dos ligantes de TSPO e de fMLP sobre vênulas pós-capilares do leito mesentérico de ratos. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 3 animais. *** $p < 0.001$ vs basal

5.3 – Efeitos dos tratamentos com os ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, sobre a expressão de moléculas de adesão em neutrófilos e linfócitos

Leucócitos foram coletados do sangue circulante e tratadas *in vitro* com os ligantes de TSPO e estimuladas ou não pelo fMLP para avaliação da expressão da L-selectina em neutrófilos e linfócitos.

5.3.1 L-selectina

A administração *in vitro* dos ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, não foi capaz de alterar a expressão da L-selectina presente nos neutrófilos desses animais. Ainda, observou-se que nestas células a aplicação tópica de fMLP reduziu a expressão da L-selectina quando estas foram tratadas *in vitro* com o RPMI, etanol ou PK 11195. Entretanto, a administração *in vitro* do Ro5-4864 não reduziu a expressão desta molécula.

Figura 5 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de L-selectina em condições basais e na vigência de estimulação pelo fMLP em neutrófilos de ratos. As células foram submetidas aos tratamentos por 1 horas antes da estimulação pelo fMLP. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 8 animais e foram obtidos por citometria de fluxo. * $p < 0,05$ vs basal

Adicionalmente, a administração *in vitro* dos ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, não alterou a expressão da L-selectina em linfócitos. Ainda, observou-se que nestas células, o fMLP induziu clivagem equivalente da L-selectina após todos os tratamentos *in vitro*.

Figura 6 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de L-selectina em condições basais e na vigência de estimulação pelo fMLP em linfócitos de ratos. As células foram submetidas aos tratamentos por 1 horas antes da estimulação pelo fMLP. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 8 animais. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs basal

5.3.2 – β_2 -integrina

Os dados obtidos mostraram que a administração *in vitro* dos ligantes de TSPO, PK 11195 ou Ro5-4864 não alterou a expressão de β_2 -integrina em neutrófilos. Ainda, o tratamento com fMLP induziu expressão significativa e equivalente de β_2 -integrina em células submetidas aos tratamentos com meio de cultura (RPMI), etanol, PK11195 ou Ro5-4864 (Fig. 7).

Figura 7 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de β_2 -integrina em condições basais e na vigência de estimulação pelo fMLP em neutrófilos de ratos. As células foram submetidas aos tratamentos por 1 hora antes da estimulação pelo fMLP. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 8 animais. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs basal

Com relação aos linfócitos, a administração *in vitro* dos ligantes de TSPO, PK 11195 ou Ro5-4864, não alterou a expressão desta molécula em condições basais (dados não mostrados). É importante ressaltar que o estímulo utilizado para expressão desta molécula (fMLP) não foi eficiente em linfócitos, a despeito de modificações de concentrações e tempos de incubações (dados não mostrados).

5.3.3 – LFA-1

Os dados obtidos mostraram que a administração *in vitro* dos ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, não alterou a expressão de LFA-1 presente nos neutrófilos. Ainda, a aplicação do fMLP induziu a expressão da molécula

quando estas foram tratadas *in vitro* com o RPMI, etanol ou PK11195, porém o mesmo não foi observado nos animais tratados *in vitro* com o Ro5-4864 (Fig 8).

Figura 8 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de LFA-1 em condições basais e na vigência de estimulação pelo fMLP e LPS em neutrófilos de ratos. As células foram submetidas aos tratamentos por 1 hora antes da estimulação. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 8 animais. * $p < 0.05$; ** $p < 0,01$ vs basal.

Da mesma forma, o tratamento *in vitro* dos ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, não alterou a expressão de LFA-1 em linfócitos (dados não mostrados). É importante ressaltar que o estímulo utilizado para expressão desta molécula não foi eficiente em linfócitos, a despeito de modificações de concentrações e tempos de incubações (dados não mostrados).

5.3.4 – VLA-4

Os resultados apresentados na Figura 9 mostram que a administração *in vitro* dos ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, não alterou a expressão de VLA-4 em neutrófilos e, ainda, a aplicação de fMLP induziu a expressão da molécula em células submetidas aos tratamentos.

Figura 9 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de VLA-4 em condições basais e na vigência de estimulação pelo fMLP e LPS em neutrófilos de ratos. As células foram submetidas aos tratamentos por 1 hora antes da estimulação. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 8 animais. * $p < 0.05$; ** $p < 0,01$ vs basal.

Em linfócitos, a administração *in vitro* dos ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, não alterou a expressão de VLA-4 em animais controles (dados não mostrados). É importante ressaltar que o estímulo utilizado para expressão desta molécula não foi eficiente em linfócitos, a despeito de modificações de concentrações e tempos de incubações.

5.3.5 – PECAM-1

A análise da ação dos ligantes de TSPO sobre a expressão de PECAM-1 mostrou que o tratamento *in vitro* com os ligantes de TSPO, Ro5-4864, aumentou a expressão de PECAM-1 em neutrófilos. Ainda, após adição de fMLP, os neutrófilos apresentaram aumento significativo na expressão de PECAM-1 quando tratados, *in vitro*, com RPMI, etanol ou PK-11195, mas não quando tratados *in vitro* com o Ro5-4864 (Fig. 10).

Figura 10 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de PECAM-1 em condições basais e na vigência de estimulação pelo fMLP em neutrófilos de ratos. As células foram submetidas aos tratamentos por 1 hora antes da estimulação pelo fMLP.. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 8 animais. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs basal; ## $p < 0,01$ vs RPMI, etanol e PK 11195 basal

Em linfócitos, os dados obtidos mostraram que a administração *in vitro* dos ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, não alterou a expressão de PECAM-1. Após adição de fMLP, os linfócitos apresentaram aumento na expressão de PECAM-1, exceto quando foram tratados *in vitro* com o Ro5-4864 (Fig. 11).

Figura 11 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de VLA-4 em condições basais e na vigência de estimulação pelo fMLP em linfócitos de ratos. As células foram submetidas aos tratamentos por 1 hora antes da estimulação. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 8 animais. * $p < 0,05$ vs basal

5.4 – Efeitos do tratamento simultâneo com os ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, sobre a expressão de L-selectina e PECAM-1 em neutrófilos e linfócitos

Os dados obtidos mostraram que a co-administração *in vitro* dos ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, não alterou a expressão de L-selectina e de PECAM-1 em neutrófilos, em condições basais e nem alterou a redução e o aumento das expressões de L-selectina e PECAM-1, respectivamente, provocadas pela ação do fMLP (Fig. 12 e 13). Vale ressaltar que a co-administração dos ligantes reverteu os efeitos do tratamento com o Ro5-4864 sobre a expressão de L-selectina e de PECAM-1 na vigência de estimulação pelo fMLP. Como já mostrado nas figuras 5 e 10, o tratamento com Ro5-4864 inibiu a redução da expressão de L-selectina e o aumento de expressão de PECAM-1 na vigência de estimulação pelo fMLP e, na Figura 12 e 13 está mostrado que a adição de PK11195 neste sistema reverteu a ação do Ro5-4864. O mesmo efeito sobre a PECAM-1 foi observado em linfócitos, ou seja a co-incubação das células com Ro5-4864 e Pk11195, reverteu o bloqueio exercido pelo Ro5-4864 (Figura 11) sobre a expressão de PECAM-1 sob ação de fMLP (Figura 13).

Figura 12 – Efeitos da co-administração dos ligantes de TSPO sobre a expressão de L-selectina em neutrófilos. As células obtidas foram incubadas *in vitro* com etanol (0,001%) ou PK 11195 + Ro5-4864 (100nM, cada) por 1 hora e em seguida estimuladas pelo fMLP. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de células obtidas de 4 animais e foram obtidos por citometria de fluxo. * $p < 0,05$ vs respectivo basal

Figura 13 – Efeitos da co-administração dos ligantes de TSPO sobre a expressão de PECAM-1 em neutrófilos e linfócitos. As células obtidas foram incubadas *in vitro* com etanol (0,001%) ou PK 11195 + Ro5-4864 (100nM, cada) por 1 hora e em seguida estimuladas pelo fMLP. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de células obtidas de 4 animais e foram obtidos por citometria de fluxo. * $p < 0,05$ vs respectivo basal

5.5 – Expressão de TSPO em neutrófilos e linfócitos

Os dados apresentados na figura 14 foram obtidos para mostrar a densidade intracelular de TSPO em neutrófilos e linfócitos. Os valores encontrados mostram que a densidade de receptores em neutrófilos é maior que em linfócitos. E, ainda, estes valores aumentam em neutrófilos estimulados pelo fMLP.

Figura 14 – Expressão de TSPO em neutrófilos e linfócitos, em condições basais ou estimuladas por fMLP (10^{-8} M) por 1 hora. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 3 animais e foram obtidos por citometria de fluxo. ** $p < 0,01$ vs respectivo basal; ## $p < 0,01$ vs neutrófilo basal

5.6 – Efeitos dos ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, sobre a quimiotaxia de neutrófilos

A ação dos ligantes de TSPO sobre a quimiotaxia de neutrófilos foi avaliada no modelo de câmara de Boyden modificada frente ao fMLP (10^{-8} M). Os dados obtidos e apresentados na figura 15 mostram que o tratamento de neutrófilos com o Ro5-4864 diminuiu, enquanto que o tratamento com o PK11195 aumentou a quimiotaxia destas células frente ao fMLP. Já a incubação simultânea com os dois ligantes, Ro5-4864 + PK 11195, aumentou a quimiotaxia dos neutrófilos frente ao fMLP, revertendo, assim, os efeitos observados com o tratamento com o Ro5-4864.

Figura 15 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a quimiotaxia de neutrófilos estimulados por fMLP (10^{-8} M). Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de células coletadas de 5 animais. ** $p < 0,01$ vs etanol 0,001%; --- indica valores basais

5.7 – Efeitos da administração dos ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, sobre a concentração de cálcio intracelular em neutrófilos

Considerando os dados obtidos no ensaio de quimiotaxia e, ainda, sabendo que esta é dependente de elevações nas concentrações de cálcio intracelular (HUANG et. al., 1993; NIGGLI, 2003), tornou-se relevante avaliar a ação dos ligantes de TSPO sobre a mobilização de cálcio intracelular. Os dados obtidos e apresentados na figura 16 mostram que a administração *in vitro* com os ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, não alterou o influxo de cálcio em condições basais. No entanto, após a estimulação com fMLP (10^{-8} M),

observou-se aumento no influxo de cálcio em células tratadas com etanol. Este aumento não foi observado em células tratadas *in vitro* com Ro5-4864, mas foi exacerbado em células tratadas *in vitro* com PK 11195. O co-tratamento com Ro5-4864 + PK 11195 reverteu as alterações observadas com os tratamentos isolados e os valores obtidos foram equivalentes ao grupo de células com etanol (Fig. 16 e 17)

Figura 16 – Efeitos da administração dos ligantes de TSPO sobre os níveis cálcio intracelular em condições basais e estimulados por fMLP . As células obtidas foram incubadas com Fluo3-AM, em seguida incubadas *in vitro* com etanol (0,001%) ou PK 11195 e/ou Ro5-4864 (100nM, cada) e estimuladas ou não com fMLP (10^{-8} M). Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de células coletadas de 4 animais e foram obtidas por microscopia confocal..

A Figura 17 mostra a curva referente à concentração de cálcio após a administração *in vitro* dos ligantes de TSPO, PK 11195 e/ou Ro5-4864. A administração *in vitro* dos ligantes de TSPO não alterou o tempo de resposta do fMLP. Vale ressaltar que, como mencionado anteriormente, a administração do Ro5-4864 reduziu a concentração de cálcio intracelular na vigência de ação do fMLP. A Tabela 5 mostra os resultados obtidos das curvas obtidas. A resposta máxima e a AUC foram aumentadas em células tratadas com Pk11195 e todos os parâmetros analisados foram reduzidos em células tratadas com Ro5-4864.

Figura 17 – Efeitos da administração dos ligantes de TSPO sobre os níveis de cálcio intracelular em condições basais e estimulados por fMLP. A figura mostra a curva tempo-resposta e os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de células coletadas de 4 animais. Os dados foram obtidos por microscopia confocal.

Tabela 5: Efeitos da administração dos ligantes de TSPO sobre os níveis de cálcio intracelular em neutrófilos após a estimulação *in vitro* com fMLP

Parâmetro	Etanol	PK11195	Ro5-4864	PK11195 + Ro5-4864
Tempo resposta (seg)	134.4 ± 1.64	144.1 ± 11.68	41.20 ± 41.20**	131.7 ± 3.28
Resposta máx (%)	100 ± 0	248.7 ± 38.71*	2.54 ± 2.50*	110.6 ± 45.35
AUC (%)	3799.0 ± 335.4	13190.0 ± 4230**	10.05 ± 10.01**	2470.0 ± 957.3
Decaimento (%)	-1.45 ± 0.08	-1.99 ± 1.55	-4109 ± 8.00***	-5.40 ± 2.44

Os valores representam média ± erro padrão da média de células obtidas de 4 animais. *p<0.05;

p<0.001; *p<0.001 vs demais grupos. AUC= área sob a curva.

Com o intuito de investigar se os efeitos dos ligantes de TSPO alteravam a concentração de cálcio intracelular provocada por estímulo distinto do fMLP, a mobilização de cálcio foi provocado pela incubação das células com bradicinina. O tratamento *in vitro* dos ligantes de TSPO, PK11195 e/ou Ro5-4864, não alteraram a concentração cálcio intracelular em neutrófilos em condições basais. Após a estimulação *in vitro* com bradicinina observou-se aumento na concentração de íons em células tratadas com etanol ou com PK111195, porém este aumento não foi observado em células tratadas com o Ro5-4864. O co-tratamento das células com ambos os ligantes restaurou os níveis de cálcio intracelular a valores semelhantes aos observados em células tratadas com o etanol.

A Tabela 6 mostra os resultados referentes aos efeitos dos ligantes de TSPO sobre a concentração de cálcio intracelular após estimulação com bradicinina. Somente em células tratadas com Ro5-4864 houve redução da AUC, resposta máxima e tempo de decaimento.

Tabela 6: Efeitos da administração dos ligantes de TSPO sobre os níveis de cálcio intracelular em neutrófilos após a estimulação *in vitro* com bradicinina

Parâmetro	Etanol	PK11195	Ro5-4864	PK11195 + Ro5-4864
Tempo resposta (seg)	144.0 $\pm$ 4.96	137.4 $\pm$ 5.44	78.33 $\pm$ 45.27	153.5 $\pm$ 1.31
Resposta máx (%)	100 $\pm$ 0	74.53 $\pm$ 18.75	11.96 $\pm$ 6.91*	58.92 $\pm$ 25.34
AUC (%)	2110.0 $\pm$ 303.0	916.2 $\pm$ 252.0	432.7 $\pm$ 250.7*	988.7 $\pm$ 554.4
Decaimento (%)	-0.5 $\pm$ 0.05	-1.1 $\pm$ 0.27	-6.1 $\pm$ 2.10*	-0.96 $\pm$ 0.40

Os valores representam média $\pm$ erro padrão da média de 4 animais. * $p < 0.05$ vs demais grupos.

5.8 – Expressão de TSPO em cultura primária de célula endotelial

Foram utilizadas células em cultura provenientes da microcirculação do músculo cremaster de ratos. Após atingirem confluência, estas células foram estimuladas com LPS (1µg/mL) por 2 horas, sendo posteriormente avaliadas quanto à expressão de TSPO por citometria de fluxo.

Os resultados obtidos mostraram que as células endoteliais expressam estes receptores e ainda, estes são super expressos na vigência de estimulação pelo LPS (Fig. 19).

Figura 19 – Expressão de TSPO em cultura primária de célula endotelial de ratos em cultura, em condições basais ou estimuladas por LPS (1µg/mL) por 2 horas. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 6 animais e foram obtidos em citometria de fluxo. * $p < 0,05$ vs respectivo basal

5.9 – Efeitos do tratamento com os ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, sobre a expressão de PECAM-1 e ICAM-1 em cultura primária de célula endotelial

Após atingirem confluência, as células endoteliais foram tratadas com os ligantes de TSPO e estimuladas ou não pelo LPS para avaliação da expressão de PECAM-1 e ICAM-1.

Os dados obtidos mostraram que o tratamento com os ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, não alterou a expressão de PECAM-1 ou ICAM-

1 na célula endotelial. Ainda, nestas células o LPS aumentou a expressão de PECAM-1 e ICAM-1 quando estas foram tratadas *in vitro* com o etanol, Ro5-4864 ou PK11195 (Fig. 20).

Figura 20 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de PECAM-1 e ICAM-1 em cultura primária de célula endotelial em condições basais ou estimuladas por LPS (1µg/mL). Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de células obtidas de 3 animais e foram obtidos por microscopia confocal. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs basal.

A co-administração *in vitro* dos ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, não alterou a expressão destas moléculas de adesão em condições basais. Após a estimulação *in vitro* pelo LPS, houve aumento na expressão destas moléculas tanto em células tratadas *in vitro* com etanol quanto nas tratadas *in vitro* com Ro5-4864 + PK11195 (Fig. 21).

Figura 21 – Efeitos da co-administração dos ligantes de TSPO sobre a expressão de PECAM-1 e ICAM-1 em célula endotelial em cultura primária. As células obtidas foram incubadas *in vitro* com etanol (0,001%) ou PK 11195 + Ro5-4864 (100nM, cada) por 1 hora e em seguida estimuladas pelo LPS(1µg/mL) por 2 horas. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de células obtidas de 3 animais. * $p < 0,05$ vs respectivo basal

A literatura tem sugerido uma interrelação dos TSPO e glicocorticóides endógenos, uma vez que o TSPO é responsável pelo transporte de colesterol mitocondrial para síntese de hormônios esteroidais (PAPADOPOULOS et. al., 2006), e que os efeito modulador do ligante de TSPO do tipo benzodiazepínico (diazepam) sobre a resposta inflamatória é dependente, pelo menos em parte, da secreção de glicocorticóides (LAZARINI et. al., 2010). Desta forma, o trabalho passou a ser conduzido para avaliar a possível existência da uma correlação entre os receptores citosólico de GE e TSPO nos parâmetros avaliados neste trabalho. Para esta investigação, os leucócitos circulantes empregados foram provenientes de animais tratados com o antagonista de receptor de glicocorticóides, o RU 38486.

5.10 – Eficácia do tratamento *in vivo* com o RU 38 486 no bloqueio do receptor citoplasmático.

Com o intuito inicial de investigar se o tratamento com RU 38486 delineado neste trabalho estava bloqueando o receptor citoplasmático para GE, foi avaliada a migração de neutrófilos para o foco de inflamação. A literatura é muito evidente quanto à exacerbação deste efeito na vigência de tratamento com RU 38486 (FARSKY et. al., 1995; LEECH et. al., 1998; LIGEIRO DE OLIVEIRA et. al., 2004; LAZARINI et. al., 2010).

Os animais do grupo RU receberam o RU 38486 10 mg/kg por via i.p. 18h e 1h antes do experimento, enquanto os animais do grupo controle receberam da mesma forma 1 mL/kg do veículo. Os animais do grupo basal não receberam nenhum tratamento. Após a última administração do veículo ou do RU, os animais receberam 1 mL de solução de LPS (250 µg/mL), via i.p. O número de células migradas para cavidade abdominal foi quantificada 4 horas mais tarde.

Os resultados obtidos mostram que o número de leucócitos foi maior em animais tratados com RU 38486 em relação aos animais tratados com o veículo do RU 38486 e submetidos à peritonite (Fig. 22). A análise diferencial destas

células mostrou que o tratamento com RU 38486 provocou aumento acentuado no número de células polimorfonucleares e redução no número de células mononucleares quando comparados com os animais que receberam apenas o veículo do RU 38486.

Figura 22 – Efeito do tratamento *in vivo* com o RU 38486 (18 e 2 h antes dos ensaios; 10mg/kg, via i.p.) sobre o influxo de leucócitos para cavidade peritoneal induzido pela injeção local de LPS. Os dados representam as médias $\pm$ erro padrão da média de células migradas para o peritônio de 3 animais 4 horas após a injeção do LPS. . *p<0,05 vs LPS; ---- indica os valores basais no peritônio.

5.11 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a interação leucócito-endotélio *in vivo* na vigência de tratamento com RU 38486

É importante salientar que o bloqueio de receptor de GE *in vivo* causa aumento nas interações leucócito-endotélio, visualizados pelo aumento do número de leucócitos rollers e aderidos a vênulas pós-capilares (FARSKY et. al., 1995). Os dados obtidos neste estudo corroboraram a literatura, pois mostraram que o tratamento com RU elevou significativamente o número de

leucócitos rollers (fig. 23) e aderidos (fig. 24) quando estes foram comparados com valores obtidos em animais tratados com veículo do RU 38486.

Os tratamentos com o veículo dos TSPO (etanol) e com PK11195 não alteraram este perfil de resposta. No entanto, o tratamento com Ro5-4864 reduziu os valores de leucócitos “rollers” (fig. 23) e aderidos (fig. 24). O número de leucócitos rollers reverteu para valores semelhantes aos animais não tratados com RU 38486 e o número de leucócitos aderidos foi muito menor que o observado em animais controles.

Na vigência de estimulação pelo fMLP, todos os grupos de animais apresentaram diminuição no número de leucócitos *rolling* quando comparados com o basal (Fig. 23). É importante salientar que o grupo de animais tratados com Ro5-4864 apresentava valores menores de leucócitos rolling antes da aplicação do fMLP. A estimulação da rede microvascular com fMLP aumentou significativamente o número de leucócitos aderidos em todos os grupos de animais estudados, exceto no grupo de animais tratados com Ro5-4864. Nestes animais, o número de leucócitos aderidos ao endotélio foi similar ao valor encontrado antes da aplicação do fMLP (Fig. 24).

Figura 23 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a interação leucócito-endotélio na vigência de tratamento com RU 38486. O RU 38486 ou veículo foram administrados por via i.p, 18 e 1 hora antes da aplicação tópica dos ligantes de TSPO e de fMLP sobre vênulas pós-capilares do leito mesentérico de ratos. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 3 animais em cada grupo. * $p < 0,05$ vs basal; ** $p < 0,01$ vs basal ou respectivo veículo; *** $p < 0,01$ vs basal ou respectivo veículo; ### $p < 0,01$ vs RU+RPMI, RU+etanol e RU+PK11195.

Figura 24 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a interação leucócito-endotélio na vigência de tratamento com RU 38486. O RU 38486 ou veículo foram administrados por via i.p., 18 e 1 hora antes da aplicação tópica dos ligantes de TSPO e de fMLP sobre vênulas pós-capilares do leito mesentérico de ratos. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 3 animais em cada grupo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs basal ou respectivo veículo; *** $p < 0.01$ vs basal ou respectivo veículo # $p < 0.05$

5.12 – Efeitos dos ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, sobre a expressão de moléculas de adesão em leucócitos na vigência de tratamento com RU 38486

Os leucócitos circulantes foram coletados dos animais tratados com RU 38486 e estimulados com os ligantes de TSPO para se avaliar a expressão das moléculas de adesão em condições de estimulação ou não pelo fMLP

5.12.1 – L-selectina

Os dados da literatura mostram que a ausência de GE ou de sua ação pelo bloqueio de receptor citosólico eleva a expressão de L-selectina em neutrófilos circulantes (CAVALCANTI et. al., 2006; 2007). Este mesmo perfil de resposta foi observado neste estudo em animais tratados com os veículos RPMI ou etanol (fig. 25). No entanto, em animais tratados com os ligantes de TSPO, PK 11195 ou Ro5-4864, não se observou aumento na expressão de L-selectina. Nestes animais, os valores foram semelhantes aos encontrados em animais controles, sem bloqueio da ação dos receptores de GE. A aplicação de fMLP reduziu a expressão de L-selectina presente nos neutrófilos tratados com os veículos. Entretanto, esta redução não foi observada em neutrófilos tratados *in vitro* com os ligantes de TSPO (fig. 25).

Figura 25 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de L-selectina presente em neutrófilos na vigência de tratamento com RU 38486. O RU 38486 ou veículo foram administrados por via i.p., 18 e 1 hora antes da administração *in vitro* dos ligantes de TSPO e de fMLP. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 8 animais. * $p<0,05$; ** $p<0,01$

Em linfócitos, o tratamento *in vivo* com o RU 38486 não alterou a expressão da L-selectina após a administração *in vitro* do RPMI, do etanol ou do PK 11195. Porém, após a administração *in vitro* do Ro5-4864 houve diminuição na expressão desta molécula.

A estimulação das células com o fMLP provocou redução na expressão de L-selectina em células submetidas aos tratamentos com os veículos e com os ligantes de TSPO (Fig 26).

Figura 26 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de L-selectina presente em linfócitos na vigência de tratamento com RU 38486. O RU 38486 ou veículo foram administrados por via i.p., 18 e 1 hora antes da administração *in vitro* dos ligantes de TSPO e de fMLP. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 8 animais. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ vs basal ou respectivo veículo; # $p<0,05$ vs RU+ RPMI, RU + etanol e RU + PK11195.

5.12.2 – β_2 -integrina

A literatura é controversa quanto a ação dos GE sobre a expressão de β_2 -integrina (BURTON et. al., 1995; FILEP et. al., 1997). Os resultados apresentados na figura 27 mostram que o tratamento *in vivo* com o RU 38486 diminuiu a expressão de β_2 -integrina e que este perfil de resposta se manteve após os tratamentos com os veículos ou ligantes de TSPO. Ainda, a adição de fMLP induziu expressão significativa da molécula nas células submetidas aos tratamentos empregados.

Figura 27 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de β_2 -integrina presente em neutrófilos na vigência de tratamento com RU 38486. O RU 38486 ou veículo foram administrados por via i.p., 18 e 1 hora antes da administração *in vitro* dos ligantes de TSPO e de. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 8 animais. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs basal ou respectivo veículo.

Diferentemente do observado em neutrófilos, linfócitos coletados de animais tratados com RU 38486 apresentaram expressão de β_2 -integrina semelhante à observada em células provenientes de animais controles, tratados com o veículo do RU 38486. No entanto, o tratamento com Ro5-4864 reduziu a expressão desta molécula em linfócitos obtidos de animais tratados com RU 38486 (Fig. 28). É importante ressaltar que o estímulo utilizado para induzir a expressão desta molécula (fMLP) não foi eficiente em linfócitos, a despeito de modificações de concentrações e tempos de incubações. Desta forma, estão apresentados somente os dados obtidos em condições basais.

Figura 28 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de β_2 -integrina presente em linfócitos na vigência de tratamento com RU 38486. O RU 38486 ou veículo foram administrados por via i.p, 18 e 1 hora antes da administração *in vitro* dos ligantes de TSPO e de fMLP. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 8 animais. ** $p < 0,01$; vs respectivo veículo; # $p < 0.05$ vs RU+RPMI

5.12.3 – LFA-1

A administração *in vivo* de RU 38486 não alterou a expressão de LFA-1 em neutrófilos. Da mesma forma, o tratamento com os ligantes de TSPO também não alterou a expressão da molécula. Ainda, após adição do fMLP, estas células apresentaram aumento equivalente na expressão de LFA-1 em células submetidas aos tratamentos com veículos ou ligantes ao TSPO (Fig. 29).

Figura 29 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de LFA-1 presente em neutrófilos na vigência de tratamento com RU 38486. O RU 38486 ou veículo foram administrados por via i.p, 18 e 1 hora antes da administração *in vitro* dos ligantes de TSPO e de fMLP. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 8 animais. * $p < 0.05$ vs basal.

Ainda, linfócitos coletados de animais tratados com o RU 38486 apresentaram redução na expressão de LFA-1 e ainda, os tratamentos com os ligantes de TSPO não alterou este perfil de resposta (Fig. 30). É importante ressaltar que o estímulo utilizado para aumentar a expressão desta molécula (fMLP) não foi eficiente em linfócitos, a despeito de modificações de concentrações e tempos de incubações. Desta forma, estão apresentados somente os dados obtidos em condições basais.

Figura 30 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de LFA-1 presente em linfócitos na vigência de tratamento com RU 38486. O RU 38486 ou veículo foram administrados por via i.p, 18 e 1 hora antes da administração *in vitro* dos ligantes de TSPO e de fMLP. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 8 animais. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs respectivo veículo

5.12.4 – VLA-4

Os dados obtidos mostraram que o tratamento *in vivo* com o RU 38486 não alterou a expressão da VLA-4 presente em neutrófilo, e que os tratamentos com os ligantes com TSPO não afetou este perfil de resposta. Ainda, a adição de fMLP induziu a expressão da molécula nestas células após todos os tratamentos *in vitro* (Fig. 31).

Figura 31 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de VLA-4 presente em neutrófilos na vigência de tratamento com RU 38486. O RU 38486 ou veículo foram administrados por via i.p, 18 e 1 hora antes da administração *in vitro* dos ligantes de TSPO e de fMLP. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 8 animais. * $p<0.05$; *** $p<0.001$ vs basal.

O tratamento *in vivo* com o RU 38486 não alterou a expressão da VLA-4 em linfócitos. Da mesma forma, os tratamentos *in vitro* com os ligantes de TSPO também não afetou a expressão desta molécula (Fig. 32). É importante ressaltar que o estímulo utilizado para induzir a expressão desta molécula (fMLP) não foi eficiente em linfócitos, a despeito de modificações de concentrações e tempos de incubações. Desta forma, estão apresentados somente os dados obtidos em condições basais.

Figura 32 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de VLA-4 presente em linfócitos na vigência de tratamento com RU 38486. O RU 38486 ou veículo foram administrados por via i.p, 18 e 1 hora antes da administração *in vitro* dos ligantes de TSPO e de fMLP. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 8 animais.

5.12.5 – PECAM-1

Os dados obtidos e apresentados na Figura 33 mostraram que o tratamento *in vivo* com o RU 38486 aumentou a expressão da PECAM-1 presente em neutrófilos, e que os tratamentos com veículo ou com PK11195 não afetaram este aumento de expressão da molécula. Diferentemente, o tratamento com Ro5-4864 inibiu o aumento na expressão da molécula. Após adição de fMLP, observou-se aumento na expressão em todos os grupos de células, exceto nas tratadas Ro5-4864 (Fig. 33).

Figura 33 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de PECAM-1 presente em neutrófilos na vigência de tratamento com RU 38486. O RU 38486 ou veículo foram administrados por via i.p, 18 e 1 hora antes da administração *in vitro* dos ligantes de TSPO e de fMLP. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 8 animais. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs respectivo basal ou veículo; ## $p < 0,01$ vs Veic+RPMI, Veic+eta e Veic+PK.

Diferentemente do observado em neutrófilos, o tratamento *in vivo* com RU 38486 não alterou a expressão de PECAM-1 e, da mesma forma, os tratamentos com os veículos ou ligantes de TSPO não modificaram a expressão de PECAM-1. Na vigência de estimulação pelo fMLP, detectou-se aumento na expressão de PECAM-1 em todos os grupos de células, exceto nas tratadas com o Ro5-4864 (Fig. 34).

Figura 34 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de PECAM-1 presente em linfócitos na vigência de tratamento com RU 38486. O RU 38486 ou veículo foram administrados por via i.p, 18 e 1 hora antes da administração *in vitro* dos ligantes de TSPO e de fMLP. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 8 animais. * $p < 0,05$ vs respectivo basal

5.13 – Efeitos do tratamento com RU 38486 sobre a expressão de TSPO em neutrófilos e linfócitos após a estimulação por fMLP

A figura 35 mostra que o tratamento *in vivo* com o RU 38486 diminuiu a expressão de TSPO presentes em neutrófilos e em linfócitos. Ainda, neutrófilos provenientes de animais tratados *in vivo* com o RU 38486 apresentam maior densidade de TSPO quando comparados aos linfócitos.

Figura 35 – Participação do receptor de GC sobre a expressão de TSPO em neutrófilos e linfócitos. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 3 animais. * $p < 0,01$ vs respectivo veículo; ### $p < 0,001$ vs neutrófilos+RU

5.14 Efeitos do tratamento com RU 38486 sobre a expressão de TSPO em célula endotelial em cultura primária

Os dados obtidos mostraram que a administração *in vivo* com o RU 38486 não alterou a densidade de receptores TSPO presentes em células endoteliais em cultura primária na vigência de estimulação pelo LPS (Fig. 36).

Figura 36 – Participação do receptor de GC sobre a expressão de TSPO em cultura primária de célula endotelial. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 6 animais.

5.15 – Efeitos dos ligantes de TSPO, PK 11195 e Ro5-4864, sobre a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais após tratamento com RU 38486

A avaliação da ação dos TSPO sobre a expressão das moléculas de adesão endotelial na vigência de bloqueio do receptor de GE foi realizada em cultura primária de células endoteliais da rede microcirculatória de ratos tratados com RU 38486 após estimulação pelo LPS. Neste caso, os ligantes de TSPO foram incubados com as culturas celulares por 1 hora e em seguida foram estimuladas pelo LPS por 2 horas.

5.15.1 – PECAM-1

Os dados obtidos mostraram que a administração *in vivo* de RU 38486 não alterou a expressão de PECAM-1 presente nas células endoteliais e que os ligantes de TSPO não induzem efeito sobre a expressão desta molécula. A estimulação com LPS não alterou a expressão de PECAM-1 nestas células e os ligantes de TSPO também não afetaram esta expressão (Fig.37).

Figura 37 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de PECAM-1 presente em célula endotelial em cultura primária na vigência de tratamento com RU 38486. O RU 38486 ou veículo foram administrados por via i.p, 18 e 1 hora antes da administração *in vitro* dos ligantes de TSPO e de LPS. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 3 animais.

5.15.2 – VCAM-1

Os dados apresentados na Figura 38 mostram que a administração *in vivo* de RU 38486 também não alterou a expressão de ICAM-1 presente em células endoteliais e que os ligantes de TSPO não foram capazes de alterar esta expressão. Adicionalmente, a estimulação com LPS não alterou a expressão da molécula nestas células, que também não foi modificada pela ação dos TSPO (Fig.38).

Figura 38 – Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a expressão de ICAM-1 presente em célula endotelial em cultura primária na vigência de tratamento com RU 38486. O RU 38486 ou veículo foram administrados por via i.p, 18 e 1 hora antes da administração *in vitro* dos ligantes de TSPO e de LPS. Os dados representam os valores de médias $\pm$ erro padrão da média de 3 animais.

6.0 – DISCUSSÃO

A relação entre os BZD e a resposta inflamatória tem sido estabelecida há longo período de tempo. Mais recentemente, as investigações tornaram-se mais aprofundadas com a identificação da expressão dos TSPO em células do SNC e periféricas, e seu envolvimento na modulação da resposta inflamatória. Assim, a literatura tem mostrado a participação dos TSPO na gênese de diversas doenças de origem inflamatória e câncer, sendo que a densidade de expressão do receptor está relacionada com o grau de inflamação e malignidade tumoral (MAASER et. al., 2005; CHEN;GUILARTE, 2006; 2008; PAPADOPOULOS et. al., 2006; VLODAVSKY; SOUSTIEL, 2007; SCARF;KASSIOU, 2011; ZHENG et. al., 2011). No entanto, os mecanismos envolvidos nestas ações ainda não estão estabelecidos e os dados, embora que ainda fragmentários, sugerem a participação dos GE nestes efeitos. Abordando este tema, os resultados apresentados neste trabalho mostram a seletividade de ações de ligantes de TSPO da classe dos benzodiazepínicos e de isoquinolona carboxamida sobre os mecanismos celulares da migração leucocitária para o foco de inflamação. Adicionalmente, os dados apresentados mostram a correlação entre os TSPO e receptores citosólicos de glicocorticóides na modulação da interação leucócito-endotélio.

Dentre as diversas técnicas estabelecidas para estudar o tráfego de leucócitos, a observação direta por microscopia intravital é uma das mais empregadas, pois a técnica permite acompanhar o comportamento migratório celular *in vivo*, pela mensuração das interações das células circulantes com a parede de vasos da microcirculação e sua migração no interstício, em condições basais e de inflamação (HALIN et. al., 2005). O recrutamento de leucócitos é um processo dinâmico e a etapa inicial do processo, que envolve a interação dos leucócitos circulantes ao endotélio de vênulas pós-capilares, mediada pela expressão de moléculas de adesão, deve ser um mecanismo efetivo. Assim, prejuízos nestes eventos comprometem a evolução da resposta inflamatória e a interferência farmacológica nos mesmos tem sido alvo de investigação da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de anti-inflamatórios mais seletivos (GOBBETTI et. al., 2011; KITAGAKI et. al., 2011; NI et. al., 2011).

A literatura cita apenas um único estudo que relata o papel de ligantes de TSPO sobre a interação leucócito-endotélio. Em modelo de inflamação induzida pela carragenina, o tratamento *in vivo* com diazepam diminuiu o número de leucócitos *rolling* e o número de células migradas para o tecido extravascular no leito mesentérico (LAZZARINI et. al., 2010). Os dados apresentados no presente trabalho corroboram a modulação dos ligantes benzodiazepínicos na interação leucócito-endotélio, uma vez que, a aplicação tópica um outro ligante de TSPO da classe dos benzodiazepínicos, o Ro5-4864, sobre o leito mesentérico impediu a diminuição do número de leucócitos *rolling* e o consequente aumento de células aderentes à parede vascular causados pela estimulação com agente flogístico, que neste caso foi o agonista de receptor ligado à proteína G (GPCR), o fMLP. É importante salientar que com o desenvolvimento da resposta inflamatória, existe correlação inversa entre o número de leucócitos *rolling* e aderidos, uma vez os leucócitos “rollers” aderem à parede vascular com o decorrer do processo (SCHMID-SCHONBEIN et. al., 1980; DAHLEN et. al., 1981).

No processo de migração celular, os leucócitos adquirem diferentes fenótipos, sendo que estas alterações estão relacionadas, pelo menos

parcialmente, à expressão diferenciada de receptores de superfícies para os diferentes mediadores inflamatórios envolvidos no processo, além das moléculas de adesão (SCAPINI et. al., 2000). Com base nos dados obtidos, tornou-se evidente estudar as ações dos ligantes de TSPO sobre a expressão de diversas moléculas de adesão.

Ainda, os resultados obtidos neste trabalho mostram que os ligantes de TSPO não possuem ações relevantes sobre a expressão basal de moléculas de adesão nas membranas celulares, mas que o ligante da classe dos benzodiazepínicos, o Ro5-4864, modula seletivamente a expressão de moléculas de adesão em leucócitos na vigência de estimulação pelo fMLP. Esta conclusão foi baseada nos seguintes resultados: 1) o tratamento de leucócitos circulantes com Ro5-4864 inibiu a clivagem da L-selectina induzida pelo fMLP em neutrófilos, mas não em linfócitos; não afetou a expressão de $\beta 2$ integrina em neutrófilos ou linfócitos; inibiu o aumento de expressão de LFA-1 induzida pelo fMLP em neutrófilos; induziu aumento basal de PECAM-1 em neutrófilos, inibiu o aumento provocado pelo fMLP em neutrófilos e linfócitos; 2) nenhum dos tratamentos com os ligantes de TSPO afetaram a expressão de moléculas de adesão nas culturas de célula endotelial.

É importante ressaltar que a ação preferencial dos ligantes de TSPO em leucócitos não se deve a ausência destes receptores no endotélio, uma vez que neste trabalho suas expressões na cultura primária de célula endotelial foram mostradas, embora que em menores proporções que neutrófilos. Ainda, vale mencionar que os neutrófilos circulantes parecem ser células alvos dos ligantes de TSPO, uma vez que apresentam alta densidade de receptores, maiores que linfócitos, e que a ação do fMLP estimula suas expressões. Os dados obtidos em neutrófilos corroboram a literatura (CANAT et. al., 1993; DE LIMA et. al., 2010), mas o aumento de expressão induzido pelo GPCR em neutrófilos está sendo mostrado pela primeira vez neste trabalho.

Está bem estabelecido pela literatura que a ativação de leucócitos circulantes leva a uma *downregulation* da L-selectina na superfície celular, causado pela clivagem da molécula pela ação de metaloproteases de membrana (KISHIMOTO et al., 1989), sendo esta fundamental para que as

células cessem o rolamento para subsequente firme adesão dos leucócitos à parede vascular. Assim, a interferência neste processo causado pelo Ro5-4864 pode ser um dos determinantes das inibições causadas pelo tratamento com Ro5-4864 sobre o comportamento *rolling* e de adesão de leucócitos após estimulação pelo fMLP. Seguindo a linha de evidências da literatura, poder-se-ia esperar que o tratamento com o ligante da classe dos benzodiazepínicos pudesse afetar a expressão das $\beta 2$ -integrinas, uma vez que é bastante evidente a participação das $\beta 2$ -integrinas na firme adesão de neutrófilos (ALBELDA et. al., 1994; LEY et. al., 2007; SMITH 2008). Instigantemente, o Ro5-4864 não alterou o aumento de expressão causado pelo fMLP e este dado levantou duas hipóteses: 1) que a clivagem da L-selectina não seja importante para a expressão das $\beta 2$ -integrinas, contribuindo para elucidar este ponto de controvérsia na literatura e 2) que outra via de ação deste ligante de TSPO possa estar envolvida na interferência sobre o processo de adesão. De fato, os dados aqui obtidos mostram que o tratamento com Ro5-4864 inibiu o aumento das expressões de PECAM-1 em neutrófilos e linfócitos e de LFA-1 em neutrófilos induzido pelo fMLP. A PECAM-1 é uma molécula constitutivamente expressa em alguns tipos celulares, entre os quais as células endoteliais, onde sua expressão é predominante nas junções interendoteliais em plaquetas e em alguns tipos de leucócitos, como neutrófilos, linfócitos e monócitos (DE LISSER et. al., 1993). Além da importância da PECAM-1 na transmigração leucocitária pela ligação homotípica da molécula presente nos leucócitos e no endotélio (DE LISSER et. al., 1993; MULLER et. al., 1993; VAPORCIYAN et. al., 1993), tem sido mostrado, recentemente, que a PECAM-1 possui funções complexas e está envolvida em outras funções biológicas como a angiogênese, apoptose, agregação plaquetária e até mesmo exerce funções antiinflamatórias (ILAN; MADRI, 2003; NEWMAN; NEWMAN, 2003; SOLOWIEJ et. al., 2003; PRIVRATSKY et. al., 2010). Assim, a ação do Ro5-4864 sobre a expressão da PECAM-1 pode ter implicações biológicas maiores que as descritas neste trabalho e que estudos adicionais serão necessários para elucidar estes aspectos.

A exemplo da L-selectina, a PECAM-1 possui expressão constitutiva na membrana celular e sua expressão também é dependente de clivagem protéica

após estimulação, de re-internalização e recirculação para a membrana celular (BEVILACQUA 1993; WOODFIN et. al., 2007). Com base nos resultados apresentados neste trabalho é possível supor que a ativação do TSPO pelo Ro5-4864 induza sinalização intracelular que interfira com os mecanismos responsáveis pela expressão destas moléculas após a ativação pelo GPCR. As vias envolvidas podem ser complexas e estudos complementares, que envolvam estratégias farmacológicas, serão necessários para a elucidação dos mecanismos envolvidos na modulação exercida pelos TSPO na expressão de moléculas de adesão.

Sabe-se que as células endoteliais são fundamentais na interação leucócito-endotélio e que elas são responsáveis por direcionar o trafico de leucócitos para o foco inflamatório por meio da regulação da expressão de moléculas de adesão como a PECAM-1, ICAM-1 e VCAM-1 (BEVILACQUA et. al., 1987). A literatura tem mostrado que animais com menor expressão de PECAM-1 apresentaram prejuízo na transmigração neutrofílica (SCHENKEL et. al., 2006). Ainda, monócitos e neutrófilos, na presença de anticorpos monoclonais anti PECAM-1 apresentaram menores transmigrações in vitro (MULLER et. al., 1993). Já a ICAM-1, além de seu papel na transmigração, está envolvida na interação entre células apresentadoras de antígenos e células T (LAWSON;WOLF, 2009).

Como já salientado anteriormente, mostramos neste trabalho que as células endoteliais expressam TSPO, mas a ativação destes por ligantes da classe dos benzodiazepínicos ou isoquinolona carboxamida parecem não afetar as expressões das moléculas de adesão envolvidas na interação leucócito-endotélio. No entanto, ensaios adicionais deverão ser realizados para confirmar esta hipótese, os quais incluem a ativação celular por GPCR.

A locomoção celular é um processo dependente de fatores como, sítios de adesão, polarização da actina presente no citoesqueleto, reorganização dos microtúbulos, dentre outros, que associados, permitem a movimentação e orientação celular em resposta a um agente quimiotático. Assim, a presença de receptores de adesão e de agentes quimiotáticos, bem como os seus rearranjos na membrana da célula é crucial para a indução da sinalização

intracelular responsável por estes efeitos. Neste contexto, estudos têm mostrado a importância de moléculas de adesão, como as integrinas e imunoglobulinas neste processo (RIDLEY et. al., 2003; WU et. al., 2005). De fato, quando analisamos os efeitos desses ligantes sobre o processo de quimiotaxia observamos que o Ro5-4864 inibiu a migração de neutrófilos frente ao fMLP, da mesma forma que inibiu a interação leucócito-endotélio e as expressões das moléculas de adesão. No entanto, observamos que os tratamentos com PK11195 não afetou as propriedades de adesão, mas aumentou a locomoção orientada de neutrófilos. Assim, pode-se sugerir que esses ligantes de TSPO modulem de maneira diferente os mecanismos intracelulares envolvidos com a migração de leucócitos.

Os peptídeos N-formilados, entre os quais fMLP, utilizado neste trabalho como agente flogístico, ligam-se com alta afinidade aos receptores FPR, em especial ao FPR-1 (SHOWELL et. al., 1976; BOULAY et. al., 1990; BAO et. al., 1992; RABIET et. al., 2007). O FPR-1 está acoplado à proteína G, mais especificamente à G_{i1} , G_{i2} G_{i3} (WENZEL-SEIFERT et. al., 1999; LEE et. al., 2002). A ligação do agonista ativa a proteína G, que se dissocia em unidades α e $\beta\gamma$, ativando a fosfolipase C. Esta, por sua vez, gera o inositol trifosfato, aumentando o cálcio intracelular, devido a sua liberação do retículo endoplasmático, e o diacilglicerol, ativando as fosfoquinases (BERRIDGE, 1993; BOKOCH, 1995). Assim, em células não ativadas, a concentração citosólica de cálcio é baixa (100 nM), quando comparada com os níveis extracelulares. Entretanto, a concentração citosólica aumenta rapidamente e passa a concentrações micromolares após estimulação por quimioatraentes (FU et. al., 2006), sendo este fenômeno fundamental para a locomoção orientada dos neutrófilos (HUANG et. al., 1993).

A literatura tem sugerido que a ação dos TSPO é dependente de modificações dos níveis intracelulares de cálcio. Observou-se que derivados de ligantes endógenos (Diazepam binding inhibitor - DBI) ou sintéticos (Ro5-4864 e PK11195) são capazes de induzir aumento nos níveis de cálcio intracelular (COSENTINO et. al., 2000; MARINO et. al., 2001; OSTUNI et. al., 2007). Adicionalmente, é descrito que os BZD afetam funções de células imunes

dependentes de cálcio, como fagocitose, quimiotaxia e produção de ânion superóxido (LAGUI-PASINI et. al., 1987; FINNERTY et. al., 1991), e que alguns desses efeitos promovidos por BZD são antagonizados pelo uso do bloqueador de canal de cálcio voltagem dependente do tipo L (MARINO et. al., 2001; SILVA, 2003 – tese). Assim, é possível supor que os efeitos relacionados aos ligantes de TSPO observados no presente trabalho possam envolver e/ou depender de mudanças nas concentrações intracelulares de cálcio. Com base nestas fundamentações, buscou-se avaliar os efeitos destes ligantes sobre o influxo de cálcio intracelular e, neste momento, o trabalho foi conduzido em neutrófilos estimulados com o fMLP ou com bradicinina, no sentido de elucidar a especificidade da ação dos TSPO .

Da mesma forma que o FMLP, o receptor para bradicinina está acoplado à proteína G (WENZEL-SEIFERT et. al., 1999; LEE et. al., 2002) e sua ativação coincide com mecanismos intracelulares similares aos da ativação do fMLP. (BERRIDGE, 1993; BOKOCH, 1995). De fato, no presente trabalho foi observado, em ensaios de microscopia confocal, aumento nos níveis intracelulares de cálcio em neutrófilos após estimulação com fMLP ou com bradicinina, em concordância com a literatura (ANDERSON;GOOLAM MAHOMED, 1997; BERTRAM et. al., 2007; LIAO et. al., 2008). Diferentemente, os ligantes de TSPO, *per se*, não afetaram o influxo intracelular de cálcio, contrastando com dados prévios obtidos por outros autores, mas alteraram o aumento dos níveis intracelulares de cálcio causado pela ação do fMLP. Consentino e colaboradores (2000) observaram aumento nos níveis de cálcio em neutrófilos de humanos após incubação *in vitro* com ligante endógeno de TSPO (Diazepam binding inhibitor – DBI) ou com o Ro5-4864. Adicionalmente, foi observado que o tratamento com o PK11195 antagonizou os efeitos promovidos pelo Ro5-4864. Da mesma forma, Marino e colaboradores (2000) descreveram aumento de cálcio intracelular nestas mesmas células quando incubadas com o diazepam ou Ro5-4864. Diferentemente, Ostuni e colaboradores (2007) mostraram que o PK11195, considerado por muitos autores um antagonista de TSPO, também promoveu um aumento no influxo de cálcio em células de linhagem HT-29 (adenocarcinoma humano). Assim, pode-se sugerir que os ligantes de TSPO afetam a mobilização de cálcio no

interior da célula, apesar dos resultados ainda serem controversos, e que as condições experimentais empregadas nos estudos, como concentrações dos ligantes, períodos de incubações e tipos celulares empregados podem ter contribuído pela divergência dos dados encontrados na literatura. No entanto, neste trabalho, pode-se supor que a ação dos TSPO sobre a mobilização de cálcio intracelular esteja ligada à modulação sobre a quimiotaxia, já que a incubação com o Ro5-4864 inibiu a quimiotaxia e a elevação de cálcio intracelular causado pelo fMLP e o tratamento com o PK11195 elevou estes parâmetros celulares.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que os ligantes de TSPO comportaram-se de maneira distinta sobre os parâmetros de adesão e de locomoção leucocitária, bem como na mobilização de cálcio citoplasmático em neutrófilos. Com base em um estudo de entalpia e entropia da interação ligante-receptor, pressupõe-se que o Ro5-4864 atuava como um agonista de TSPO, enquanto que o PK11195 pode ser considerado um antagonista (LE FUR et. al., 1983). Entretanto, essa classificação é duvidosa, tendo em vista que sobre certas circunstâncias, dependendo do tipo celular e da concentração de ligantes utilizada, a ativação dos receptores TSPO por ambos os ligantes induzem efeitos semelhantes (SHANY et. al., 1994). Na tentativa de elucidar a possível interação alostérica entre os ligantes de TSPO, alguns eventos foram estudados após a incubação de concentrações equimolares dos ligantes. Nestes casos, verificou-se que o tratamento com PK11195 reverteu as ações do tratamento com Ro5-4864 sobre a expressão de L-selectina e PECAM-1, e que o Ro5-4864 reverteu o aumento de influxo de cálcio e a quimiotaxia induzida pelo PK11195 na vigência de estimulação pelo fMLP .

Os TSPO foram identificados em diferentes células imunes como monócitos, macrófagos, neutrófilos (ZAVALA et. al., 1984; ZAVALA; LENFANT, 1987; SCHLUMPF et. al., 1990, 1992) e linfócitos (ROCCA et. al., 1993), e mais, sabe-se que sua densidade varia dependendo do tipo celular. Nossos resultados confirmaram que neutrófilos expressam maiores níveis de TSPO quando comparados aos linfócitos, o que pode indicá-los como uma célula periférica alvo para as ações dos ligantes de TSPO (CANAT et. al., 1993; DE

LIMA et. al., 2010). Ainda, nossos resultados mostraram que a estimulação por fMLP aumentou os níveis de TSPO presentes em neutrófilos, mas não em linfócitos, sugerindo que a ativação da vias induzidas por GPCR aumentam a especificamente a expressão dos TSPO. No entanto, o aumento de expressão de TSPO parece não ser induzida somente pela ativação de GPCR, uma vez que a estimulação pelo LPS aumentou os níveis de TSPO presentes em células endoteliais. Embora estes dados tenham sido obtidos em ensaios *in vitro*, podem corroborar o aumento na expressão de TSPO em condições inflamatórias *in vivo* (CHEN:GUILARTE, 2008) e sua indicação recente de marcador biológico de inflamação, que vem sendo sugerida em diferentes condições de doença (DOORDUIN et. al., 2008; PAPADOPOULOS;LECANU, 2009).

Concluindo, os resultados aqui apresentados indicam, pela primeira vez, o TSPO como modulador endógeno de mecanismos intracelulares da ativação dos GPCR envolvidos na interação leucócito-endotélio e na locomoção de neutrófilos, relacionando as ações do TSPO com a resposta inflamatória inata.

A literatura tem sugerido a existência de uma relação entre os receptores TSPO e os GC e que, a modulação exercida pelos benzodiazepínicos sobre a resposta imune seja dependente do aumento da secreção de GC (PAPADOPOULOS et. al., 1998; LAZZARINI et.al., 2010). Neste trabalho avaliamos esta possibilidade nos fenômenos de interação leucócito-endotélio, empregando células obtidas de animais previamente tratados com o RU 38486, um antagonista de receptor de GC.

Os dados da literatura são bastante incisivos quanto a farmacocinética e farmacodinâmica do RU 38486 (PEERS, et. al., 1993; LIANG-SUO et. al., 2002; CAVALCANTI et. al., 2007; JURADO, 2009) e, assim, tem sido observado que sua meia-vida é superior a 24 horas e que o tratamento *in vivo* com RU 38486 exacerba os eventos da resposta inflamatória (LAUE et. al., 1988; PEERS et. al., 1988; FARSKY et al., 1995; PITZALIS et. al., 2002; CAVALCANTI et. al., 2007; ZHANG et. al., 2009). Neste contexto, a migração de neutrófilos é um parâmetro importante na avaliação da dinâmica do antagonista, já que animais tratados com RU 38486 apresentam aumento no numero de *rolling* de

leucócitos, bem como no número de células aderidas à parede vascular que, conseqüentemente, induz incremento no número de células migradas para o tecido inflamado (FARSKY et. al., 1995; TJANDRA et. al., 1996).

Uma vez que não há indicador biológico circulante que seja marcador da eficácia do tratamento com RU 38486, neste trabalho escolhemos investigar o efeito do tratamento por nós preconizado no modelo de inflamação peritoneal aguda induzida pelo LPS, quantificando a mobilização local de neutrófilos. Os resultados obtidos mostraram a eficácia do bloqueio do receptor, pelo aumento acentuado no número de leucócitos para o peritônio inflamado, principalmente, de polimorfonucleares. Da mesma forma, animais tratados com RU 38486 apresentaram aumento nos fenômenos de interação leucócito-endotélio, corroborando a literatura (ROVAI et. al., 1998; LEECH et. al., 2000) e mostrando que os GE, via receptor citosólico, controlam o comportamento *rolling* e a adesão de leucócitos (FARSKY et al., 1995). Adicionalmente, este trabalho mostra que a relação entre os GE e TSPO, em especial aos ligantes da classe dos benzodiazepínicos, no controle da interação leucócito-endotélio, uma vez que o tratamento com Ro5-4864 reduziu o número de leucócitos em comportamento *rolling* e adesão em animais com bloqueio do receptor de GE.

Os GE modulam a interação leucócito-endotélio pelo controle da expressão de moléculas de adesão nas membranas dos leucócitos e da célula endotelial (FILEP et. al., 1997; PIPITONE et. al., 2001; LEONE et. al., 2004; CAVALCANTI et. al., 2006). Neste sentido, os dados aqui obtidos corroboraram a literatura, uma vez que os GE modularam a expressão de L-selectina e ainda, mostraram que o tratamento com Ro5-4864 alterou a ação do bloqueio do receptor de GE. Uma vez que a ação preferencial dos GE ocorre no controle da clivagem da L-selectina por controlar a ação de metaloproteases de membrana (ZHAO et. al., 2001; SMALLEY; LEY, 2005), é possível supor que a ativação dos ligantes de TSPO pelo Ro5-4864 interfira com este sistema enzimático. Esta hipótese pode ser reforçada pela observação que nestas células, o tratamento com Ro5-4864 inibiu a clivagem induzida pelo fMLP. No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar esta hipótese.

Enquanto que a ação dos GC sobre a expressão de L-selectina em neutrófilos está bem estabelecida, pouco se sabe a respeito do papel dos GE sobre a expressão de L-selectina em linfócitos. Os dados aqui obtidos mostraram que os GE não alteraram a expressão de L-selectina presente nos linfócitos, corroborando aos dados obtidos por Cavalcanti e colaboradores (2006), que também não observaram alteração na expressão desta molécula em células mononucleares. Entretanto, após tratamento *in vivo* com o bloqueador de receptor de GC e o tratamento *in vitro* com Ro5-4864 houve alteração na expressão desta molécula, mostrando, mais uma vez, uma possível interação entre esses dois receptores.

Como já salientado na Introdução, a ação dos GE sobre a expressão de β 2-integrina é controversa (BURTON et. al., 1995; FILEP et. al., 1997; CAVALCANTI et. al., 2006). No presente estudo mostramos a ação dos GE sobre a expressão desta molécula, já que neutrófilos de animais tratados com RU 38486 apresentaram redução na expressão da molécula, porém esta diferença não é observada após a estimulação pelo fMLP. Uma explicação plausível para redução da expressão em condições basais pode ser a expressão exacerbada de L-selectina, visto que uma correlação inversa entre as moléculas pode ser observada em algumas condições. No entanto, a reversão de efeito após estimulação é instigante e mostra a complexidade das ações induzidas pelo bloqueio do receptor de GE e ativação de GPCR. Interessantemente, a ativação de TSPO não alterou o perfil de resposta sobre a expressão das β 2-integrinas, o que corrobora os dados prévios deste trabalho e sugere que os TSPO ative vias específicas no controle das expressões das moléculas de adesão.

Neste contexto, os dados obtidos nos ensaios que visaram investigar a expressão de PECAM-1 ratificam que, a exemplo da L-selectina, a PECAM-1 é alvo de ação dos GE e da ativação dos TSPO em neutrófilos. Em condições basais, os tratamentos com RU 38486 e com Ro5-4864 aumentaram a expressão desta molécula, porém na vigência de estimulação pelo fMLP, o Ro5-4864 inibiu a elevação na expressão da molécula. É importante ressaltar que a literatura é escassa quanto a estas ações dos GE e dos ligantes de

TSPO sobre a expressão de PECAM-1, e, assim não é possível estabelecer comparações entre os resultados obtidos. Somente Cavalcanti e colaboradores (2007) mostraram aumento de expressão da PECAM-1 em células endoteliais obtidas de animais adrenalectomizados ou tratados com RU 38486.

De fato, dados preliminares de Lazzarini e colaboradores (2006; 2010) mostram que o agonista de TSPO reverte, parcialmente, o aumento de migração leucocitária e da interação leucócito-endotélio em animais tratados com RU 38486. Desta forma, nossos dados podem explicar, pelo menos em parte este dado, uma vez que os ligantes de TSPO reverteram o aumento de expressão de L-selectina causada pelo RU 38486. Ainda, estes autores mostraram que o óxido nítrico (NO) pode também estar envolvido na modulação desses ligantes sobre a migração leucocitária, já que o tratamento com doador de NO ou inibidor da síntese de NO inibiu ou potencializou, respectivamente, a redução da interação leucócito-endotélio (LAZZARINI et. al., 2010). Desta forma, pode-se supor que a ação dos ligantes de TSPO sobre a migração leucocitária é complexa e dependente de diferentes vias, entre as quais os GC.

Sabe-se que os glicocorticoides endógenos ou exógenos são capazes de modular a expressão das moléculas presentes no endotélio. A literatura tem mostrado que o tratamento de HUVEC com dexametasona inibiu a expressão destas moléculas induzida por LPS e mais, que o tratamento com o RU38486 reverteu este efeito (CRONSTEIN et. al., 1992). Em outro trabalho, observou-se aumento na expressão de PECAM-1, ICAM-1 e VCAM-1 em células endoteliais de animais tratados com RU38486 ou adrenalectomizados (CAVALCANTI et. al., 2007). Em nosso trabalho, não observamos alteração na expressão destas moléculas em células endoteliais de animais com o bloqueio do receptor de glicocorticoide. Isto pode ser devido a diferença no tempo de tratamento com o RU38486, já que em nosso trabalho os animais foram tratados 18h e 1h antes dos experimentos, enquanto que no estudo de Cavalcanti e colaboradores (2007) os animais foram tratados por 7 dias. Ainda, parece não haver uma relação entre os receptores de glicocorticóides e os TSPO no controle da expressão de PECAM-1 e ICAM-1 presente nestas

células, já que não observamos alteração após tratamento com o RU 38486 e os ligantes de TSPO.

Uma vez que os dados acima mostraram a possível interação entre os receptores de GE e de TSPO na interação leucócito-endotélio, tornou-se interessante avaliar o controle dos GE sobre a expressão dos TSPO. De fato, os dados obtidos mostraram que na ausência de ação dos GE há diminuição da expressão de TSPO em neutrófilos e linfócitos, mas não em células endoteliais, sugerindo que nas células circulantes, a ativação de receptores de GE favorece a expressão dos TSPO. Esta relação pode ter significado importante na modulação da resposta inflamatória, uma vez os níveis de GE circulantes elevam-se marcadamente nas etapas iniciais do processo inflamatório (LEME; SCHAPOVAL, 1975). Assim, a elevação deste hormônio poderia induzir a expressão de TSPO, contribuindo para a modulação do processo inflamatório. No entanto, esta afirmação é especulativa e dados adicionais serão necessários para elucidar esta hipótese.

Em conjunto, os dados obtidos neste estudo mostram que os ligantes de TSPO modulam diferentemente os eventos da migração leucocitária para o sítio de lesão inflamatória que existe uma correlação entre os receptores de TSPO e GE neste processo.

7.0 – CONCLUSÕES

1. O ligante de TSPO, Ro5-4864, alterou a ação do peptídeo formil-metionil-leucilfenilalanina (fMLP), um agonista de receptor ligado a proteína G, uma vez que inibiu a diminuição do *rolling*, o aumento de células aderentes, a clivagem de L-selectina, o aumento de expressão de PECAM-1, a quimiotaxia e o influxo de cálcio em neutrófilos;

2. O ligante de TSPO, PK 11195 aumentou o influxo de cálcio induzido pelo fMLP e a quimiotaxia de neutrófilos;

3. A co-administração dos ligantes de TSPO, Ro5-4864 e PK 11195, reverteu os efeitos do Ro5-4864 sobre a expressão de L-selectina e PECAM-1, o influxo de cálcio e a quimiotaxia de neutrófilos,

4. O bloqueio de receptor de glicocorticóide promoveu aumento no número de células *rolling* e células aderentes, aumento na expressão de L-selectina e PECAM-1 em neutrófilos, diminuição na expressão de β_2 -integrina em neutrófilos e LFA-1 em linfócitos bem como a diminuição na expressão de TSPO presente em leucócitos;

5. A possível inter-relação dos TSPO e GE foi verificada uma vez que o Ro5-4864 inibiu o aumento do número de leucócitos *rolling* e aderidos à parede vascular *in vivo* causado pelo tratamento com RU 38486; inibiu o aumento da expressão de L-selectina em neutrófilos, de β_2 -integrina em linfócitos e de PECAM-1 em leucócitos;

6. A expressão de TSPO, presente em neutrófilos, é ampliada após estímulo com fMLP;

7. A célula endotelial obtida da microcirculação do músculo cremaster de ratos expressa TSPO, mas sua interação aos ligantes Ro5-4864 ou PK11195 não alterou a expressão de moléculas de adesão em condições basais ou após estimulação pelo LPS.

Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que os ligantes de TSPO modulam diferentemente as funções de adesão e mobilidade de leucócitos e que uma relação alostérica de agonismo/antagonismo entre estes pode ser sugerida. Adicionalmente, os resultados mostram uma possível relação entre os TSPO e os receptores de citoplasmáticos de GE no controle da interação leucócito-endotélio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADCOCK, I. M. Molecular mechanisms of glucocorticosteroids actions. *Pulm Pharmacol Ther.*, v. 1, p. 115-26, 2000.

ALI, H.; RICHARDSON, R. M.; HARIBABU, B.; SNYDERMAN, R. Chemoattractant receptor cross-desensitization. *J Biol Chem.*, v. 274(10), p. 6027-30, 1999.

ALON, R.; LEY, K. Cells on the run: shear-regulated integrin activation in leukocyte rolling and arrest on endothelial cells. *Curr Opin Cell Biol.*, v. 20, p. 525-532, 2008

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

ALVES, G. J.; VISMARI, L.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a Sick Cage Mate: Effects on Ascitic Form of Ehrlich Tumor Growth and Macrophage Activity. *Neuroimmunomodulation*, v. 14(6), p. 297-303, 2008.

ANDERSON, R.; GOOLAM MAHOMED, A. Calcium efflux and influx in f-met-leu-phe (fMLP)-activated human neutrophils are chronologically distinct events.. *Clin Exp Immunol.*, v. 110(1), p. 132-138, 1997

ANHOLT, R. R. H., MURPHY, K. M. M., MACK, G. E., SNYDER, S. H. Peripheral-type benzodiazepine receptors in the central nervous system: localization to olfactory nerves. *J. neurosci.*, v. 4, p. 93-98, 1984.

ANHOLT, R. R. H.; DE SOUZA, E. B.; OSTER-GRANITE, M. L.; SNYDER, S. H. Peripheral-type benzodiazepine receptors: autoradiographic localization in whole-body sections of neonatal rats. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, v. 233, p. 517-526, 1985.

ARGUELLES, A.E.; ROSNER, J. Diazepam and plasma testosterone levels. *Lancet*, v. 27, p. 607-608, 1975.

ARNAOUT, M. A.; LANIER, L. L.; FALLER, D. V. The relative contribution of the leukocyte molecules Mo- 1, LFA- 1, p 150/95(Leu MS) in adhesion of granulocytes and monocytes to vascular endothelium is tissue- and stimulus specific. *J. Cell. Physiol.*, v. 137, p. 305-312, 1988

AWAD, M.; GARISH, M. Binding of [3H]Ro 5-4864 and [3H]PK 11195 to cerebral cortex and peripheral tissues of various species: species differences and heterogeneity in peripheral benzodiazepine binding sites. *J. Neurochem.*, v. 49, p. 1407-1414, 1987.

BAO, L.; GERARD, N.P.; EDDY JR, R.; SHOWS, T.B.; GERARD, C. Mapping of genes for the human C5a receptor (C5AR), human FMLP receptor (FPR), and two FMLP receptor homologue orphan receptors (FPRH1,FPRH2) to chromosome 19. *Genomics.*, v. 13, p. 437-440, 1992

BARTHOLOME, B. SPIES, C. M.; GABER, T.; SCHUCHMANN, S.; BERKI, T.; KUNKEL, D.; BIENERT, M.; RADBRUCH, A.; BURMESTER, G. R.; LAUSTER, R.; SCHEFFOLD, A.; BUTTGEREIT, F. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J.*, v. 18, p. 70-80, 2004.

BASSO A.S., de SA-ROCHA L.C., PALERMO-NETO J., Immune-induced flavor aversion in mice: modification by neonatal capsaicin treatment. *Neuroimmunomodulation*, v. 9, p. 88-94, 2001.

BASSO, S. A.; COSTA-PINTO, A. F.; GIORGETTI, B. L. R.; DE SA-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Neural pathways involved in food allergy signaling in the mouse brain: role of capsaicin-sensitive afferents. *Brain Research.*, v.1009(1-2), p.181-188, 2004.

BEHBAHANI, H.; RICKLE, A.; CONCHA, H.; ANKARCORONA, M.; WINBLAD, B.; COWBURN, R.F. Flow cytometry as a method for studying effects of stressors on primary rat neurons. *J Neurosci Res.*, v. 82(3), p. 432-441, 2005.

BERGER, M. J.; O'SHEA, A. S.; CROSS, T. M.; FOLKS, T. M.; CHUSED, E. J.; BROWN, AND M. FRANK. Human neutrophils increase expression of C3bi as well as C3b receptors upon activation. *J. Clin. Invest.*, v. 74, p. 1566-1571, 1984.

BERRIDGE, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature*, v. 361, p. 315–325, 1993.

BERTRAM, C.M.; BALTIC, S.; MISSO, N.L.; BHOOLA, K.D.; FOSTER, P.S.; THOMPSON, P.J.; FOGEL-PETROVIC, M. Expression of kinin B1 and B2 receptors in immature, monocyte-derived dendritic cells and bradykinin-mediated increase in intracellular Ca²⁺ and cell migration. *J Leukoc Biol.*, v. 81(6), p. 1445-1454, 2007.

BERZINS, T. ; AXELSSON, B.; HAMMARSTRÖM, M. L. ; HAMMARSTRÖM, S.; PERLMANN, P. Studies on the role of lymphocyte function-associated antigen I (LFA-I) in T cell activation. *Scand. J. Immunol.* v. 27, p. 7-16. 1988

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

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

BESEDOVSKY, H.O; DEL REY, A. SORKIN, E. Linfoikine-containing supernatants from com A-stimulated cells increase corticosterone blood levels. *J. Immunol.* v.126, p. 385-387, 1981.

BEVILACQUA, M. P.; NELSON, R. M. Selectins. *J Clin Invest.*, v. 91(2), p. 379-387, 1993.

BEVILACQUA, M.P.; POBER, J.S.; MENDRICK, D.L.; COTRAN, R.S.; GIMBRONE, M.A. JR. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 84(24), p. 9238-9242, 1987.

BOCHNER, B.S.; LUSCINSKAS, F.W.; GIMBRONE, M.A.; NEWMAN, W.; STERBINSKY, S.A.; DERSE-ANTHONY, C. et al. Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to IL-1 activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Méd.*, v. 173, p. 1553-1556, 1991

BOKOCH, G. M. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood.*, v. 86, p. 1649–1660, 1995

BORMANN, J. Electrophysiology of gabab receptor subtypes. *Trends neurosci.*, v. 11(3), p. 112-116, 1988.

BORREGAARD, N.; KJELDSSEN, L.; SENGELOV, H.; DIAMOND, M.S.; SPRINGER, T.A.; ANDERSON, H.C.; KISHIMOTO, T.K.; BAINTON, D.F. Changes in subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators. *J Leukoc Biol.*, v. 56, p. 80–87, 1994.

BOULAY, F.; TARDIF, M.; BROUCHON, L.; VIGNAIS, P. The human N-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors. *Biochemistry*, v. 29, p. 11123–11133, 1990.

BUIJN, J.A.; DE HEER, E. Adhesion molecules in renal diseases. *Lab Invest*, v. 72(4), p. 387-394, 1995

BULLARD, D.C.; QIN, L.; LORENZON, I.; QUINLIN, W.M.; DOYLE, N.A.; BOSSE, R.; et. al. P-selectin/ICAM-1 double mutant mice show a complete block in peritoneal emigration of neutrophils. *J Clin Invest*, v. 95, p.1782-1788, 1995.

BURTON, J.L.; KEHRLI, M. E. JR.; KAPIL, S.; HORST, R. L. Regulation of L-selectin and CD18 on bovine neutrophils by glucocorticoids: effects of cortisol and dexamethasone. *J Leukoc Biol*, v.57, p. 317-325, 1995

BUTCHER, E. C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*, v. 67(6). p. 1033-1036, 1991.

CABRAL, G. A. Lipids as bioeffectors in the immune system. *Life Science*, v. 77(14), p. 1699-1710, 2005.

CABRERA, R.B., RODRIGUEZ MENCÍAS, E., CABRERA FOREIRO, J. Benzodiazepinas. In: CABRERA, R.B., RODRÍGUEZ MENCÍAS, E., CABRERA FOREIRO, J. *Toxicología de los psicofármacos*. Madrid: Mosby Year Book, cap.4, p.53-108, 1993.

CALVO, D.J.; RITTA, M.N.; CALANDRA, R.S.; MEDINA, J.H.; DEL ZOMPO, M.; BOCHETTA, A.L.; CORSINI, G.U.; TALLMAN, J.F.; GESSA, G.L. Properties of benzodiazepine binding sites in the peripheral tissues. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* , v.38, p. 239-248, 1983.

CAMPBELL, J. J.; HEDRICK, J.; ZLOTNIK, A.; SIANI, M.A.; THOMPSON, D.A.; BUTCHER, E. C. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science*, v. 279, p. 381-384, 1998

CANAT, X.; CARAYON, P.; BOUABOULA, M.; CAHARD, D.; SHIRE, D.; ROQUE, C.; LE FUR, G.; CASELLAS, P. Distribution profile and properties of peripheral-type benzodiazepine receptors on human hemopoietic cells. *Life Sci*. v.52, p.107-118, 1993.

CARLOS, T.M.; SCHWARTZ, B.R.; KOVACH, N.L.; YEE, E.; ROSA, M.; OSBORN, L.; CHI-ROSSO, G.; NEWMAN, B.; LOBB, R.; et al. Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells. *Blood*, v. 76(5), p. 965-970, 1990.

CASELLAS, P.; GALIEGUE, S.; BASILE, A. S. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochem. Intern*, v. 40, p. 475-486, 2002.

CAVALCANTI, D. H. M.; LOTUFO, C.M. C.; BORELLI, P.; FERREIRA, Z. S.; MARKUS, R. P.; FARSKY, S. H. P. Endogenous glucocorticoids control neutrophil mobilization from bone marrow to blood and tissues in non-inflammatory conditions. *Br J Pharmacol*, v. 152, p. 1291-1300, 2007.

CAVALCANTI, D. M. H.; LOTUFO, C. M.C.; BORELLI, P.; TAVASSI, A. M. C.; PEREIRA, A. L. M.; MARKUS, R. P.; FARSKY, S. H. P. Adrenal deficiency alters mechanisms of neutrophil mobilization. *Mol Cell Endocrinol*, v. 249, p. 32-39, 2006.

CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas. II levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil. Disponível em: http://www.unifesp.br/dpsicobio/cebrid/lev_domiciliar2005/index.htm.

CHEN, M.K.; GUILARTE, T.R. Imaging the peripheral benzodiazepine receptor response in central nervous system demyelination and remyelination. *Toxicol Sci.*, v. 91, p. 532-539, 2006

CHEN, M.K.; GUILARTE, T.R. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacol. Ther.*, v. 118, p. 1-17, 2008.

CHEN, S.F.; FEI, X.; LI, S.H. A new simple method for isolation of microvascular endothelial cells avoiding both chemical and mechanical injuries. *Microvasc Res* v. 50, p. 119-128, 1995.

CLARKE, G.D.; RYAN, P.J. Tranquillizers can block mitogenesis in 3T3 cells and induce differentiation in Friend cells. *Nature.*, v. 287, p. 1601-61, 1980.

COHEN, S.; HERBERT, T.B. Health psychology: Psychological factors and physical disease from the perspective of human psychoneuroimmunology. *Ann. Rev. of Psychol.*, v. 47, p. 113-142, 1996.

COLLINS, T.; READ, M.A.; NEISH, A.S.; WHITLEY, M.Z.; THANOS, D.; AMIATIS, T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.*, v. 9(10), p. 899-909, 1995.

COSENTINO, M.; MARINO, F.; CATTANEO, S.; DI GRAZIA, L.; FRANCIOLI, C.; FIETTA, A. M.; LECCHINI, S.; FRIGO, G. Diazepam-binding inhibitor-derived peptides induce intracellular calcium changes and modulate human neutrophil function. *J Leukoc Biol.*, v. 67(5), p. 637-643, 2000

CRONSTEIN, B.N.; KIMMEL, S.C.; LEVIN, R.I.; MARTINIUK, F.; WEISSMANN, G. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 89(21), p. 9991-9995, 1992.

CURRAN, T.; MORGAN, J.I. Superinduction of c-fos by nerve growth factor in the presence of peripherally active benzodiazepines. *Science.*, v. 229, p.1265-1268, 1985.

DAHLEN, S.E.; BJORK, J.; HEDQUIST, P.; ARFORS, K.E.; HAMMARSTROM, S.; LINDGREN, J.A.; SAMUELSSON, B. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci.*, v. 78(6), p. 3887-3891, 1981.

DAVIGNON, D.; MARTZ, E.; REYNOLDS, T.; KÜRZINGER, K.; SPRINGER, T.A. Lymphocyte function-associated antigen (LFA-I): a surface antigen distinct from Lyt-2,3 that participates in lymphocyte-mediated killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 78, p. 4535-4539, 1981

DE GRAAF, J.H.; TAMMINGA, R.Y.; KAMPS, W.A.; TIMENS, W. Expression of cellular adhesion molecules in Langerhans cell histiocytosis and normal Langerhans cells. *Am J Pathol.*, v. 147(4), p.1161-1171, 1995

DE LIMA, C.B.; SAKAI, M.; LATORRE, A.O.; MOREAU, R.L.; PALERMO-NETO, J. Effects of different doses and schedules of diazepam treatment on lymphocyte parameters in rats. *Int Immunopharmacol.*, v. 10(11), p. 1335-1343, 2010.

DE LISSER, H.M.; NEWMAN, P.J.; ALBELDA, S.M. Platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31). In *Current Topics Microbiology and Immunology.*, v. 184, p. 37-45, 1993.

DE PAULA, V.F.; RIBEIRO, A.; PINHEIRO, M.L.; SAKAI, M.; LACAVA, M.C.; LAPACHINSKE, S.F.; MOREAU, R.L.; PALERMO-NETO, J. Methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy)

decreases neutrophil activity and alters leukocyte distribution in bone marrow, spleen and blood. *Neuroimmunomodulation.*, v. 16(3), p. 191-200, 2009.

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

DONNELLY, L.E.; TUDHOPE, S.J.; FENWICK, P.S.; BARNES, P.J. Effects of formoterol and salmeterol on cytokine release from monocyte-derived macrophages. *Eur Respir J.*, v. 36(1), p. 178-186, 2010.

DOORDUIN, J.; DE VRIES, E.F. ; DIERCKX, R.A. ; KLEIN, H.C. PET imaging of the peripheral benzodiazepine receptor: monitoring disease progression and therapy response in neurodegenerative disorders. *Curr. Pharm. Des.*, v. 14, p. 3297–3315, 2008

ELANGBAM, C.S.; QUALLS JR, C.W.; DAHLGREN, R.R. Cell adhesion molecules – update. *Vet Pathol.*, v. 34, p. 61-73, 1997.

ETIENNE-MANNEVILLE, S.; MANNEVILLE, J.B.; ADAMSON, P.; WILBOURN, B.; GREENWOOD, J.; COURAUD, P.O. ICAM-1-coupled cytoskeletal rearrangements and transendothelial lymphocyte migration involve intracellular calcium signaling in brain endothelial cell lines. *J Immunol.*, v. 165, p. 3375–3383, 2000.

FARSKY, S.H.P.; BORELLI, P.; FOCK, R.A.; PROTO, S.Z.; FERREIRA JR, J.M.; MELLO, S.B. Chronic blockade of nitric oxide biosynthesis in rats: effects on leukocyte endothelial interaction and on leukocyte recruitment. *Inflamm Res.*, v. 53(9), p. 442-452, 2004.

FARSKY, S.H.P.; SANNOMIYA, P.; GARCIA-LEME, J. Secreted glucocorticoids regulate leukocyte-endothelial interactions in inflammation. A direct vital microscopic study. *J Leukoc Biol.*, v.57(3), p. 379-386, 1995.

FELTEN, D.L.; FELTEN, S.Y.; BELLINGER, D.L.; CARLSON, S.L.; ACKERMAN, K.D.; MADDEN, K.S.; OLSCHOWKI, J.A.; LIVNAT, S. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunol Rev.*, v.100, p. 225-260, 1987

FERRARESE, C.; APPOLONIO, I.; FRIGO, M.; PEREGO, M.; PIERPAOLI, C.; TRABUCCHI, M.; FRATTOLA, L. Characterization of peripheral benzodiazepine receptors in human blood mononuclear cells. *Neuropharmacol.*, v. 29, p. 375-378, 1990.

FILEP, J. G.; DELALANDRE, A.; PAYETTE, Y.; FÖLDES-FILEP, E. Glucocorticoid Receptor Regulates Expression of L-Selectin and CD11/CD18 on Human Neutrophils. *Circulation.*, v. 96, p. 295-301, 1997

FINNERTY, M.; MARCZYNSKI, T.J.; AMIRAUULT, H.J.; URBANCIC, M.; ANDERSEN, B.R. Benzodiazepines inhibit neutrophil chemotaxis and superoxide production in a stimulus dependent manner; PK-11195 antagonizes these effects. *Immunopharmacology.*, v. 22(3), p. 185-193, 1991

FISCHER, A.; DURANDY, A.; STERKERS, G.; GRISCELLI, C. Role of the LFA-1 molecule in cellular interactions required for antibody production in humans. *J. Immunol.*, v. 136, p. 3198-3103, 1986

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

FONSECA, E.S.; SAKAI, M.; CARVALHO-FREITAS, M.I.; PALERMO NETO, J. Naloxone treatment prevents prenatal stress effects on peritoneal macrophage activity in mice offspring. *Neuroendocrinology*, v. 81(5), p. 322-328, 2005.

FORTES, Z.B.; FARSKY, S.P.; OLIVEIRA, M.A.; GARCIA-LEME, J. Direct vital microscopic study of defective leukocyte-endothelial interaction in diabetes mellitus. *Diabetes*, v. 40(10), p. 1267-1273, 1991.

FRANGOIANNIS, N.G.; MENDONZA, L.H.; LEWALLEN, M.; MICHAEL, L.H.; SMITH, C.W.; ENTMAN, M.L.; Induction and suppression of interferon-inducible protein 10 in reperfused myocardial infarcts my regulate angiogenesis. *FASEB J.*, v. 15, p. 1428-1430, 2001.

FREYER, D.R.M.L.; MORGANROTH, C.E.; ROGERS, M.A.; ARNAOUT, AND R. F. TODD. Regulation of surface glycoproteins CD1 I/CD18 (Mol,LFA-1,p150,95) by human mononuclear phagocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, v. 46, p. 272-283, 1988

FU, H.; KARLSSON, J.; BYLUND, J.; MOVITZ, C.; KARLSSON, A.; DAHLGREN, C. Ligand recognition and activation of formyl peptide receptors in neutrophils. *J Leukoc Biol.*,v. 79 (2), p. 247-256, 2006.

LEME, J.G; SCHAPOVAL, E.E.S. Stimulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by compounds formed in inflamed tissue. *Br. j Pharmacol.*, v. 53, p. 75-78, 1975

GARDNER, J.P.; ZHANG, L. Glucocorticoid modulation of Ca²⁺ homeostasis in human B lymphoblasts. *J Physiol.*, v. 514(Pt 2), p. 385-396, 1999.

GARNIER, M.; BOUJRAD, N.; OKE, B.O.; BROWN, A.S.; RIOND, J.; FERRARA, P.; SHOYAB, M.; SUAREZQUIAN, C.A.; PAPADOPOULOS, V. Diazepam binding inhibitor is a aracrine/autocrine regulator of Leydig cell proliferation and steroidogenesis: action via the peripheral-type benzodiazepine receptor and independent mechanisms. *Endocrinology* v.132, p.444-458, 1993.

GAVISH, M.; KATZ, Y.; BAR-AMI, S.; WEIZMAN, R. Biochemical, physiological, and pathological aspects of the peripheral benzodiazepine receptor. *J Neurochem.*, v.58, p.1589-1601, 1992.

GELATI, M.; CORSINI, E.; DUFOUR, A.; MASSA, G.; GIOMBINI, S.; SOLERO, C.L.; SALMAGGI, A. High-dose methylprednisolone reduces cytokine-induced adhesion molecules on human brain endothelium. *Can J Neurol Sci.*, v. 27(3), p. 241-244, 2000.

GOBBETTI, T.; CENAC, N.; MOTTA, J.P.; ROLLAND, C.; MARTIN, L.; ANDRADE-GORDON, P.; STEINHOFF, M.; BAROCELLI, E.; VERGNOLLE, N. Serine Protease Inhibition Reduces Post-Ischemic Granulocyte Recruitment in Mouse Intestine. *Am J Pathol.*, 2011. [Epub ahead of print]

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

GUIDOTTI, A.; FORCHETTI, C.M.; CORDA, M.G.; KONKEL, D.; BENNETT, C.D.; COSTA, E. Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 80(11), p. 3531-3535, 1983.

HALIN, C.; MORA, J.R.; SUMEN, C.; VON ANDRIAN, U.H. In vivo imaging of lymphocyte trafficking. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, v. 21, p. 581-603, 2005

HAUET, T.; YAO, Z. X.; BOSE, H. S.; WALL, C. T.; HAN, Z.; LI, W.; HALES, D. B.; MILLER, W. L.; CULTY, M.; PAPADOPOULOS, V. Peripheral-type benzodiazepine receptor-mediated action of steroidogenic acute regulatory protein on cholesterol entry into leydig cell mitochondria. *Mol Endocrinol.*, v. 19(2), p. 540-554, 2005.

HEMLER, M.E.; ELICES, M.J.; PARKER, C.; YOSHIKAZU, T. Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions. *Immunol Rev.*, v. 114, p. 45-65, 1990

HENRICKS, P.A.; VAN ESCH, B.; VAN OOSTERHOUT, A.J.; NIJKAMP, F.P. Specific and non-specific effects of beta-adrenoceptor agonists on guinea pig alveolar macrophage function. *Eur J Pharmacol.*, v. 152(3), p. 321-330, 1988

HIRSCH, J.D.; BEYER, C.F.; MALKOWITZ, L.; BEER, B.; BLUME, A.J. Mitochondrial benzodiazepine receptors mediate inhibition of mitochondrial respiratory control. *Mol. Pharmacol.*, v. 34, p. 157-163, 1988a.

HIRSCH, J.D.; BEYER, C.F.; MALKOWITZ, L.; LOULLIS, C.C.; BLUME, A.J. Characterization of ligand binding to mitochondrial benzodiazepine receptors. *Mol. Pharmacol.*, v. 34, p. 164-172, 1988b.

HOGG, N.; PATZAK, I.; WILLENBROCK, F. The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, p. 416-426, 2011.

HOLSBOER, F.; STALLA, G.H.; VON BARDELEBEN, U.; HAMMANN, K.; MULLER, H.; MULLER, O. A. Acute adrenocortical stimulation by recombinant gamma interferon in human controls. *Life Sci.*, v.42, p.1-5, 1988.

HOWARD, D.R.; EAVES, A.C.; TAKEI, F. Lymphocyte function associated antigen (LFA-I) is involved in B cell activation. *J. Immunol.*, v. 136, p. 4013-4018, 1986

HUANG, A.J.; MANNING, J.E.; BANDAK, T.M.; TATAU, M.C.; HANSER, K.R.; SILVERSTEIN, S.C. Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells. *J Cell Biol.*, v. 120(6), p. 1371-1380, 1993

HUMPHRIES, J.D.; BYRON, A.; HUMPHRIES, M.J. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci.*, v. 119, p. 3901-3903, 2006.

IKEZAKI, K.; BLACK, K.L. Stimulation of cell growth and DNA synthesis by peripheral benzodiazepines. *Cancer Lett.*, v. 49, p. 115-120, 1990.

ILAN, N.; MADRI, J.A. PECAM-1: old friend, new partners. *Curr Opin Cell Biol.*, v.15, p. 515-524, 2003

JANETOPOULOS, C.; FIRTEL, R.A. Directional sensing during chemotaxis. *FEBS Lett.*, v. 582(14), p. 2075-2085, 2008.

JURADO, R.; LOPEZ-FLORES, A.; ALVAREZ, A.; GARCÍA-LÓPEZ, P. Cisplatin cytotoxicity is increased by mifepristone in cervical carcinoma: an in vitro and in vivo study. *Oncol Rep.*, v. 22(5), p. 1237-1245, 2009.

KELLY, M.; HWANG, J.M.; KUBES, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *J Allergy Clin Immunol.*, v. 120(1), p. 3-10, 2007

KINANI, S.; BOUCHONNET, S.; MLAN, N.; RIDORDEL, I. A sensitive and selective method for the detection of diazepam and its main metabolites in urine by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatography A.*, v. 1141, p. 131-137, 2007.

KINASHI, T. Integrin regulation of lymphocyte trafficking: lessons from structural and signaling studies. *Adv Immunol.*, v. 93, p. 185-227, 2007

KISHIMOTO, T. K., M. A. JUTILA, E. L. BERG, AND E. C. BUTCHER. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science*, v. 245, p. 1238–1241, 1989.

KITAGAKI, M., ISODA, K.; KAMAA, H.; KOBAYASHI, T.; TSUNODA, S.; TSUTSUMI, Y.; NIIDA, T.; KUJIRAOKA, T.; ISHIGAMI, N.; ISHIHARA, M.; MATSUBARA, O.; OHSUZU, F.; KIKUCHI, M. Novel TNF- α Receptor 1 Antagonist Treatment Attenuates Arterial Inflammation and Intimal Hyperplasia in Mice. *J Atheroscler Thromb.*, 2011. [Epub ahead of print]

KÖNIG, T.; SCHUBERTH, H.J.; LEIBOLD, W.; ZERBE, H. Dexamethasone depresses the expression of L-selectin but not the in vivo migration of bovine neutrophils into the uterus. *Thromb Haemostas.*, v.15;65(7), p. 1227-1241, 2006

KRIEGLSTEIN, C.; GRANGER, D.N. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens.*, v. 14(6), p. 44S-54S, 2001.

KUBES, P. Introduction: The Complexities of leukocyte recruitment. *Immunology.*, v. 14, p. 65-72, 2002.

LACAPERE, J. J.; PAPADOPOULOS, V. Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids*, v.68, p.569-585, 2003.

LAGHI-PASINI, F.; CECCATELLI, L.; CAPECCHI, P.L.; ORRICO, A.; PASQUI, A.L.; DI PERRI, T. Benzodiazepines inhibit in vitro free radical formation from human neutrophils induced by FMLP and A23187. *Immunopharmacol Immunotoxicol.*, v.9(1), p. 101-114, 1987

LAUE L, KAWAI S, BRANDON DD, BRIGHTWELL D, BARNES K, KNAZEK RA, LORIAUX DL, CHROUSOS GP. Receptor-mediated effects of glucocorticoids on inflammation: enhancement of the inflammatory response with a glucocorticoid antagonist. *J Steroid Biochem.*, v. 29(6), p. 591-598, 1988.

LAWSON, C.; WOLF, S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep.*, v. 61(1), p. 22-32, 2009.

LAZZARINI, R.; MALUCELLI B.E.; MUSCARÁ M.N.; DE NUCCI, G.; PALERMO-NETO, J. Reduction of inflammation in rats by diazepam: tolerance development. *Life Sci.*, v. 72(21), p. 2361-2368, 2003

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

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

LAZZARINI, R.; SAKAI, M.; COSTA-PINTO, F.A.; PALERMO-NETO, J. Diazepam decreases leukocyte-endothelium interactions in situ. *Immunopharmacol Immunotoxicol.*, v. 32(3), p. 402-409, 2010.

LE FUR, G.; PERRIER, M.L.; VAUCHER, N.; IMBAULT, F.; FLAMIER, A.; BENAVIDES, J.; UZAN, A.; RENAULT, C.; DUBROEUCQ, M.C.; GUEREMY, C. Peripheral benzodiazepine

binding sites: effect of PK 11195, 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-propyl)-3-isoquinoline carboxamide. *Life Sci.*, v. 32, p. 1839-1847, 1983.

LEE, Y.Y.; MURPHY, P.M.; WANG, J.M. Formyl-peptide receptors revisited. *Trends Immunol.*, v. 23; p. 541–548, 2002

LEECH, M.; HUANG, X.R.; MORAND, E.F.; HOLDSWORTH, S.R. Endogenous glucocorticoids modulate experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 119, p. 161–168, 2000.

LEECH, M.; HUTCHINSON, P.; HOLDSWORTH, S.R.; MORAND, E.F. Endogenous glucocorticoids modulate neutrophil migration and synovial P-selectin but not neutrophil phagocytic or oxidative function in experimental arthritis. *Clin Exp Immunol.*, v. 112(3), p.383-388, 1998.

LENFANT, M.; HAUMONT, J.; HORAK, P.; SEBASTOVA, L.; MASEK, K. *Int. J Immunotherapy.*, vol. 4, p. 125-129, 1988.

LEONE, M.; BOUTIÈRE-ALBANÈSE, B.; VALETTE, S.; CAMOIN-JAU, L.; BARRAU, K.; ALBANÈSE, J.; MARTIN, C.; DIGNAT-GEORGE, F. Cell adhesion molecules as a marker reflecting the reduction of endothelial activation induced by glucocorticoids. *Shock.*, v. 21(4), p. 311-314, 2004.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M.I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.*, v. 7(9), p. 678-689, 2007.

LI, S.; HUANG, N.F.; HSU, S. Mechanotransduction in endothelial cell migration. *J Cell Biochem.*, v. 96(6), p.1110-1126, 2005.

LIANG-SUO, J.; GOMEZ-FLORES, R.; WEBER, R.J. Immunosuppression induced by central action of morphine is not blocked by mifepristone (RU 486). *Life Sci.*, v. 71(22), p. 2595-2602, 2002

LIAO, C.H.; LIN, S.Z.; TSENG, C.P.; DAY, Y.J.; CHANG, C.S.; CHANG, Y.H.; KUO, S.C. A benzodiazepines derived compound, 4-(3-chlorophenyl)-1,3-dihydronaphtho [2,3-b][1,4]diazepin-2-one (ND700C), inhibits fMLP-induced superoxide anion release by activating protein phosphatase 2A in human neutrophils. *Biochem Pharmacol.*, v. 76(12), p. 1728-1739, 2008

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

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

LIGEIRO-OLIVEIRA, A.P.; LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, A.; HAMASATO, E.K.; QUINTEIRO-FILHO, W.; HEBEDA, C.B.; DAMAZO, A.S.; FARSKY, S.H.; TAVARES-DE-LIMA, W.; PALERMO-NETO, J. Amphetamine modulates cellular recruitment and airway reactivity in a rat model of allergic lung inflammation. *Toxicol Lett.*, v. 200(1-2), p. 117-123, 2011.

LIGEIRO DE OLIVEIRA, A.P.; OLIVEIRA-FILHO, R.M, DA SILVA, Z.L.; BORELLI, P.; TAVARES DE LIMA, W. Regulation of allergic lung inflammation in rats: interaction between estradiol and corticosterone. *Neuroimmunomodulation.*, v. 11(1), p. 20-27, 2004.

LIU, J.; RONE, M. B.; PAPADOPOULOS, V. Protein-protein interactions mediate mitochondrial cholesterol transport and steroid biosynthesis. *J Biol Chem.*, v. 281(50), p. 38879-38893, 2006.

LIU, L.; WANG, Y.X.; ZHOU, J.; LONG, F.; SUN, H.W.; LIU, Y et. al. Rapid non-genomic inhibitory effects of glucocorticoids on human neutrophil degranulation. *Inflamm Res.*, v. 54, p. 37-41, 2005.

LONG, F.; WNAG, Y.X.; LIU, I.; ZHOU, J.; CUI, R.Y.; JIANG, C.L. Rapid nongenomic inhibitory effects of glucocorticoids on phagocytosis and superoxide anion production by macrophages. *Steroids*, v. 70, p. 55-61, 2005.

LOTUFO, C.M.; YAMASHITA, C.E.; FARSKY, S.H.; MARKUS, R.P. Melatonin effects on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B4. *Eur J Pharmacol.*, v. 534, p. 258-263, 2006.

LU, N.Z.; CIDOŁOWSKI, J.A. The origins and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Ann NY Acad Sci.*, v. 1024, p. 102-123, 2004.

LUO, B.H.; CARMAN, C.V.; SPRINGER, T. A. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol.*, v. 25, p. 619-647, 2007

MAASER, K.; GRABOWSKI, P.; OEZDEM, Y.; KRAHN, A.; HEINE, B.; STEIN, H.; BUHR, H.; ZEITZ, M.; SCHERÜBL, H. Up-regulation of the peripheral benzodiazepine receptor during human colorectal carcinogenesis and tumor spread. *Clin Cancer Res.*, v.11(5), p. 1751-1756, 2005

MADDEN, K.S.; FELTEN, D.L. Experimental basis for neural-immune interactions. *Physiol Rev.*, v. 75(1), p. 77-106, 1995

MAIER, S.F. Bi-directional immune-brain communication: Implications for understanding stress, pain, and cognition. *Brain Behav Immun.*, v. 17(2), p. 69-85, 2003

MALCHOW, D.; MUTZEL, R.; SCHLATTERER, C. On the role of calcium during chemotactic signalling and differentiation of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Int J Dev Biol.*, v. 40(1), p.135-139, 1996.

MARANGOS, P.J.; PATEL, J.; BOULENGER, J.P.; CLARK-ROSEMBERG, P. *Mol. Pharmacol.*, v. 22, p. 26-28, 1982.

MARC, V.; MARSELLI, P.L. Effect of diazepam on plasma corticosterone levels in the rat. *J. Pharm Pharmacol.*, v. 21, p. 784-786, 1969.

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

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

MASSOCO, C.O.; PALERMO-NETO, J. Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study. *Veter. Immunol. Immunopathology*, v. 95, p. 11-19, 2003.

MATTHEW, E.; LASKIN, J.D.; ZIMMERMAN, E.; WEINSTEIN, J.B.; HSU, K.C. Benzodiazepines have highaffinity binding sites and induce melanogenesis in B16/C3 melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 78, p. 3935-3939, 1981.

MAYADAS, T.N.; CULLERE, X. Neutrophil beta2 integrins: moderators of life or death decisions. *Trends Immunol.*, v.26, p.388–395, 2005.

MENTZER, S.J.; BURAKOFF, S.J.; FALLER, D.V. Adhesion of T lymphocytes to human endothelial cells is regulated by the LFA-I membrane molecule. *J. Cell. Physiol.*, v. 126, p. 285-290, 1986

MULLER, W.A.; WEIGL, S.A.; DENG, X.; PHILLIPS, D.M.; Pecam-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med.*, v. 178, p. 449-460, 1993

NAGASE, H.; MIYAMASU, M.; YAMAGUCHI, M.; KAWASAKI, H.; OHTA, K.; YAMAMOTO, K.; MORITA, Y.; HIRAI, K. Glucocorticoids preferentially upregulate functional CXCR4 expression in eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.*, v. 106(6), p. 1132-1139, 2000.

NAITOH Y.; FUKATA, J.; TOMINAGA, T.; NAKAI, Y.; TAMAI, S.; MORI, K.; IMURA, Interleukina- 6 stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone in conscious, freelymoving rats. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.155, p.1459-1463, 1988.

NAVARRO, K.C L.T. Estudo dos efeitos imunológicos de neurotransmissores (NE e DA) e glicocorticóide (DEX) em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos sadios – Tese de Doutorado, Minas Gerais, 2005.

NEWMAN, P.J.; NEWMAN, D.K. Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v. 23, p. 953–964, 2003.

NI, N.C.; YAN, D.; BALLANTYNE, L.L.; BARAJAS-ESPINOSA, A.; STAMAND, T.; PRATT, D.A.; FUNK, C.D. A selective cysteinyl leukotriene receptor 2 antagonist blocks myocardial ischemia/reperfusion injury and vascular permeability in mice. *J Pharmacol Exp Ther.*, v. 339(3), p.768-778, 2011.

NIGGLI, V. Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. *Int J Biochem Cell Biol.*, v. 35(12), p. 1619-1638, 2003.

OBINATA, H.; YOKOMIZO, T.; SHIMIZU, T.; IZUMI, T. Glucocorticoids up-regulate leukotriene B4 receptor-1 expression during neutrophilic differentiation of HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, v. 309(1), p. 114-119, 2003.

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

OH, U.; FUJITA, M.; IKONOMIDOU, V.N.; EVANGELOU, I.E.; MATSUURA, E.; HARBERTS, E.; FUJIMURA, Y.; RICHERT, N.D.; OHAYON, J.; PIKE, V.W.; ZHANG, Y.; ZOGHBI, S.S.; INNIS, R.B.; JACOBSON, S.J. Translocator protein PET imaging for glial activation in multiple sclerosis. *Neuroimmune Pharmacol.*, v. 6(3), p. 354-361, 2011.

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

OSTUNI, M.A.; DUCROC, R.; PÉRANZI, G.; TONON, M.C.; PAPADOPOULOS, V.; LACAPERE, J.J. Translocator protein (18 kDa) ligand PK 11195 induces transient mitochondrial Ca²⁺ release leading to transepithelial Cl⁻ secretion in HT-29 human colon cancer cells. *Biol Cell.*, v. 99(11), p. 639-647, 2007

PALERMO-NETO, J.; FONSECA, E.S.; QUINTEIRO-FILHO, W.M.; CORREIA, C.S.; SAKAI, M. Effects of individual housing on behavior and resistance to Ehrlich tumor growth in mice. *Physiol. Behav.*, v. 95(3), p. 435-440, 2008.

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

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

PAPADOPOULOS, V.; BARALDI, M.; GUILARTE, T.R.; KNUDSEN, T.B.; LACAPÈRE, J.J.; LINDEMANN, P.; NOREMBERG, M.D.; NUTT, D.; WEIZMAN, A.; ZHANG, M.R.; GAVISH, M. Translocator Protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 27, p. 402–409, 2006.

PAPADOPOULOS, V.; LECANU, L. Translocator protein (18 kDa) TSPO: an emerging therapeutic target in neurotrauma. *Exp Neurol.*, v. 219(1), p. 53-57, 2009

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

PAPADOPOULOS, V.; WIDMAIER, E.P.; AMRI, H.; ZILZ, A.; LI, H.; CULTY, M.; CASTELLO, R.; PHILIP, G.H.; SRIDARAN, R.; DRIEU, K. In vivo studies on the role of the peripheral benzodiazepine receptor (PBR) in steroidogenesis. *Endocr Res.*, v. 24(3-4), p. 479-487, 1998

PAWLIKOWSKI, M.; LYSON, K.; KUNERT-RADEK, J.; STEPIEN, H. Effect of benzodiazepines on the proliferation of mouse spleen lymphocytes in vitro. *J Neurol Trans.*, v. 73, p. 161-166, 1988.

PEERS, S.H.; MOON, D.; FLOWER, R.J. Reversal of the anti-inflammatory effects of dexamethasone by the glucocorticoid antagonist RU 38486. *Biochem Pharmacol.*, v.37(3), p. 556-557, 1988

PEERS, S.H.; SMILLIE, F.; ELDERFIELD, A.J.; FLOWER, R.J. Glucocorticoid-and non-glucocorticoid induction of lipocortins (annexins) 1 and 2 in rat peritoneal leucocytes in vivo. *Br J Pharmacol.*, v. 108(1), p. 66-72, 1993.

PERRETI, M.; BECHERUCCI, C.; SCAPIGLIATI, G.; PARENTE, L. The effect of adrenalectomy on interleukin-1 release in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol.*, v. 98(4), p. 1137-1142, 1989.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.*, v. 9(1), p. 62-70, 2009

PIERRE, C.; SYLVAINE, G.; ANTHONY, S.B. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochem Int.*, v. 40, p. 475-486, 2000.

PINHEIRO, M.L.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; RIBEIRO, A.; SAKAI, M.; BERNARD, M.M.; PALERMO-NETO, J. Long-term maternal separation differentially alters serum corticosterone levels and blood neutrophil activity in a/j and C57BL/6 mouse offspring.. *Neuroimmunomodulation.*, v. 18(3), p. 184-90, 2011

PIPITONE, N.; SINHA, M.; THEODORIDIS, E.; GOULDING, N.; HALL, M.; LANCHBURY, J.; CORRIGALL, V.; PANAYI, G.; PITZALIS, C. The glucocorticoid inhibition of LFA-1 and CD2

expression by human mononuclear cells is reversed by IL-2, IL-7 and IL-15. *Eur J Immunol.*, v. 31(7), p. 2135-2142, 2001

PITZALIS, C.; PIPITONE, N.; PERRETTI, M. Regulation of leukocyte endothelial interactions by glucocorticoids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 966, p. 108-118, 2002

PRIVRATSKY, J.R.; NEWMAN, D. K.; NEWMAN, P. J. PECAM-1: conflicts of interest in inflammation. *Life Sci.*, v. 87(3-4), p. 69-82, 2010

RABIET, M.J.; HUET, E.; BOULAY, F. The N-formyl peptide receptors and the anaphylatoxin C5a receptors: An overview. *Biochimie.*, v. 89, p. 1089-1106, 2007

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

RANKIN, J.A. Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clin Issues*, v. 15(1), p. 3-17, 2004.

REICHARDT, H.M.; TUCJERMANN, J.P.; GOTTLICHER, M.; VUJIC, M.; WEIH, F.; ANGEL, P et. al. Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *EMBO J.*, v. 20, p. 7168-7173, 2001.

RIDLEY, A.J.; SCHWARTZ, M.A.; BURRIDGE, K.; FIRTEL, R.A.; GINSBERG, M.H.; BORISY, G.; PARSONS, J.T.; HORWITZ, A.R. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, v. 302, p.1704-1709, 2003.

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

RISS, J.; CLOYD, J.; GATES, J; COLLINS, S. Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics. *Acta Neuro Scand.*, v. 118(2), p. 69-86, 2008.

ROCCA, P.; BELLONE, G.; BENNA, P.; BERGAMASCO, B.; RAVIZZA, L.; FERRERO, P. Peripheral-type benzodiazepine receptors and diazepam binding inhibitor-like immunoreactivity distribution in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunopharmacol.*, v. 25, p. 163-178, 1993.

RONE, M.B.; FAN, J.; PAPADOPOULOS, V..Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states.. *Biochim Biophys Acta.*, v. 1791(7), p. 646-658, 2009.

ROSS, G.D. Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/alphaMbeta2-integrin glycoprotein. *Crit Rev Immunol.*, v. 20, p.197-222, 2000.

ROVAI, L.E.; HERSCHMAN, H.R.; SMITH, J.B. The murine neutrophil chemoattractant chemokines LIX, KC, and MIP-2 have distinct induction kinetics, tissue distributions, and tissue-specific sensitivities to glucocorticoid regulation in endotoxemia. *J. Leukoc. Biol.*, v. 64, p. 494-502, 1998

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

RUGG, E.L.; BARNETT, D.B.; NAHORSKI, S.R. Coexistence of beta1 and beta2 adrenoceptors in mammalian lung: evidence from direct binding studies. *Mol Pharmacol.*, v. 14(6), p. 996-1005, 1978

RUIZ, I.; OFFERMANN, J.; LANCTOT, K. L.; BUSTO, U. Comparative study on benzodiazepine use in Canada and Chile. *J Clin Pharmacol.* v. 33, p.124, 1993.

RUOSLAHTI, E.; NOBLE, N.A.; KAGAMI, S.; BORDER, W.A. Integrins. *Kidney Int Suppl.*, 44, S17-22, 1994.

RUPPRECHT, R.; PAPADOPOULOS, V.; RAMMES, G.; BAGHAI, T.C.; FAN, J.; AKULA, N.; GROVER, G.; ADAMS, D.; SCHUMACHER, M. Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, v. 9(12), p. 971-988, 2010.

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

SAKAI, M.; FONSECA, E.S.; DAGLI, M.L.; PALERMO-NETO, J. Diazepam effects on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. *Life Sci.*, v. 78(16), p. 1777-1783, 2006a.

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

SÁ-ROCHA, V.M.; SÁ-ROCHA, L.C.; PALERMO-NETO, J. Variations in behavior, innate immunity and host resistance to B16F10 melanoma growth in mice that present social stable hierarchical ranks. *Physiol Behav.*, v. 88(1-2), p. 108-115, 2006

SCAPINI, P., LAPINET-VERA, J.A., GASPERINI, S., CALZETTI, F., BAZZONI, F., CASSATELLA, M.A. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev.*, v. 177, p. 195-203, 2000.

SCARF, A.M.; KASSIOU, M. The translocator protein. *J. Nuc. Med.*, v. 52(6), p. 677-680, 2011.

SCHENKEL, A.R.; CHEW, T.W.; CHLIPALA, E.; HARBORD, M.W.; MULLER, W.A. Different susceptibilities of PECAM-deficient mouse strains to spontaneous idiopathic pneumonitis. *Exp Mol Pathol.*, v. 81(1), p. 23-30, 2006.

SCHLUMPF, M.; PARMAR, R.; LICHTENSTEIGER, W. Prenatal benzodiazepine immunosuppression: Possible involvement of peripheral benzodiazepine site. *Developmental Pharmacology Therapeutics.*, v.15, p. 178-185, 1990.

SCHLUMPF, M.; PARMAR, R.; SCHREIBER, A.; BÜTIKOFER, H.R. Nervous and immune system as targets for developmental effects of benzodiazepines: a review of recent studies. *Developmental Pharmacology and Therapeutics*, v. 18, p. 145-158, 1992.

SCHMIDT, R.E.; BARTLEY, G.; LEVINE, H.; SCHLOSSMAN, S.F.; RITZ, J. Functional characterization of LFA-I antigens in the interaction of human NK clones and target cells. *J. Immunol.* v. 135, p. 1020-1025, 1985.

SCHMID-SCHONBEIN, G.W.; USAMI, S.; SKALAK, R.; CHIEN, S. The interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and postcapillary vessels. *Microvasc. Res.*, v.19, p.45-70, 1980.

SCHREIBER, A.A.; FREI, K.; LICHTENSTEIGER, W.; SCHLUMPF, M. The effect of prenatal diazepam exposure on TNF-alpha production by rat splenocytes. *Agents Actions.*, v. 38(3-4), p. 265-272, 1993

SCHWARTZ, D.; WONG, R.C.; CHATILA, T.; ARNAOUT, A.; MILLER, R.; GEHA, R. Proliferation of highly purified T cells in response to signalling via surface receptors requires cell-cell contact. *J. Clin. Immunol.* v. 9, p. 151-158, 1989.

SELMECZY, Z.; SZELENYI, J.; VIZI, E. S. Intact noradrenaline transporter is needed for the sympathetic fine-tuning of cytokine balance. *Eur J Pharmacol.*, v. 469(1-3), p. 175-181, 2003

SHANY, E.; HOCHHAUSER, E.; HALPERN, P.; VIDNE, B.; GAVISH, M.; GELLER, E.; HASHARONI, A.; BARAK, Y.; YAKIREVICH, V. Ro5-4864 has a negative inotropic effect on human trial muscle strips that is not antagonized by PK 11195. *Eur J Pharmacol.*, v.253, p.231-236, 1994.

SHARP, BM.; MATTA, S. G.; PETERSON, P.K.; NEWTON, R.; CHAO, C.; MCALLEN, K. Tumor necrosis factor-alpha is a potent ACTH secretagogue: comparison to interleukina-1 beta. *Endocrinology.*, v.124, p.3131-3133, 1989.

SHOWELL, H.J.; FREER, R.J.; ZIGMOND, S.H.; SCHIFFMANN, E.; ASWANIKUMAR, S.; CORCORAN, B.; BECKER, E. L. The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal enzyme secretion for neutrophils, *J. Exp. Med.*, v. 143, p. 1155-1169, 1976

SILVA, F.R.; LAZZARINI, R.; DE SA-ROCHA, L.C.; MORGULISM M.S.; DE OLIVEIRA MASSOCO, C.; PALERMO-NETO, J. Effects of acute and long-term diazepam administrations on neutrophil activity: a flow cytometric study. *Euro. J. of Pharmacology* v. 478, p.97-104, 2003.

SILVA, F. R., Efeitos de benzodiazepínicos sobre a atividade de neutrófilos de ratos avaliados por citometria de fluxo – tese de doutorado, São Paulo, 2003.

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

SMALLEY, D. M.; LEY, K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J. Cell. Mol. Med.*, v. 9(2), p. 255-266, 2005.

SMITH, C.W. Adhesion molecules and receptors. *J Allergy Clin Immunol.*, v. 121(2), p. S375-S379, 2008.

SOLOMON, G.F. Immune and Nervous System Interactions. The fund for sychoneuroimmunology. (www.pnirs.org), 1999.

SOLOWIEJ, A.; BISWAS, P.; GRAESSER, D.; MADRI, J.A. Lack of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 attenuates foreign body inflammation because of decreased angiogenesis. *Am J Pathol.*, v. 162, p. 953–962, 2003

SPERANDIO, M. Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *FEBS J.*,v. 273, p. 4377-4389, 2006

SPRINGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, v. 76(2), p. 301-314, 1994.

STELLATO, C. Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids. *Proc Am Thorac Soc.*, v. 1 (3), p. 255-263, 2004.

STILLIE, R.; FAROOQ, S.M.; GOE+RDON, J.R.; STADNYK, A.W. The functional significance behind expressing two IL-8 receptor types on PMN. *J Leukoc Biol.*, v. 86(3), p. 529-543, 2009.

SUGIMOTO, Y.; OGAWA, M.; TAI, N.; KAMEI, C. Inhibitory effects of glucocorticoids on rat eosinophil superoxide generation and chemotaxis. *Int Immunopharmacol.*, v. 3(6), p. 845-852, 2003.

SWANEY, K.F.; HUANG, C.H.; DEVREOTES, P.N. Eukaryotic chemotaxis: a network of signaling pathways controls motility, directional sensing and polarity. *Ann Rev Biophys.*, v. 39, p. 265-289, 2010.

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

TAILOR, A.; TOMLINSON, A.; SALAS, A.; PANÉS, J.; GRANGER, D.N.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Dexamethasone inhibition of leucocyte adhesion to rat mesenteric postcapillary venules: role of intercellular adhesion molecule 1 and KC. *Gut.*, v. 45(5), p. 705-712, 1999.

TJANDRA K, KUBES P, RIOUX K, SWAIN MG. Endogenous glucocorticoids inhibit neutrophil recruitment to inflammatory sites in cholestatic rats. *Am J Physiol.*, v. 270(5 Pt 1), p. G821-G825, 1996.

TORRES, S.R.; NARDI, G.M.; FERRARA, P.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M.; FARGES, R.C. Potential role of peripheral benzodiazepine receptors in inflammatory responses. *Eur J Pharmacol.*, v. 385(2-3), 1999.

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

TRACEY, K.J. The inflammatory reflex. *Nature.*, v. 420(6917), p. 853-859, 2002

TURNBULL, A.V.; RIVIER, C.L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of actions. *Physiol Rev.*, v.79, p.1-71, 1999.

VAPORCIYAN, A.A.; DELISSER, H.M.; YAN, H.C.; MENDIGUREN, I.I.; THOM, S.R.; JONES, M.L.; WARD, P.A.; ALBEDA, S.M. Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science*, v. 262, p. 1580-1582, 1993

VEENMAN, L.; GAVISH, M. Peripheral-type benzodiazepine receptors: their implication in brain disease. *Drug Dev. Res.*, v. 50, p. 355-370, 2000

VEENMAN, L.; PAPADOPOULOS, V.; GAVISH, M. Channel-like functions of the 18-kDa translocator protein (TSPO): regulation of apoptosis and steroidogenesis as part of the host-defense response. *Curr Pharm Des.*, v. 13(23), 2007.

VERMA, A.; NYE, J.S.; SNYDER, S.H. Porphyrins are endogenous ligands for the mitochondrial (peripheral-type) benzodiazepine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 84(8), p. 2256-2260, 1987.

VLODAVSKY, E.; SOUSTIEL, J.F. Immunohistochemical expression of peripheral benzodiazepine receptors in human astrocytomas and its correlation with grade of malignancy, proliferation, apoptosis and survival. *J Neurooncol.*, v. 81(1), p. 1-7, 2007

VON ANDRIAN, U.H.; HASSLEN, S.R.; NELSON, R.D.; ERLANDSEN, S.L.; BUTCHER, E. C. A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell.*, v. 82, p. 989-999, 1995

WALSH, L.J.; LAVKER, R.M.; MURPHY, G.F. Determinants of immune cell trafficking in the skin. *Lab Invest.*, v. 63(5), p. 592-600, 1990.

WEBER, P.S.; TOELBOELL, T.; CHANG, L.C.; TIRRELL, J.D.; SAAMA, P.M.; SMITH, G.W.; et. al. Mechanisms of glucocorticoid-induced down regulation of neutrophil L-selectin in cattle: evidence for effects at the gene-expression level and primarily on blood neutrophils. *J Leukoc Biol.*, v. 75, p. 815–827, 2004.

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

WENZEL-SEIFERT, K.; ARTHUR, J. M.; LIU, H. Y.; SEIFERT, R. Quantitative analysis of formyl peptide receptor coupling to G(i)alpha(1) G(i)alpha(2), and G(i)alpha(3). *J Biol Chem.*, v. 274, p. 33259–33266, 1999.

WHELLER, S.K.; PERRETTI, M. Dexamethasone inhibits cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 up-regulation on endothelial cell lines. *Eur J Pharmacol.*, v. 331, p. 65–71, 1997.

WIEDLE, G.; DUNON, D.; IMHOF, B.A. Current concepts in lymphocyte homing and recirculation. *Crit Rev Clin Lab Sci.*, v. 38(1), p. 1-31, 2001.

WOODFIN, A.; VOISIN, M.B.; NOUSHARGH, S. PECAM-1: A Multi-Functional Molecule in Inflammation and Vascular Biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v. 27, p. 2514-2523, 2007.

WOODS, J.H., KATZ, J.L., WINGER, G. Benzodiazepines: Use, abuse, and consequences. *Pharmacol. Rev.*, Baltimore, v.44(2), p.151-347, 1992.

WU, Y.; STABACH, P.; MICHAUD, M.; MADRI, J.A. Neutrophils lacking platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 exhibit loss of directionality and motility in CXCR2-mediated chemotaxis. *J Immunol.*, v. 175(6), p. 3484-3491, 2005.

ZANCHI, N.E.; FILHO, M.A.; FELITTI, V.; NICASTRO, H.; LORENZETI, F.M.; LANCHI, A.H. Glucocorticoids: extensive physiological actions modulated through multiple mechanisms of gene regulation.. *J Cell Physiol.*, v. 224(2), p. 311-315, 2010.

ZHAO, L.C.; EDGAR, J.B.; DAILEY, M.O. Characterization of the rapid proteolytic shedding of murine L-selectin. *Dev Immunol.*, v. 8(3-4), p. 267-277, 2001.

ZARBOCK, A.; POLANOWSKA-GRABOWSKA, R.K.; LEY, K. Platelet-neutrophil interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev.* v. 21, p. 99-111, 2007.

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

ZAVALA, F.; HAUMONT, J.; LENFANT, M. Interactions of benzodiazepines with mouse macrophages. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 106, p. 561-566, 1984.

ZHANG, S.; SHEN. Z.; HU, G.; LIU, R.; ZHANG, X. Effects of endogenous glucocorticoids on allergic inflammation and T(H)1 /T(H)2 balance in airway allergic disease. *Ann Allergy Asthma Immunol.*, v.103(6), p. 525-534, 2009.

ZHENG, J.; BOISGARD, R.; SIQUIER-PERNET, K.; DECAUDIN, D.; DOLLÉ, F.; TAVITIAN, B. Differential expression of the 18 kDa translocator protein (TSPO) by neoplastic and inflammatory cells in mouse tumors of breast cancer, *Mol. Pharm.*, v. 8(3), p. 823-832, 2011.

ZIGMOND, S.H.; LEVITSKY, H.I.; KREEL, B.J. Cell polarity: an examination of its behavioral expression and its consequences for polymorphonuclear leukocyte chemotaxis. *J Cell Biol.*, v. 89, p. 585-592, 1981.

ZISTERER, D.M.; GORMAN, A.M.C.; WILLIAMS, D.C.; MURPHY, M.P. The effects of peripheral-type benzodiazepine acceptor ligands, Ro5 4864 and PK 11195, on mitochondrial respiration. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.*, v.14, p.85-90, 1992.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Mecanismos do diazepam e desmetildiazepam sobre a interação leucócito-endotélio: participação de receptores benzodiazepínicos periféricos e de receptores glicocorticóides", protocolado sob o nº1690/2009, utilizando 150 (cento e cinquenta) ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Palermo Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 09 de setembro de 2009.

We certify that the Research "Diazepam and desmethyldiazepam mechanisms on leukocyte-endothelial interaction: role of peripheral benzodiazepine receptors and glucocorticoid receptors", utilizing 150 (one hundred fifty) rats, protocol number 1690/2009, under the responsibility Prof. Dr. João Palermo Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 09/09/09.

São Paulo, 10 de setembro de 2009

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**
Comissão de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA/FCF/121/2009

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Mecanismos do diazepam e desmetildiazepam sobre a interação leucócito-endotélio: participação de receptores benzodiazepínicos periféricos e de receptores glicocorticóides" (Protocolo nº 262), de responsabilidade da pesquisadora **Camila Bento de Lima** sob a orientação do(a) Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL/COBEA e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA, desta Faculdade, em 7 de dezembro de 2009.

A CEEA recomenda, somente, para não exceder o volume da administração da gavagem.

São Paulo, 16 de dezembro de 2009.

Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri
Vice-Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEEA/FCF/USP