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

Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam sobre parâmetros imunológicos de ratos

Camila Bento de Lima

Orientadora:
Profa. Dra. Regina Lúcia de Moraes Moreau

São Paulo, 2009

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

Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam sobre parâmetros imunológicos de ratos

Camila Bento de Lima

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Regina Lúcia de Moraes Moreau

São Paulo
2009

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

L732e Lima, Camila Bento de
Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam
sobre parâmetros imunológicos de ratos / Camila Bento de
Lima. -- São Paulo, 2008.
134p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Moreau, Regina Lúcia de Moraes

1. Imunologia : Toxicologia I. T. II. Moreau, Regina Lúcia
de Moraes, orientador.

615.9 CDD

Camila Bento de Lima

Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam sobre
parâmetros imunológicos de ratos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Regina Lúcia de Moraes Moreau
orientador

1o. examinador

2o. examinador

São Paulo, 2009

"Ambição é o caminho para o sucesso. Persistência é o
veículo no qual se chega lá."

Bill Eardley

**À minha mãe Elisa, ao meu pai Doniseth e
à minha avó Maria Augusta (in memorian)**

A jornada pareceu árdua e difícil. O desânimo tentou se apossar por vezes. Porém, todas essas dificuldades são mais facilmente transpostas quando, além dos nossos próprios passos, outros pés compartilham também desta aventura. Vocês foram o estímulo do início e uma ajuda constante, concreta e infatigável ao longo desses anos. Como muito do que fiz na vida, creio que este também sirva para lhes mostrar não ter sido completamente perdidas a educação e a formação que se esforçaram para me proporcionar. Obrigada por terem suportado os encargos dos meus estudos, todos os meus momentos de mau-humor, angústias e desesperos, bem como pela confiança que me incutiram ao longo dos meus anos de vida. Não tenho dúvidas de que é a vocês que eu devo tudo aquilo que sou hoje. Obrigada por fazerem parte da minha vida, por me incentivarem em todos os momentos e, principalmente, por me amarem. AMO VOCÊS!!!

Primeiramente agradeço a Deus por ter me guiado a mais essa conquista. Sempre me acompanhando e iluminando meu caminho. Não foi uma caminhada breve, mas uma travessia sem fim, principalmente, pelas intercorrências de toda ordem que me atropelaram, mas que ao invés de me deterem, impulsionaram-me com mais força.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP, por me acolherem e cederem o espaço para que eu pudesse realizar este trabalho.

À coordenadora do programa de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky, pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. João Palermo-Neto, por sua valiosíssima orientação, apoio, dedicação e, principalmente, paciência durante o desenvolvimento deste trabalho. A você, professor, minha eterna gratidão.

À Profa. Dra. Regina Lúcia de Moraes Moreau, agradeço profundamente por ter assumido a orientação desta tese e pela confiança e apoio prestado ao longo do curso.

Ao Fabio Ribeiro, pelo apoio desde o início da minha caminhada, compartilhando dos meus ideais, incentivando-me a prosseguir nesta jornada, fossem quais fossem os obstáculos a ultrapassar.

À Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa e à Profa. Dra. Silvana Lima Gorniak, chefes do Departamento de Patologia (VPT), por abrirem as portas do departamento e me permitirem realizar meus ideais de profissão e vida.

Aos Professores do programa de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas e, principalmente, ao Prof. Dr. Mauricio Yonamine, pelos ensinamentos recebidos e valiosa contribuição.

À Profa. Dra. Primavera Borelli e ao Prof. Dr. Ricardo Fock, pela valiosa colaboração e auxílio no desenvolvimento desta tese.

À Monica Sakai e à Andréia Latorre, por suas inúmeras colaborações técnicas e científicas durante o desenvolvimento deste trabalho, por toda a sua dedicação, atenção e amizade. Meninas, nem sei como agradecer-las, tamanha a importância para este trabalho e, principalmente, para mim. Obrigada por me agüentarem durante horas e horas de experimentos inacabáveis e durante todos os meus momentos de desespero.

Aos novos amigos Camila, Carol, Felipe, Luciana Cunha e Luciana Lippi que conquistei durante a jornada deste trabalho e que, com toda a certeza, me acompanharão durante as próximas etapas de minha vida. Saibam que todos vocês foram fundamentais nesta minha conquista, acolhendo-me, incentivando-me, acalmando-me e animando-me quando mais precisei de vocês.

Aos amigos Mariana, Janaína, Ighor e Danilo que conseguiram agüentar meus momentos de desespero e angústia, entender minha ausência e jamais me abandonaram.

Ao Rodrigo, secretário do Prof. João, por todos os auxílios oferecidos e momentos de diversão.

A todos do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do VPT (FMVZ-USP) e do Laboratório de Análises Toxicológicas (FCF-USP), pela ajuda e companhia durante a realização dos experimentos.

Aos funcionários do Biotério Cláudia, Herculano, Idalina, Nelsinho e Rosiris por fornecerem os animais utilizados nos experimentos e auxiliarem no cuidado destes.

Aos colegas da pós-graduação e, principalmente, do Grupo de Neuroimunomodulação que me acolheram e me acompanharam durante esses anos. Agradeço pelas contribuições científicas, ajuda e incentivos.

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

Ao CNPq e à FAPESP, pelo apoio financeiro.

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Neuroimunomodulação	21
2.2 Benzodiazepínicos	26
2.2.1 Receptores benzodiazepínicos periféricos (PBR)	28
2.2.2 Benzodiazepínicos e o Sistema Imune	31
2.3 Microextração em Fase Líquida	36
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo geral	40
2.2 Objetivos específicos.....	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 Animais	42
4.2 Reagentes	42
4.3 Soluções	44
4.4 Administração do diazepam e Grupos Experimentais	46
4.5 Avaliação do Hemograma e Contagem de Reticulócitos	47
4.6 Avaliação do Peso Relativo do Baço, do Fígado e das Adrenais	48
4.7 Avaliação da Celularidade do Baço	48
4.8 Avaliação Global das Células da Medula Óssea	48
4.9 Dosagem dos Níveis Séricos de Corticosterona	49
4.9.1 Coleta de sangue para obtenção do soro	49
4.9.2 Dosagem da Corticosterona	49
4.10 Citometria de fluxo	49
4.10.1 Avaliação da Viabilidade de Linfócitos	50
4.10.2 Avaliação da Proliferação de Esplenócitos.....	51
4.10.2a Obtenção dos Esplenócitos	51
4.10.2b Avaliação da Proliferação dos Esplenócitos	51

4.10.3 Avaliação da Fenotipagem de Linfócitos.....	52
4.10.4 Quantificação de receptores benzodiazepínicos periféricos (PBR)	52
4.11 Dosagem dos Níveis Plasmáticos de Diazepam	53
4.11.1 Equipamentos	53
4.11.2 Condições Cromatográficas	54
4.11.3 Amostras de Plasma	54
4.11.3a Preparação da Amostra	54
4.11.4 Validação do Método	55
4.11.4a Limite de Detecção e Quantificação	56
4.11.4b Linearidade	56
4.11.4c Precisão intra-ensaio e interensaio	56
4.11.4d Exatidão intra-ensaio e interensaio	57
4.11.4e Recuperação	57
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS	59
6.1 EXPERIMENTO 1: Avaliação dos efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 1 mg/kg sobre o hemograma, contagem de reticulócitos, peso relativo do baço, fígado e adrenais, celularidade do baço e células da medula óssea	59
6.2 EXPERIMENTO 2: Avaliação dos efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 1 mg/kg sobre a viabilidade de linfócitos do sangue periférico	67
6.3 EXPERIMENTO 3: Avaliação dos efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 1 mg/kg sobre a proliferação de esplenócitos	70
6.4 EXPERIMENTO 4: Avaliação dos efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 1 mg/kg sobre a fenotipagem de linfócitos do sangue periférico	73
6.5 EXPERIMENTO 5: Avaliação dos efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 1 mg/kg sobre os níveis séricos de corticosterona	77

6.6 EXPERIMENTO 6: Avaliação dos efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre o hemograma, contagem de reticulócitos, peso relativo do baço, fígado e adrenais, celularidade do baço e células da medula óssea	77
6.7 EXPERIMENTO 7: Avaliação dos efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre a viabilidade de linfócitos do sangue periférico	88
6.8 EXPERIMENTO 8: Avaliação dos efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre a proliferação de esplenócitos	90
6.9 EXPERIMENTO 9: Avaliação dos efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre a fenotipagem de linfócitos do sangue periférico	91
6.10 EXPERIMENTO 10: Avaliação dos efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre os níveis séricos de corticosterona	94
6.11 EXPERIMENTO 11: Avaliação da quantidade de receptores benzodiazepínicos periféricos (PBR) presentes em leucócitos de ratos do sangue periférico e do baço.....	95
6.12 – EXPERIMENTO 12: Determinação dos níveis plasmáticos de diazepam e desmetilzidazepam, de ratos tratados experimentalmente com diazepam 10mg/kg, por meio da técnica de LPME e cromatografia gasosa acoplada ao detector nitrogênio-fósforo (GC/NPD)	96
7 DISCUSSÃO	102
8 CONCLUSÕES	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
ANEXOS	133

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Representação esquemática da SDME	37
FIGURA 2 – Esquema de uma placa de cultura celular de 96 poços; Esquema utilizado para os experimentos de cultura de linfócitos esplênicos	52
FIGURA 3 – Sistema bifásico de microextração em fase líquida (LPME) empregado	55
FIGURA 4 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 1 mg/kg sobre o hemograma e a contagem de reticulócitos	60
FIGURA 5 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 1 mg/kg sobre o diferencial das células sanguíneas	61
FIGURA 6 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 1 mg/kg sobre esplenograma de ratos.....	64
FIGURA 7 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 1 mg/kg sobre mielograma de ratos.....	66
FIGURA 8 – Citograma de leucócitos circulantes de animais controles; R1= linfócitos; R2= monócitos; R3= neutrófilos	67
FIGURA 9 – Histograma de leucócitos incubados com Anexina V-FITC	68
FIGURA 10 – Histograma de leucócitos incubados com Iodeto de propídeo	68
FIGURA 11 – Citograma de linfócitos periféricos incubados com Anexina V-FITC e PI	69
FIGURA 12 – Citograma e histograma de células sem estímulo (basal)	71
FIGURA 13 – Citograma e histograma de células após o estímulo com o mitógeno PHA	71
FIGURA 14 – Citograma e histograma de células após o estímulo com o mitógeno LPS	71
FIGURA 15 – Citograma e histograma de células após o estímulo com o mitógeno ConA	72
FIGURA 16 – Histograma de leucócitos incubados com CD8-PE	74
FIGURA 17 – Histograma de leucócitos incubados com CD45-FITC	74

FIGURA 18 – Citograma de linfócitos periféricos incubados com CD3-FITC e CD4-PE	75
FIGURA 19 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 1 mg/kg sobre a fenotipagem de linfócitos do sangue periférico	76
FIGURA 20 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre o hemograma e a contagem de reticulócitos	79
FIGURA 21 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre o diferencial das células sanguíneas	80
FIGURA 22 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre o peso relativo do baço, do fígado e das adrenais	82
FIGURA 23 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre a celularidade do baço e da medula óssea	83
FIGURA 24 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre o esplenograma de ratos.....	85
FIGURA 25 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre o mielograma de ratos.....	87
FIGURA 26 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre a viabilidade de linfócitos do sangue periférico	90
FIGURA 27 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre a fenotipagem de linfócitos do sangue periférico	93
FIGURA 28 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre a corticosterona sérica de ratos	95
FIGURA 29 – Avaliação da quantidade de receptores benzodiazepínicos periféricos (PBR) presentes em leucócitos do sangue periférico e do baço de ratos	96
FIGURA 30 – Perfil cromatográfico pela análise por LPME GC/NPD de plasma adicionado de diazepam, desmetildiazepam e prazepam	97
FIGURA 31 – Estudo da linearidade do diazepam na faixa de concentração de 25 a 2000 ng/mL. Curva de calibração, equação da reta e coeficiente de correlação linear	98
FIGURA 32 – Estudo da linearidade do desmetildiazepam na faixa de concentração de 25 a 2000 ng/mL	99

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 1mg/kg sobre o hemograma e a contagem de reticulócitos	59
TABELA 2 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 1mg/kg sobre o diferencial das células sanguíneas	61
TABELA 3 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 1mg/kg sobre o peso relativo do fígado, baço e adrenais	62
TABELA 4 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 1mg/kg sobre a celularidade do baço e da medula óssea	62
TABELA 5 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 1mg/kg sobre o esplenograma dos animais.....	63
TABELA 6 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 1mg/kg sobre o mielograma dos animais.....	65
TABELA 7 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 1 mg/kg sobre a viabilidade de linfócitos periféricos	70
TABELA 8 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 1 mg/kg sobre a proliferação de esplenócitos	72
TABELA 9 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 1mg/kg sobre a fenotipagem de linfócitos do sangue periférico	76
TABELA 10 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 1mg/kg sobre os níveis séricos de corticosterona	77
TABELA 11 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 10mg/kg sobre o hemograma e a contagem de reticulócitos	78
TABELA 12 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 10 mg/kg sobre o diferencial das células sanguíneas	80
TABELA 13 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 10 mg/kg sobre o peso relativo do baço, do fígado e das adrenais	81
TABELA 14 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 10 mg/kg sobre a celularidade do baço e da medula óssea	83

TABELA 15 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 10 mg/kg sobre o esplenograma dos animais	84
TABELA 16 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 10 mg/kg sobre o mielograma dos animais	86
TABELA 17 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 10mg/kg sobre a viabilidade de linfócitos periféricos	89
TABELA 18 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 10mg/kg sobre a proliferação de esplenócitos	91
TABELA 19 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 10mg/kg sobre a fenotipagem de linfócitos do sangue periférico	92
TABELA 20 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 1mg/kg sobre os níveis séricos de corticosterona	94
TABELA 21 – Avaliação da quantidade de receptores benzodiazepínicos periféricos (PBR) presentes em leucócitos do sangue periférico e baço de ratos	96
TABELA 22 – LOD (Limite de detecção) e LOQ (Limite de quantificação) para diazepam e desmetildiazepam	97
TABELA 23 – Precisão intra-ensaio e interensaio para o diazepam e o desmetildiazepam	99
TABELA 24 – Exatidão intra-ensaio e interensaio para o diazepam e o desmetildiazepam	99
TABELA 25 – Recuperação obtida para o diazepam e o desmetildiazepam	100
TABELA 26 – Concentração plasmática de diazepam e desmetildiazepam após tratamento agudo e prolongado com diazepam (1mg/kg)	100
TABELA 27 – Concentração plasmática de diazepam e desmetildiazepam após tratamento agudo e prolongado com diazepam (10mg/kg)	100

RESUMO

Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam sobre parâmetros imunológicos de ratos

Camila Bento de Lima, Regina Lúcia de Moraes Moreau – Mestrado

Os benzodiazepínicos (BDZ) são amplamente utilizados no tratamento da ansiedade. Aumentam a neurotransmissão GABAérgica por ação em sítios receptores específicos para BDZ presentes no complexo ionóforo no canal do receptor GABA_A, onde modulam alostericamente suas atividades. Porém, além de atuar nesses receptores, têm sido relatado, também, a existência de receptores periféricos para benzodiazepínicos (PBR). Evidências sugestivas de uma ação imunomodulatória direta para os BZD emergem de estudos que demonstraram a presença de PBR em células imunes/inflamatórias. Este trabalho avaliou os efeitos da administração de diazepam sobre parâmetros imunológicos de ratos e desenvolveu um método para dosagem plasmática desse benzodiazepínico utilizando a técnica de microextração em fase líquida. Foram realizados tratamentos agudo e prolongado (21 dias) com as doses de 1 e 10 mg/kg. Os resultados mostraram que a dose de 1 mg/kg não alterou qualquer um dos parâmetros imunes analisados; porém, diminuiu a quantidade de hemoglobina e de hemácias, assim como o valor de hematócrito, quando administrado prolongadamente. Entretanto, a dose de 10 mg/kg, após ambos os tratamentos, foi capaz de diminuir as células apoptóticas e, conseqüentemente, de aumentar a porcentagem de células viáveis, aumentar a porcentagem de células *Thelper* e Tcitotóxicas, diminuir a porcentagem de células B e aumentar os níveis séricos de corticosterona. Além destes, observou-se, também, um aumento do número de reticulócitos e um aumento do número das células segmentadas no sangue periférico, após administração prolongada do diazepam, assim como um aumento do número de células segmentadas no baço, após administração aguda. A menor dose de diazepam (1 mg/kg) também não foi capaz de induzir tolerância, diferente da maior dose (10 mg/kg), que levou ao desenvolvimento de tolerância funcional. Esses resultados sugerem que a administração de diazepam em baixas doses (< 1mg/kg) não interfira com os parâmetros imunes analisados. Entretanto, o uso de diazepam em doses mais elevadas (> 10 mg/kg) é capaz de alterar tais parâmetros. Muito provavelmente esses efeitos tenham a ver com o número de receptores PBR presentes nas células imunes avaliadas e/ou com a dose de diazepam administrada.

Com relação ao método analítico, encontrou-se linearidade na faixa de interesse (intervalo dinâmico de 25 a 2000 ng/mL) para o diazepam e o desmetildiazepam. Os limites de detecção e quantificação foram de 20 e 25 ng/mL, respectivamente, e os parâmetros analisados mostraram-se satisfatórios. Desta forma, o método desenvolvido utilizando a técnica de microextração em fase líquida mostrou-se prático, de baixo custo e com grande potencial para extração prévia à injeção no CG.

Palavras-chave: Diazepam, Linfócitos, PBR, Tolerância, Citometria de Fluxo, Microextração em fase líquida.

E-mail: calima@usp.br

SUMMARY

Effects of acute and long-term diazepam administration on rat immune parameters

Camila Bento de Lima, Regina Lúcia de Moraes Moreau – Mestrado

Benzodiazepines (BZD) are widely used for the treatment of anxiety. They enhance GABA-ergic neurotransmission through binding on specific BDZ recognition sites, within the GABA_A receptor-ion channel complex, where they allosterically modulate its activity. However, recent studies showed that BZD also act on peripheral benzodiazepine receptor sites (PBR). Evidence for a direct immunomodulatory action for BZD emerged from studies that demonstrated the presence of PBR on immune/inflammatory cells. The present experiment was designed to analyze the effects of diazepam on rat immune parameters and to develop a method to detect diazepam on rat plasma through a liquid-phase microextraction technique (LPME). The effects of both acute and long-term (21 days) diazepam (1 and 10 mg/kg/day) administrations were evaluated. Results showed that diazepam (1 mg/kg) treatment did not change the immune parameters analyzed; however, long-term diazepam treatment decreased erythrocytes, hemoglobin and hematocrit values. Both diazepam (10mg/kg) acute and long-term treatments decreased the number of apoptotic cells and, consequently, enhanced the percentage of viable cells; they also increased the percentage of Thelper and Tcitotoxic cells; decreased the percentage of B cells and increased the corticosterone serum levels. Long-term diazepam (10 mg/kg) treatment enhanced reticulocytes and segmented cells in the peripheral blood; however, only acute diazepam (10mg/kg) treatment increased the number of segmented cells on spleen. The low dose of diazepam used (1 mg/kg) was unable to induce tolerance, differently of that found after the high dose of diazepam (10 mg/kg). This latter treatment indicated the development of functional tolerance, at least for diazepam effects on corticosterone serum levels. These results suggested that low doses of diazepam (< 1 mg/kg) were not able to change the immune parameters analyzed; however, high doses of diazepam (> 10 mg/kg) changed many of these immune parameters. It is possible that the observed effects were related to the number of PBR receptor sites present on immune cells and/or to the levels of serum diazepam after the treatments used. The analytical method provided to be linear in the interest range (dynamic range from 25 to 2000 ng/mL) for

diazepam and its main metabolite, desmethyldiazepam. The limits of detection and quantification were 20 and 25 ng/mL, respectively, and the parameters analyzed provided to be satisfactory. Finally, the method developed utilizing the liquid-phase microextraction technique showed to be practical, with low costs and thus presenting potential to be used previously to the extraction procedures, i.e., prior to the injection into the gas-chromatography apparatus.

Key-words: Diazepam, Lymphocytes, PBR, Tolerance, Flow Cytometry, Liquid-phase Microextraction.

E-mail: calima@usp.br

1 - INTRODUÇÃO

Diversos estudos têm relatado que o sistema imune responde a estímulos originados nos sistemas endócrino, nervoso central e autônomo. Neste sentido, sabe-se da existência de um *feedback* entre o sistema imune e o sistema neuroendócrino, bem como entre esse sistema e o sistema imune. Essa comunicação bi-direcional assenta-se na expressão comum de mediadores, receptores e mecanismos de transdução entre células nervosas e imunes.

Um aspecto interessante das relações neuro-imuno-endócrinas diz respeito aos mecanismos regulados por receptores ativados por benzodiazepínicos descritos no sistema nervoso central ou periférico. Estes receptores, juntamente com seus ligantes contribuem para as manifestações neuroimunes decorrentes do estresse da ansiedade. Nesse sentido, os benzodiazepínicos são freqüentemente prescritos na clínica médica por possuírem como principais atividades farmacológicas ações ansiolíticas e relaxantes musculares.

Muitos trabalhos têm revisado a complexa relação existente entre sistema nervoso central, benzodiazepínicos, eixo hipotálamo-hipófise-adrenais e sistema imune. Conforme já demonstrado, a administração aguda de diazepam aumentou o *burst* oxidativo e a fagocitose de neutrófilos, e diminuiu o volume do edema de pata induzido por carragenina; porém, quando administrado prolongadamente pouco ou nada se observou tendo-se sugerido o desenvolvimento de tolerância a esses efeitos. Entretanto, dados de estudos relacionando os efeitos da administração de diazepam com a resposta dos linfócitos são muito contraditórios.

O presente trabalho pretende analisar os efeitos do diazepam sobre parâmetros da resposta imune adaptativa e o eventual desenvolvimento de tolerância aos mesmos. Especificamente, pretende-se analisar os efeitos do diazepam sobre a viabilidade, proliferação e fenotipagem de linfócitos, bem como seus efeitos sobre a celularidade do baço e da medula e sobre alguns parâmetros hematológicos.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – 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. De fato, ganham destaque na atualidade estudos que demonstram ser todos os sistemas no corpo reciprocamente regulados e comunicantes entre si. Curioso lembrar o fato de que a sabedoria antiga já conhecia a existência de uma integração corpo-mente: Aristóteles, afirmava que a “psique” (alma) e o corpo reagiam complementarmente um com outro. Assim, uma mudança no estado da psique produzia uma mudança na estrutura do corpo, e à inversa, uma mudança na estrutura do corpo produzia uma mudança na estrutura da psique (SOLOMON, 1999). No entanto, embora muitos acreditassem na existência de comunicações entre o Sistema Nervoso e o Sistema Imune, desconhecia-se qualquer base biológica para essas interações.

A Neuroimunologia ou Psiconeuroimunologia é o ramo cada vez mais estudado da ciência que busca analisar o relacionamento recíproco entre o Sistema Nervoso e os componentes do Sistema Imune (SI). Estudos recentes realizados *in vivo*, em nossos laboratórios, têm mostrado que estados emocionais, como depressão, estresse e ansiedade (SA-ROCHA et. al., 2006; ALVES et. al., 2006, 2008) 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; PAULA, 2007) interferem com a imunidade de animais.

Um dos grandes responsáveis pelos avanços na neuroimunologia foi o pesquisador Jankovic, que em 1979 demonstrou a existência de uma correlação antigênica entre timócitos, linfócitos B e vesículas sinápticas do cérebro de ratos através de ensaios de citotoxicidade e imunofluorescência. Através destes estudos, juntamente com outros complementares, é que se estabeleceram as bases para uma sólida abordagem molecular e bioquímica da comunicação bidirecional existente entre os sistemas imune e neuroendócrino (MADEN et al., 1995). Dessa maneira, a neuroimunomodulação, inicialmente conceituada como a área de estudo que avaliava as influências exercidas pelo sistema nervoso sobre a resposta imune (REICHLIN, 1993), foi

novamente definida como o estudo das inter-relações existentes entre o sistema nervoso central (SNC) e o SI. O termo inter-relações foi empregado exatamente porque sabe-se serem estas relações bidirecionais (CONHEN et al., 1996).

Um dos mais importantes meios de comunicação entre o SNC e o SI é o eixo HHA (Hipotálamo-hipófise-adrenal) (McEWEN et. al., 1997; RABIN, 1999). Após estressores físicos ou psicológicos, há a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo núcleo paraventricular do hipotálamo. Este, por sua vez, estimula a hipófise anterior a liberar o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) para a circulação. Este hormônio irá estimular a adrenal a sintetizar e liberar glicocorticóides. Em humanos o principal glicocorticóide é o cortisol, enquanto que em roedores é a corticosterona (WEBSTER et. al., 2002).

Porém, existe um segundo sistema mediando essa comunicação, o Sistema Nervoso Simpático (SNS), que influencia a resposta a um estresse através de dois mecanismos paralelos. O primeiro ocorre pela liberação, pelas células da medula da adrenal, de adrenalina, para o sangue. O segundo corresponde às ações dos nervos simpáticos, que innervam praticamente todos os órgãos (MASON, 1968a; 1968b).

Em 1980, Blalock e colaboradores observaram que leucócitos produziam um peptídeo, identificado posteriormente como sendo o ACTH, com características semelhantes ao liberado pela hipófise. Posteriormente, observou-se que estes sistemas compartilhavam de receptores para citocinas, neurotransmissores, hormônios e neuropeptídeos (BLALOCK, 1984), e que produtos originalmente tidos como específicos para cada um deles coexistiam em tecidos linfóides, endócrinos e nervosos. Assim sendo, há células linfóides produzindo ACTH e TSH (BLALOCK, 1984) e citocinas sendo produzidas no SNC (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996).

O estresse crônico pode ser visto como um estado em que o eixo HHA é ativado por períodos de tempos longos, ocorrendo neste estado uma prolongada elevação nos níveis de glicocorticóides circulantes. Tal exposição prolongada a elevados níveis de glicocorticóides é prejudicial a alguns sistemas do corpo incluindo-se aqui o sistema imune (MC EWEN, 1998, 2000; WEBSTER et. al., 2002). Alguns estudos têm relatado serem os glicocorticóides capazes de exercer efeitos sobre os diferentes tipos de células imunes, por influenciar o balanço entre citocinas de perfil Th1 e Th2, estabelecendo, desta forma, o tipo de resposta imune do organismo:

isto é, se esta será predominantemente humoral ou celular (BESEDOVSKY; DEL REY, 1986; WEIGGERS; REUL, 1998; TURNBULL; RIVIER, 1999). Os glicocorticóides exercem a maioria de seus efeitos através da ativação de receptores glicocorticóides (GR) que, entre as diversas funções, interferem com a atividade de fatores de transcrição como o Fator Nuclear *kappa B* (NF κ B). Este é um dos principais meios de ativação do sistema imune, já que inicia a transcrição de TNF- α , IL-1 β , IL-2 e IL-6 (WEBSTER et. al., 2002). Neste sentido, sabe-se que os glicocorticóides induzem uma *down-regulation* da imunidade mediada por Th1, aumentando aquela mediada por Th2 (WEBSTER et. al., 2002; KIECOLT-GLASER et. al., 1991; 1996).

A ativação do eixo HHA, e a conseqüente liberação de ACTH e de glicocorticóides, fazem parte das respostas neurovegetativas ligadas às situações de estresse e ansiedade (GRAEF, 1989). Neste contexto, algumas alterações da função imune vêm sendo induzidas por estímulos estressantes e/ou condições psicológicas (COHEN et al., 1979). Em nossos laboratórios observou-se que estados de ansiedade gerados experimentalmente em animais do laboratório foram correlacionados a um déficit pronunciado da imunidade inata (PALERMO-NETO et al., 2003); também já foram constatadas 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).

Modelos que envolvem lesões de estruturas específicas do SNC e estudos das relevantes alterações ocasionadas por estas em parâmetros ligados à atividade do sistema imune têm sido, também, utilizados para a pesquisa das relações entre o SNC e o SI. Assim, mostrou-se que ratos com lesões no *locus ceruleus* apresentam uma menor produção de anticorpos contra albumina sérica bovina, uma redução no tamanho do timo e uma redução da população de linfócitos CD4⁺ no sangue periférico (NIKOLIC et al., 1993).

Da mesma maneira, o sistema nervoso pode perceber e responder a sinais emitidos pela atividade do SI durante uma resposta a um estímulo imunogênico sugerindo, este fato, ser o SI capaz de agir como um “órgão sensorial” (BESEDOVSKY; SORKIN, 1977). Produtos liberados através de processos imune/inflamatórios são capazes de modular ou influenciar a atividade de áreas específicas do SNC modificando assim, o comportamento animal. Besedovsky e

colaboradores (1981) sugeriram que a ativação do SI e a conseqüente produção de interleucinas provocavam uma resposta endócrina desencadeada pela ação destas no SNC. Mostrou-se que a interleucina-1 (IL-1) ativava o eixo HHA de várias maneiras: (1) atuando diretamente na liberação do fator liberador de corticotrofina (CRF) pelo hipotálamo, com conseqüente liberação de ACTH pela hipófise anterior (BERKENBOSCH et al., 1987; SAPOLSKY et al., 1987); (2) ativando diretamente a liberação de ACTH como comprovado em células da hipófise mantidas em cultura (PAWLIKOWSKI, 1983); (3) atuando diretamente na adrenal, e desta forma aumentando a liberação de glicocorticóides (GWOSDOW, 1992). Da mesma forma, Basso e colaboradores (2001) mostraram, em nossos laboratórios, que uma reação alérgica intestinal é capaz de alterar o comportamento animal e também a atividade de células do núcleo paraventricular do hipotálamo e da região baso-lateral da amígdala. Mostraram também, que as fibras nervosas do tipo C estavam envolvidas com os mecanismos relacionados a esta manifestação neuroimune (BASSO et., al., 2004).

Neste mesmo sentido, também já foi demonstrado que as IL-6, TNF- α e IFN- γ (HOLSBOER, et. al., 1988; NAITOH, et. al., 1988; SHARP et. al., 1989) estimulam o eixo HHA, da mesma maneira que o fazem as IL-2, IL-11 e IL-12 (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996; TURNBULL; RIVIER, 1999). Estes trabalhos, em seu conjunto, enfatizam a capacidade que têm as diferentes citocinas em atuar sobre este eixo, constituindo um indicativo da grande relevância fisiopatológica das interações citocinas-eixo HHA.

Os dados da literatura suportam, assim, a existência de comunicações diretas e bidirecionais entre o SNC e o SI. Estes trabalhos têm contribuído de forma marcante para o entendimento da regulação/modulação das respostas adaptativas dos organismos frente a um estresse ou a um fármaco.

Sendo assim, não é difícil supor que substâncias que atuem no SNC possam influenciar as respostas imunes. Ligeiro-Oliveira e colaboradores (2004; 2008) mostraram que a anfetamina produz alterações tanto de comportamento como endócrinas concomitantes àquelas que descreveram em parâmetros relacionados à atividade do SI. Especificamente, mostraram que a anfetamina interfere com a movimentação de leucócitos da medula óssea para o pulmão em vigência de uma reação alérgica pulmonar. Paula (2007) mostrou que animais tratados com MDMA (*ecstasy*), também, apresentaram alterações comportamentais, endócrinas e de imunidade

inata. Mais especificamente, o MDMA foi capaz de aumentar a atividade locomotora de camundongos no campo aberto, diminuir o *burst* oxidativo de neutrófilos e aumentar os níveis séricos de corticosterona.

Neste sentido, os benzodiazepínicos (BDZ) possuem potencial para modificar a imunidade por alterar, principalmente, as atividades do eixo HHA e/ou do sistema nervoso autônomo simpático (WEIZMAN et al., 1997; RIGHI et al., 1999; DOMINGUES-JUNIOR et al., 2000; LAZZARINI et. al, 2001; 2003; 2006), assim também como por 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).

2.2 – Benzodiazepínicos

Introduzidos na terapêutica no início da década de 60, os benzodiazepínicos (BDZ) representaram um grande avanço no tratamento da ansiedade por terem uma grande eficácia, relativa seletividade de efeitos, baixa toxicidade e menor capacidade de criar dependência. Em decorrência destes fatos, estes medicamentos figuram hoje entre as classes de fármacos psicotrópicos mais prescritas e utilizadas pela população em geral, no Brasil e no mundo; seu uso se dá não apenas por seus efeitos ansiolíticos, mas também por seus efeitos anticonvulsivante, sedativo e relaxante muscular (GRAEF, 1989; RUIZ et. al., 1993). De acordo com alguns autores, os benzodiazepínicos 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 compostos benzodiazepínicos 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 um aumento significativo do uso entre os anos de 2001 e 2005.

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

Todos estes fármacos possuem atividades farmacológicas semelhantes por atuarem em sítios receptores de alta afinidade localizados no SNC, conhecidos como receptores centrais para benzodiazepínicos (CBR) e que se encontram acoplados aos receptores GABA_A (BORMANN, 1988a), sendo estes os responsáveis pelos principais efeitos clínicos dos benzodiazepínicos.

O receptor GABA_A é um complexo multimolecular constituído por 5 subunidades de proteínas que formam um canal de cloro na membrana da célula; a combinação dessas subunidades protéicas pode variar entre as regiões cerebrais e até entre as células (WISDEN;

SEEBURG, 1992). A ligação de agonistas benzodiazepínicos aos receptores GABA_A ocasiona uma mudança conformacional de proteínas que abre o canal de cloro levando a um rápido influxo de cloro para dentro da célula hiperpolarizando a membrana neuronal; lembra-se que o GABA tem efeitos inibitórios sobre a transmissão nervosa (DINGEMANSE; BREIMER, 1984; PUJA et al., 1990).

Porém, foram descritos mais recentemente outros sítios de ligação para os BDZ, além dos receptores centrais; esses receptores estão localizados, em sua maioria, fora do SNC, sendo por isso chamados de “periféricos” (PBR – *peripheral benzodiazepine receptor*) (MARANGOS et al., 1982). Estes sítios periféricos de ligação para BDZ já foram identificados em vários órgãos como rins, fígado e pulmões (SAANO, 1988), em tecidos esteroideogênicos como adrenal e testículos (OKE et al., 1992; GARNIER et al., 1993; PAPADOPOULOS, 1993) e, também, em várias células do sistema imune como linfócitos, monócitos, macrófagos e polimorfonucleares (ZAVALA et al., 1984; FERRARESE et al., 1990; SCHLUMPF et al., 1990, 1992).

Neste sentido, diversos trabalhos têm relatado a habilidade que têm os BDZ de modular a resposta imune, sendo os mecanismos responsáveis por esse fenômeno ainda não muito bem caracterizados.

Apesar do termo “PBR” ser um nome bastante difundido e utilizado na comunidade científica, outros nomes têm sido usados para se referir a esses receptores. Entretanto, todos esses nomes definem certas propriedades dessa proteína, não se referindo à sua real natureza e função. Neste sentido, Papadopoulos e colaboradores (2006) propuseram uma nova nomenclatura para esses receptores baseada em sua estrutura química e função molecular: “Translocator protein” (18kDa) (TSPO). Esse novo nome, TSPO, refere-se à proteína não levando em consideração sua localização, referindo-se apenas à proteína de 18kDa, que é o principal sítio de ligação para os ligantes de PBR conhecidos. Esta nova nomenclatura já foi submetida e aprovada pelo *HUGO Gene Nomenclature Committee*. Mesmo assim, neste trabalho continuaremos a chamar esse receptor de PBR, para facilitar o entendimento.

2.2.1 – Receptores benzodiazepínicos periféricos (PBR)

Apesar de serem extensamente caracterizados do ponto de vista farmacológico e bioquímico, e implicados em vários processos biológicos, a função precisa dos PBR permanece ainda um enigma (CASELLAS et al., 2002). Sabe-se serem estes receptores amplamente distribuídos pelos diferentes tecidos; porém, e até o presente momento, não foram bem caracterizados todos os efeitos biológicos decorrentes de sua ativação. A maioria dos estudos realizados tem mostrado a presença de PBR junto à membrana externa das mitocôndrias, sendo denominados muitas vezes de receptores mitocondriais, estando possivelmente, envolvidos aí com a modulação da respiração celular, assim como na translocação do colesterol (CALVO et al., 1983; ANHOLT, 1985; HIRSCH et al., 1988a; 1988b; ZISTERER et al., 1992; LIU et al., 2006). Porém, 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 PBR distinguem-se farmacologicamente dos receptores centrais de BDZ, 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, de outros receptores quanto aos aspectos anatômicos, estruturais e fisiológicos (PIERRE et al., 2000). Alguns trabalhos relatam que os ligantes de PBR afetam várias funções celulares de acordo com o tipo de célula e suas densidades (3IKEZAKI; BLACK, 1990; GAVISH, et al., 1992).

Como se disse, os PBR são constituídos por uma proteína de 18 kDA caracterizada por 169 aminoácidos. São altamente hidrofóbicos e ricos em triptofano. Estes receptores têm sido descritos como um complexo multimérico composto por 3 subunidades: uma proteína de 18 kDA, um canal ânion voltagem dependente de 32 kDA (VDAC) e outra proteína carreadora do nucleotídeo adenina (ANC) (McENERY et al., 1992). Porém, além destas, também têm sido relatadas duas proteínas adicionais que se associam aos PBR. A primeira, é uma proteína de 10 kDA co-imunoprecipitada com os PBR e que está localizada em frações mitocondriais (BLAHOS et al., 1995), a outra é uma proteína de 240 kDA chamada de proteína-1 associada ao PBR (PRAX-1) (GALIÈGUE et al., 1999). O papel desta PRAX-1 ainda não está muito bem definido, embora se acredite esteja ela envolvida com a modulação da função dos PBR (CASELLAS et al., 2002).

Vários estudos têm relatado que ligantes seletivos de PBR podem induzir muitos 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).

Alguns estudos relacionados à esteroidogênese têm mostrado que os PBR 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). 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). Da mesma forma, outros estudos têm mostrado que baixas concentrações de ligantes de PBR *in vitro* estimularam a esteroidogênese (HAUET et. al., 2005; VEENMAN et. al., 2007). No SNC, os PBR foram localizados mais especificamente nas células gliais, estando, neste local, envolvidos com a produção de neuroesteróides (PAPADOPOULOS, 1993).

Quando os primeiros estudos envolvendo os PBR começaram a ser realizados acreditava-se que estes receptores seriam um subtipo dos receptores centrais (CBR). Devido a isso, vários trabalhos foram realizados com diferentes tipos de benzodiazepínicos como o diazepam, flunitrazepam, o clonazepam, entre outros, com o objetivo de melhor avaliar o funcionamento do receptor periférico. Assim, por meio de estudos de “binding” pôde-se verificar que o diazepam e o midazolam ligam-se com alta afinidade tanto em CBR como em PBR, sendo por isto chamados de agonistas mistos. Já o composto 4' clordiazepam, também conhecido como Ro 5-4864 liga-se com alta afinidade aos PBR, mas com baixa afinidade aos CBR (SYAPIN; SKOLNICK, 1979). Por outro lado, o clonazepam liga-se com alta afinidade aos CBR tendo baixa afinidade aos PBR. Além dos BDZ, existem outras substâncias que apresentam uma afinidade pelos PBR como os derivados da carboxamida isoquinolina. Um destes derivados, o composto PK 11195 (1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolona carboxamida), mesmo que estruturalmente diferente dos BDZ, é considerado o ligante padrão para o estudo dos mesmos por apresentar uma alta afinidade por estes receptores (Lê FUR et al., 1983).

Apesar das mais diversas substâncias apresentarem uma afinidade aos PBR, sem dúvida alguma o PK 11195 e o Ro 5-4864 são as mais utilizadas para o estudo desses receptores. Com base em alguns estudos de entalpia e entropia da interação ligante-receptor, verificou-se que o Ro 5-4864 atua como um agonista de PBR, enquanto que o PK 11195 tem ação antagonista (Le 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).

Ensaio realizados com os PBR mostraram que há uma diversidade quanto à sua localização nos tecidos estudados, bem como no relativo a seus níveis de expressão. Tecidos glandulares como a glândula pineal, adrenais, glândulas salivares e gônadas apresentaram uma maior expressão destes receptores, enquanto que os rins e o coração apresentaram uma expressão intermediária dos mesmos (ANHOLT et al., 1985). Em contraste, o tecido cerebral e o fígado apresentaram uma baixa densidade de PBR. Na glândula adrenal, a região medular é praticamente desprovida de PBR, enquanto que a região cortical tem densidade maior dos mesmos (ANHOLT et. al., 1986).

Foram localizados PBR em linfócitos (ROCCA et al., 1993), monócitos e macrófagos (ZAVALA et al., 1984; ZAVALA; LENFANT, 1987; SCHLUMPF et al., 1990, 1992). Com relação à densidade dos PBR presentes em células do sistema imune, foi relatado que monócitos e neutrófilos apresentam uma densidade semelhante entre si, entre 700.000 – 900.000 receptores por células, porém esta densidade é maior quando comparada com aquela de linfócitos B e células NK, que apresentam, também, densidade semelhante, entre 100.000 – 350.000, e linfócitos T (CD4 e CD8), que apresentam entre 100.000 – 220.000 receptores por célula. (ZAVALA et. al., 1990; CANAT et. al., 1992; ROCCA et. al. 1993; ZAVALA, 1997). Esta densa distribuição dos PBR em células do sistema imune sugere uma possível função imunoregulatória para os mesmos.

2.2.2 – Benzodiazepínicos e o Sistema Imune

Um dos primeiros trabalhos a mostrar os efeitos dos BDZ sobre a função imune foi aquele relacionado a um experimento no qual observou-se que repetidas administrações de altas doses de diazepam diminuíram a resposta imune humoral e celular de camundongos (DESCOTES et al., 1982). Em um outro trabalho, onde se administrou diazepam, Ro 5-4864 ou PK 11195, todos na dose de 1 mg/kg verificou-se aumento significativo da resposta imune humoral (LENFANT et al., 1986; ZAVALA et. al., 1984).

Massoco e Palermo-Neto (1999) mostraram que a administração de diazepam na dose de 1,5mg/kg diminuiu a atividade de macrófagos de camundongos, como demonstrado através da medida do espraçamento, da fagocitose e produção de H_2O_2 . Este fato também foi observado em proles de ratos tratados perinatalmente com diazepam na dose de 2mg/kg e avaliados na idade adulta (SILVA; PALERMO-NETO, 1999). Neste mesmo sentido, Ugaz e colaboradores (1999) mostraram, em nossos laboratórios, que animais expostos pré-natalmente à dose de 1,5mg/kg de diazepam e inoculados com *M.bovis* apresentaram um maior número de unidades formadoras de colônias (CFU) em órgãos como baço, pulmão e fígado. Mostraram, ainda, que este resultado era dose-dependente, já que não foi observado quando se administrou o diazepam na dose de 1mg/kg. Recorda-se aqui, que este modelo experimental de infecção envolve a participação tanto de macrófagos quanto de linfócitos B e linfócitos T.

Verificou-se, também, que o tratamento com midazolam diminuiu a produção de $TNF-\alpha$ liberado por macrófagos peritoneais de eqüinos e, ainda que este tratamento alterou a capacidade de fagocitose destas células e dos neutrófilos sangüíneos (MASSOCO; PALERMO-NETO, 2003). Além desses experimentos, buscou-se, ainda, verificar os efeitos dos tratamentos agudo e prolongado com diazepam (10mg/kg) sobre o *burst* oxidativo e a fagocitose de neutrófilos; segundo esse trabalho, as alterações induzidas pelo diazepam ocorreriam de maneira diferente para os dois tratamentos, remetendo esse achado à hipótese do desenvolvimento de tolerância aos efeitos do diazepam prolongadamente administrado (SILVA et. al., 2003).

Neste sentido, Lazzarini e colaboradores (2001) mostraram que a administração aguda de altas doses de diazepam (10 – 20mg/kg) foi capaz de reduzir o volume inflamatório do edema de pata induzido por carragenina, porém estes efeitos não foram observados após administração

prolongada do mesmo, mostrando, mais uma vez, um possível desenvolvimento de tolerância (LAZZARINI et. al., 2003). Mostraram, também, um importante papel do NO nos efeitos do diazepam sobre a inflamação aguda (LAZZARINI et. al., 2006).

Embora não seja possível precisar o significado funcional desses achados, parece factível sugerir que exista uma ligação entre PBR, o “*binding*” desses receptores pelo diazepam e a imunidade. Reforça esta premissa a observação de que o tratamento pré-natal com Ro 5-4864 também causou depressão pós-natal da resposta imune (SCHLUMPF et al., 1990). No entanto, outros fatores como a atividade de linfócitos T e B, de macrófagos, bem como a secreção de glicocorticóides e a síntese de prostaglandinas podem estar também, envolvidos com estes efeitos (SCHLUMPF et al., 1989; SCHLUMPF et al., 1990; KRUEGER; PAPADOPOULOS, 1990; KOZIKOWISKI et al., 1997). Neste mesmo sentido, outros estudos demonstraram que a exposição pré-natal a baixas doses de BDZ resultou em alteração de citocinas, observadas pela redução da liberação de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 e IFN- γ (SCHLUMPF et. al., 1992; SCHLUMPF, et. al., 1993a; SCHLUMPF, et. al., 1993b).

Outro mecanismo de ação imunomoduladora mediado, pelos PBR, foi sugerido por Bissierbe e colaboradores (1986), estando ligado aos canais de cálcio voltagem-dependente. Assim, estudos realizados *in vitro*, atribuíram ao Ro 5-4864 um efeito antiproliferativo em cultura de células tumorais devido à inibição do influxo de cálcio para dentro dessas células tumorais alterando, este fato, a conformação do citoesqueleto. Neste sentido, foi demonstrado por Marino e colaboradores (2001) um aumento da migração e da atividade fagocítica de neutrófilos após a administração de diazepam; este efeito foi atribuído, pelos autores, à alteração no influxo de cálcio mediado pelos PBR, cálcio esse, necessário para o espraçamento e para a fagocitose.. Alguns investigadores chegaram a sugerir que os PBR poderiam regular a permeabilidade iônica das membranas, fato que ocorre durante o metabolismo da mitocôndria e de outras organelas, favorecendo assim, o funcionamento celular adequado (CASELLAS et al., 2002).

Sakai e colaboradores (2006b) trabalhando em nossos laboratórios já relataram, também, a presença de PBR em células tumorais, mais especificamente, nos núcleos das células do tumor de Ehrlich, mostrando que os ligantes de PBR *in vitro*, como o diazepam e o Ro5-4864, mas não o clonazepam, foram capazes de alterar a capacidade de proliferação destas células; como estes efeitos foram prevenidos pela administração de PK11195, mostrou-se, mais uma vez, ser o

PK11195 um antagonista de PBR. Neste sentido, em outro estudo, mostraram que o diazepam foi capaz de diminuir o número de macrófagos peritoneais, bem como a produção de NO por essas células, porém, não alterou a fagocitose ou a produção de H_2O_2 destas células, nos animais inoculados com este mesmo tumor (SAKAI et. al., 2006a).

Adicionalmente, outros estudos têm mostrado também a presença de alterações de imunidade adquirida mediada por ligantes de PBR. Neste sentido, Bessler e colaboradores (1992) mostraram que, após administração *in vitro* de Ro5-4864, de PK 11195 ou de diazepam houve uma redução da proliferação de células T induzidas tanto por fitohemaglutinina (PHA) como por concavalina A (ConA), sendo estes efeitos observados apenas após uso de altas doses (10 μ M) dos mesmos. Neste sentido, há muitas evidências indicando que a proliferação celular linfóide é estimulada por concentrações nanomolares de ligantes de PBR e inibida por concentrações micromolares (STEPIEN et. al., 1988; BESSLER et. al., 1992; PAWLIKOWSKI, 1993).

Alguns estudos já relacionaram o uso de ligantes de PBR com apoptose celular. Hirsch e colaboradores (1998) relataram que a administração de PK 11195 aumentou a apoptose de células tumorais induzida por diferentes agentes apoptóticos. Entretanto, em um outro trabalho, mostrou-se ser a administração de Ro5-4864 (100nM) capaz de proteger células U937 da apoptose induzida por TNF- α , sendo este efeito bloqueado pelo PK 11195 (BONO et. al., 1999). Estes trabalhos sugerem fortemente um envolvimento dos PBR na regulação da apoptose. Porém, ainda são necessários mais estudos para uma melhor elucidação do mecanismo dessa ação dos PBR.

Como já comentado, diversos trabalhos já relataram a presença de PBR em diferentes células imunes, dentre elas nos linfócitos (ROCCA et al., 1993). A ativação dos PBR presentes em linfócitos modificou a expressão e a liberação de várias citocinas, como TNF- α , IL-1, IL-2 e IL-6 (SCHLUMPF et al., 1994) e de produtos celulares (TORRES et al., 2000) cujos efeitos influenciam fortemente a resposta imune/inflamatória. Schlumpf e colaboradores (1989) observaram que baixas doses de diazepam (1,25mg/kg) aplicadas em ratas prenhes inibiam, em suas proles, manifestações imunológicas dependentes de células T.

Outros trabalhos têm indicado que a administração aguda de BDZ diminui a proliferação de linfócitos T e B tanto *in vivo* como *in vitro* (BALLANTYNE; HALPER, 1975; DESCOTES et al., 1982; LASCHI et al., 1983; RAMSEIER et al., 1993). É importante ressaltar que esses

trabalhos não foram capazes de mostrar ações tóxicas diretas destes BDZ sobre os linfócitos já maduros.

Como se depreende, existem divergências entre os resultados de trabalhos que analisaram a relação entre o uso de BDZ e a resposta imune adquirida. Um trabalho relata que 2h após a administração de baixas doses de alprazolam (0.02-1.0 mg/kg) observou-se um aumento da atividade de células NK e da proliferação de linfócitos induzida por mitógenos. No entanto, quando foram administradas altas doses do mesmo fármaco (5-10 mg/kg) não se observaram quaisquer alterações da imunidade (FRIDE et. al., 1990). Em um outro trabalho, verificou-se que o alprazolam inibiu a resposta proliferativa de células B ao LPS e de células T ao à Con A, além de reduzir a produção de IL-2 por células T esplênicas e a produção de IL-1 e TNF por macrófagos peritoneais. Além disso, mostrou-se que as supressões observadas eram dose-dependentes, sendo as células B mais vulneráveis do que as células T (CHANG et. al., 1991).

Kalashnikov e colaboradores (2002) realizaram um trabalho analisando *in vitro* os efeitos de dois BDZ, o diazepam e o tofizopam, sobre a resposta imune de humanos; observaram que altas concentrações de diazepam (1-5µg/mL) diminuíram a proliferação de células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) e a produção de TNF- α e IL-2 pelos linfócitos. Já o tofizopam mostrou-se capaz de aumentar a proliferação de PBMC e a produção de IL-2 após adição de baixas e moderadas concentrações (0,4-2µg/mL). Relataram, finalmente, que baixas concentrações (< 1µg/mL) desses dois fármacos não promoveram quaisquer tipos de alteração.

Pode-se dizer que, as divergências relatadas acima para os efeitos dos BDZ sejam, muito provavelmente, decorrências das variáveis existentes nos diferentes modelos experimentais empregados como, por exemplo, das doses usadas, das espécies animais estudadas, dos períodos de tratamento, das vias de administração e, até mesmo, das células e/ou tecidos analisados. De fato, alguns estudos têm mostrado que os BZD podem se comportar como imunoestimuladores ou imunossupressores dependendo da dose utilizada (KALASHNIKOV et. al., 2002; LEE et. al., 2004).

Pelo exposto, depreende-se que há ainda muito que se buscar para o completo entendimento das complexas ações dos BDZ sobre os PBR, em especial, sobre a atividade de linfócitos e sobre a imunidade adquirida.

Levando-se em conta (1) o extenso uso dos benzodiazepínicos na clínica médica, (2) a existência dos PBR em células imunes e (3) às contradições existentes nos estudos que analisaram os efeitos do Diazepam sobre parâmetros ligados aos linfócitos e à reposta imune adaptativa, resolveu-se desenvolver esse trabalho. Especificamente, buscou-se avaliar os efeitos do diazepam sobre linfócitos de ratos e um eventual desenvolvimento de tolerância a esses efeitos.

2.3 – Microextração em Fase Líquida

A análise cromatográfica de fármacos e metabólitos presentes em fluídos biológicos (sangue total, plasma, urina etc.) requer um pré-tratamento da amostra devido à alta concentração de compostos endógenos e proteínas na matriz.

A extração e o isolamento dos analitos de interesse são tidos como uma das etapas mais críticas na análise de substâncias presentes em matrizes biológicas. A extração visa a remoção dos analitos da matriz, enquanto a etapa de “clean-up”, a remoção de possíveis interferentes. Na maioria dos métodos de análise essas duas fases são separadas, tornando o procedimento caro e levando ao uso excessivo de solvente (LANÇAS, 2004). Sendo assim, a tendência nos últimos anos tem sido a miniaturização, automação e uso minimizado de solventes orgânicos durante o preparo das amostras (KATAOKA, 2003).

A preparação das amostras é, geralmente, realizada pelas técnicas de extração líquido-líquido e extração em fase sólida; porém, mais recentemente, devido aos problemas citados acima, a microextração em fase sólida e a microextração com membranas têm se mostrado técnicas alternativas promissoras (GILAR et. al., 2001).

A principal metodologia envolvida na microextração com solventes foi introduzida em 1996 por Jeannot e Cantwell, recebendo a denominação de SDME (*single drop microextraction*). Nesta técnica, uma gota do solvente orgânico e imiscível em água é mantida suspensa na ponta da agulha de uma microseringa, sendo esta imersa na amostra aquosa (Figura 1). Os analitos presentes na fase aquosa, após agitação, são extraídos para a microgota de solvente orgânico, que em seguida, é retraída para o interior da microseringa e transferida para um instrumento analítico (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004). Tal sistema também possibilita o uso de três fases, onde microlitros de fase aquosa estão contidos na gota do solvente orgânico (JEANNOT; CANTWELL, 1997).

Figura 1 – Representação esquemática da SDME (Adaptado de Jeannot; Cantwell, 1997)

No entanto, a microextração em gota única não é tão robusta, ocorrendo perda de solvente durante a extração, principalmente durante a agitação vigorosa aplicada para acelerar o processo de transferência dos analitos entre as duas fases, além da necessidade de pré-tratamento de amostras bastante viscosas ou contendo material particulado (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005).

Desta forma, Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (1999) idealizaram uma nova metodologia, combinando o conceito de microextração com membranas com o uso reduzido de solventes orgânicos. Nesta técnica, (Microextração em Fase Líquida – *Liquid-phase Microextraction*, LPME) uma membrana capilar porosa e hidrofóbica é impregnada com solvente orgânico nos poros e contém microlitros de fase aceptora no lúmen (microextrato).

Neste sentido, antes de cada extração, uma nova fibra é imersa no solvente orgânico para imobilizá-lo nos poros da membrana, sendo o excesso removido por imersão em água (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004). A amostra aquosa de interesse é transferida para um pequeno frasco de 1 a 4 mL e a fibra de 1,5 a 10cm é mergulhada na solução. O lúmen da fibra é, então, preenchido com microlitros do solvente de extração (15 a 25µl), imiscível em água.

A LPME pode ser usada em dois principais modos: sistema de duas fases e sistema de três fases, sendo que os dois fundamentam-se em um mesmo mecanismo de extração, baseado na difusão e partição dos analitos entre uma fase aquosa e outra orgânica.

No sistema de duas fases, o analito é extraído da solução aquosa (fase doadora) através de um solvente imiscível em água imobilizado nos poros da fibra cilíndrica, para o mesmo solvente orgânico (fase aceptora) presente no interior dessa fibra (RASMUSSEN et. al., 2000).

Já no modo de três fases, o analito é extraído da solução aquosa (fase doadora) através de um solvente orgânico imiscível em água imobilizado nos poros de uma fibra cilíndrica (fase orgânica) até outra fase aquosa (fase aceptora), com pH oposto ao da fase doadora, presente no interior do lúmen dessa fibra cilíndrica. Neste caso, a fase orgânica funciona como uma barreira entre a fase aceptora e a fase doadora, evitando a mistura entre essas duas fases (RASMUSSEN et. al., 2000).

Diferentes parâmetros devem ser otimizados durante o desenvolvimento do método utilizando membranas cilíndricas, tais como: ajuste do pH da amostra, membrana de extração, volume da amostra (solução doadora), tipo de solvente orgânico, tempo de extração, solução aceptora e agitação do sistema (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003).

Para os compostos básicos, o pH da amostra deve ser ajustado na região alcalina para facilitar sua extração pela fase aceptora orgânica, enquanto o pH da solução aceptora aquosa deve ser baixo, permitindo alta extração dos analitos da fase aceptora orgânica para a fase aceptora aquosa, ácida. Já para os compostos ácidos, o pH da amostra deve ser baixo e o da fase aceptora interna elevado. Após a extração, a fase aceptora interna é injetada diretamente no cromatógrafo (MOREAU; SIQUEIRA, 2008).

As membranas capilares empregadas na LPME devem ser hidrofóbicas e compatíveis com os solventes orgânicos utilizados. A membrana mais comumente empregada apresenta diâmetro interno de 600 μ m, parede com espessura de 200 μ m e poros com tamanho de 0,2 μ m, fornecendo uma microfiltração eficaz e impedindo a passagem de macromoléculas (ANDERSEN et. al., 2002).

Com relação ao solvente orgânico utilizado na LPME, algumas propriedades são necessárias para que ele seja empregado, como: baixa volatilidade, evitando a perda de fase orgânica durante a extração; baixa solubilidade ou insolubilidade em água, prevenindo a dissolução da fase orgânica na aquosa (doadora); compatibilidade com a membrana utilizada;

fácil impregnação nos poros desta membrana e solubilidade com o analito de interesse (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

Como citado anteriormente, o tempo de extração e a agitação do sistema são fatores importantes a serem analisados durante o desenvolvimento do método. A eficiência da extração na LPME depende da transferência de massa do analito da fase aquosa para a orgânica. Este é um processo de equilíbrio, onde a recuperação do analito aumenta com o tempo de extração até atingir uma situação de platô. Nesse ponto, o equilíbrio é atingido e a distribuição do analito entre as fases permanece constante (BASHEER et. al., 2003; RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004). Já a agitação, esta é aplicada para acelerar a cinética de extração, facilitando a difusão dos analitos através da interface fase doadora – solvente orgânico, diminuindo, portanto, o tempo necessário para que o sistema atinja o equilíbrio (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2005).

Esta nova metodologia de extração tem-se mostrado uma boa alternativa em relação a outros tipos de extração, pois tem propiciado uma redução de até 99% do consumo de solvente. Além disso, na técnica de LPME tornam-se desnecessários a evaporação do solvente e a reconstituição do analito antes da injeção no cromatógrafo; mais que isso, devido a não reutilização das unidades de extração elimina-se a possibilidade de *carry-over*, não sendo necessária a regeneração da fibra, tornando-se, então, um método de extração de baixo custo (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 1999, 2005; PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; MOREAU; SIQUEIRA, 2008).

Sabe-se que o diazepam leva ao desenvolvimento de tolerância funcional (PESOLD et. al., 1997; PRATT et. al., 1998) e, sendo assim, é preciso analisar a possibilidade de serem as alterações observadas após o uso do medicamento passíveis de modificação por desenvolvimento de eventual tolerância metabólica.

Devido à grande utilização da cromatografia em fase gasosa juntamente com o detector nitrogênio-fósforo (NPD) para determinação de benzodiazepínicos, e devido à crescente utilização da técnica de microextração em fase líquida, pelos motivos acima descritos, resolveu-se desenvolver, também, um método cromatográfico para a realização das dosagens plasmáticas do diazepam.

3 – OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam sobre parâmetros imunológicos de ratos e desenvolver um método cromatográfico para análise plasmática do diazepam.

3.2. – Objetivos Específicos

Avaliar em ratos os efeitos do diazepam, na dose de 1mg/kg, após administração aguda e prolongada, sobre:

- hemograma completo;
- peso relativo do baço, fígado, e adrenais;
- celularidade do baço;
- células da medula óssea;
- viabilidade de linfócitos do sangue periférico;
- proliferação de esplenócitos;
- fenotipagem de linfócitos do sangue periférico;
- corticosterona sérica;

Avaliar em ratos os efeitos do diazepam, na dose de 10mg/kg, após administração aguda e prolongada, sobre:

- hemograma completo;
- peso relativo do baço, fígado, e adrenais;
- celularidade do baço;
- células da medula óssea;
- viabilidade de linfócitos do sangue periférico;

- proliferação de esplenócitos;
- fenotipagem de linfócitos do sangue periférico;
- corticosterona sérica;

Desenvolver um método cromatográfico para análise plasmática do diazepam e avaliar os níveis plasmáticos deste, após administração aguda e prolongada.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Animais

Foram utilizados ratos adultos, da linhagem Wistar, pesando entre 200 e 300g, provenientes de proles obtidas no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Estes animais foram utilizados segundo as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório do Departamento de Patologia da FMVZ-USP (protocolo nº 948/2006). Essas normas são baseadas naquelas descritas pelo “Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources”, National Research Council, EUA, estando de acordo, também, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pela Comissão Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo FCF-USP (protocolo nº117).

Antes do início dos experimentos, os animais foram alojados, por um período de 7 dias, em caixas de polipropileno (medindo 41 x 34 x 16 cm) para adaptação às condições do biotério experimental, permanecendo nestas gaiolas e neste biotério durante todo o período 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-se 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.

4.2 – Reagentes

- **Anexina V conjugada ao fluorocromo FITC (Lab. de Biologia Celular e Molecular – ICB / USP):** utilizada como marcador indicativo de processo de apoptose;
- **Anticorpos conjugados aos marcadores de superfície celular anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD3 e, isotípicos controles (Pharmingen – BD Biosciences, San Jose, CA, USA):** utilizados para marcação dos linfócitos do sangue periférico;
- **Anticorpos conjugados aos marcadores de superfície celular anti-CD45 e isotípicos controles (Biolegend, San Diego, CA, USA):** utilizados para marcação dos linfócitos do sangue periférico;

- **Anticorpo anti-PBR (Santa Cruz Biotechnology):** anticorpo primário utilizado para a marcação dos PBR presentes nos linfócitos e neutrófilos;
- **Anticorpo anti-IgG conjugado ao fluorocromo FITC (Santa Cruz Biotechnology):** anticorpo secundário utilizado para a marcação dos PBR presentes nos linfócitos e neutrófilos;
- **Azul de Trypan (GIBCO[®], Grand Island, NY, USA):** corante utilizado para contagem celular;
- **CFSE-DA (Molecular Probes[®], Carlsbad, CA, USA):** corante utilizado para proliferação celular;
- **Concavalina A (Sigma[®], St Louis, MO, USA):** mitógeno específico para linfócitos T;
- **EDTA (Merck[®], Darmstadt, Germany):** anticoagulante para coleta de sangue;
- **Heparina:** anticoagulante para coleta de sangue;
- **Iodeto de propídeo (Sigma[®], St Louis, MO, USA):** fluorocromo utilizado como indicativo de morte celular (necrose);
- **Fitohemaglutinina A (PHA), M form (GIBCO):** mitógeno específico para linfócitos T;
- **Fungizone (GIBCO[®], Grand Island, NY, USA):** antifúngico para cultura de células;
- **Hepes (GIBCO[®], Grand Island, NY, USA):** tampão para meio de cultura de células;
- **LPS – cepa 0127:B8 (Sigma[®], St Louis, MO, USA):** mitógeno específico para linfócitos B;
- **McCoy's 5A[®] modificado (Sigma[®], St Louis, MO, USA):** meio utilizado para lavagem da cavidade femoral;
- **Penicilina / estreptomicina (GIBCO[®], Grand Island, NY, USA):** antibiótico para meio de cultura celular;
- **RPMI 1640 (GIBCO[®], Grand Island, NY, USA):** meio de cultura celular e utilizado também para contagem de células total de medula óssea;
- **Soro bovino fetal (GIBCO[®], Grand Island, NY, USA):** utilizado como suplemento para enriquecer o meio de cultura celular;
- **Kit de corticosterona Coat-a-Count (DPC[®], Los Angeles, CA, USA):** kit para dosagens de corticosterona de ratos por meio de radioimunoensaio;
- **Acetato de butila (Carlo Erba[®], Rodano, MI, Italy):** solvente da fase aceptora;

- **Decanol (Merck[®], Darmstadt, Germany):** solvente da fase aceptora;
- **Metanol (Merck[®], Darmstadt, Germany):** solvente das soluções-padrão;
- **Nonanol (Merck[®], Darmstadt, Germany):** solvente da fase aceptora;
- **Octanol (Merck[®], Darmstadt, Germany):** solvente da fase aceptora;
- **Desmetildiazepam 1mg/mL (Cerilliant[®], Round Rock, TX, USA):** utilizado no preparo da solução-padrão;
- **Diazepam 1mg/mL (Cerilliant[®], Round Rock, TX, USA)** utilizado no preparo da solução-padrão;
- **Flunitrazepam 1mg/mL (Cerilliant[®], Round Rock, TX, USA):** utilizado no preparo da solução-padrão do padrão interno;
- **Prazepam 1mg/mL (Cerilliant[®], Round Rock, TX, USA):** utilizado no preparo da solução-padrão do padrão interno.

4.3 – Soluções

- **PBS (tampão fosfato-salina): 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 milli-Q		1000mL

- **Soluções de lise**

Salina 0.2%

NaCl	Sigma	2g
H ₂ O milli-Q		100mL

Salina 1,6%

NaCl	Sigma	1,6g
H ₂ O milli-Q		100mL

Cloreto de amônio

Cloreto de amônio	Sigma	8,56g
H ₂ O milli-Q		1000mL

- Tampão de Ligação**

NaCl	Sigma	8,766g
KCl	Sigma	0,373g
MgCl ₂ .6H ₂ O	Sigma	0,203g
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma	0,265g
H ₂ O milli-Q		1000mL

- Reagente de Drabkin**

KH ₂ PO ₄	Sigma	140 mg
K ₃ (CN) ₆	Sigma	200 mg
KCN	Sigma	50 mg
Sterox	Sigma	0,5 mL
H ₂ O dest		1000 mL

- Azul de Cresil Brilhante a 1% em citrato salino**

Citrato trissódico	Sigma	0,4 g
Azul de cresil brilhante	Sigma	1,0 g
Solução fisiológica (0,85%)		100 mL

- Líquido de Turk**

Ác. acético glacial	Merck	20 mL
Azul de cresil brilhante	Sigma	1 mL
H ₂ O dest		1000 mL

- Corante de Rosenfeld**

Azul de metileno eosina de May-Grunwald	Merck	0,53g
Azur-eosina-azul de metileno Giemsa.	Merck	0,97g
Metanol	Merck	1000mL

- **Diazepam 10µg/ml**

Diazepam	Cerilliant	10µL
Metanol	Merck	990µL

- **Diazepam 100µg/ml**

Diazepam	Cerilliant	100µL
Metanol	Merck	900µL

- **Desmetildiazepam 10µg/ml**

Desmetildiazepam	Cerilliant	10µg
Metanol	Merck	990µL

- **Desmetildiazepam 100µg/ml**

Desmetildiazepam	Cerilliant	100µg
Metanol	Merck	900µL

- **Prazepam 10µg/mL (Padrão Interno – PI)**

Prazepam	Cerilliant	10µg
Metanol	Merck	990µL

4.4 – Administração do Diazepam e Grupos Experimentais

Foram realizados, basicamente, dois tipos de tratamento com o diazepam (Cristália do Brasil/S.A., São Paulo, SP, Brasil) na dose de 1 mg/kg: um agudo e um prolongado. No tratamento agudo os animais receberam diazepam 1 mg/kg por uma única vez via i.p. No tratamento prolongado, o diazepam foi administrado por 21 dias, uma única vez ao dia. Os animais dos grupos veículo receberam 1 ml/kg do veículo do diazepam (álcool benzílico, ácido benzóico, benzoato de sódio, propilenoglicol, álcool etílico, poloxamer 188, ácido clorídrico e/ou hidróxido de sódio qsp pH, água para injetáveis)) por uma única vez (agudo) ou 1x ao dia durante 21 dias (prolongado).

Sabe-se que o uso prolongado de diazepam em altas doses (10mg/kg) promove o desenvolvimento de tolerância (LAZZARINI et. al., 2003; SILVA et.al., 2003). Desta forma, optou-se pelo tratamento de 21 dias para verificar o desenvolvimento de tolerância, agora para a dose de 1 mg/kg e, também, para melhor caracterizar seu tipo: funcional e/ou disposicional.

Foram, também, realizados experimentos utilizando-se o diazepam na dose de 10mg/kg, sendo este administrado da mesma forma, isto é, i.p.

Os animais foram divididos ao acaso em 6 grupos: controle agudo (CA), controle prolongado (CP), veículo agudo (VA), veículo prolongado (VP), diazepam agudo (DA) e diazepam prolongado (DP). Os animais do grupo diazepam agudo receberam por via i.p. uma única administração de diazepam. Os animais do grupo veículo agudo receberam o mesmo volume (1ml/kg) do veículo do diazepam; os animais do grupo controle agudo foram manipulados, da mesma forma que os dos demais grupos, porém não receberam qualquer tratamento, isto é, tiveram apenas a agulha introduzida, uma única vez, na cavidade peritoneal. Com relação aos animais do grupo diazepam prolongado, estes receberam o diazepam por via i.p. durante 21 dias. Os animais do grupo veículo prolongado receberam, da mesma forma o mesmo volume (1ml/kg) do veículo do diazepam, enquanto que os animais do grupo controle prolongado tiveram apenas a agulha introduzida, por 21 dias, na cavidade peritoneal. Os experimentos foram feitos uma hora após a única ou última administração das soluções nas dependências do Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP.

4.5 – Avaliação do Hemograma e Contagem de Reticulócitos

Após a eutanásia dos animais foi feita a coleta do sangue em tubos contendo EDTA. Para a avaliação do hemograma e contagem de reticulócitos dos animais seguiu-se o método proposto por Dacie e Lewis (1995).

Para a contagem de hemácias, pipetou-se 10 μ L de sangue e adicionou-se 2 mL de diluente de Gower na proporção 1/200. Em seguida, colocou-se na câmara de Neubauer e fez-se a contagem, usando objetiva de 40x.

Para a determinação do hematócrito, encheu-se 2/3 de um capilar com o sangue e, logo em seguida, este foi submetido à centrifugação por 5 minutos. Para a leitura, colocou-se o tubo sobre a tabela apropriada.

A dosagem de hemoglobina foi feita pelo método da cianometahemoglobina. Separaram-se três tubos de ensaio, no tubo branco, adicionou-se 2,5 mL de Reagente de Drabkin, no tubo padrão, adicionou-se 2,5 mL de Reagente de Drabkin e 10 μ L de Reagente padrão, e por fim, no tubo teste, adicionou-se 2,5 mL de Reagente de Drabkin e 10 μ L da amostra. Os tubos foram deixados em repouso por 5 minutos e, em seguida, fez-se a leitura no espectrofotômetro em 540 nm.

Para a contagem de reticulócitos, pipetou-se 50 μL de sangue e adicionou-se 25 μL de Azul de Cresil Brilhante a 1% em solução citrato salina. Em seguida, colocou-se em banho-maria a 37°C por 20 minutos e fez-se o esfregaço.

A contagem de leucócitos foi feita em hemocítômetro. Para tal, pipetou-se 20 μL de sangue e adicionou-se 380 μL de Líquido de Turk. Após um repouso de 3 minutos, colocou-se na câmara de Neubauer, sendo a leitura feita com objetiva de 10x.

4.6 – Avaliação do Peso Relativo do Baço, do Fígado e das Adrenais

Os animais previamente pesados foram eutanasiados, sendo procedida a coleta do baço, do fígado e das adrenais. Estes foram pesados em balança analítica, sendo o peso relativo calculado por meio da relação entre o peso do órgão e o peso do animal.

4.7 – Avaliação da Celularidade do Baço

Após a coleta e pesagem do baço, este foi transferido para uma placa de Petri de plástico, contendo meio de cultura McCoy's 5A[®] modificado (Sigma[®], St Louis, MO, USA) com EDTA (1mg/mL); rompeu-se mecanicamente, a cápsula do órgão liberando-se, assim, as células. As células obtidas foram quantificadas em hemocítômetro de Neubauer.

Para avaliação morfológica foram feitas lâminas obtidas por citocentrifugação de amostras da suspensão celular que foram, posteriormente, submetidas à coloração de May Grunwald-Giensa, modificado (ROSENFELD, 1947), para identificação e quantificação dos diferentes tipos celulares. Foram contadas 300 células por lâmina.

4.8 – Avaliação Global das Células da Medula Óssea

Após a eutanásia, por decapitação dos animais, as células da medula óssea foram retiradas da cavidade femoral esquerda de cada animal. Para tanto, fez-se a lavagem das mesmas com 1mL de meio McCoy's 5A[®]. modificado (Sigma[®], St Louis, MO, USA) com EDTA (1mg/mL). As células obtidas foram quantificadas em hemocítômetro de Neubauer.

Para avaliação morfológica dessas células foram feitas lâminas com material obtido por citocentrifugação de amostras da suspensão celular; essas células foram, posteriormente, submetidas à coloração de May Grunwald-Giensa, modificado (ROSENFELD, 1947), para identificação morfológica e quantificação dos diferentes tipos celulares. Foram contadas 300 células por lâmina.

4.9 – Dosagem dos Níveis Séricos de Corticosterona

4.9.1 – Coleta de sangue para obtenção do soro

Após a coleta, o sangue dos animais foi centrifugado (2.000 rpm/20 minutos em temperatura ambiente) para obtenção do soro. Este foi armazenado em eppendorfs de polietileno em freezer a -80°C até o momento da realização das dosagens hormonais. Os animais dos grupos experimentais e controles foram sacrificados de forma intercalada entre 8h e 10h horas da manhã de forma tal a minimizar influências de variações circadianas nos níveis séricos de corticosterona.

4.9.2 – Dosagem da corticosterona

As amostras de soro dos animais foram retiradas do freezer e mantidas à temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) para o descongelamento. As dosagens para quantificação de corticosterona foram realizadas por radioimunoensaio em fase sólida utilizando-se o kit comercial Coat-a-Count (DPC®, Los Angeles, CA, USA) específico. Os resultados dessas dosagens foram expressos em ng/mL.

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

4.10 – Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que simultaneamente mensura e analisa múltiplas características físicas de partículas simples, geralmente células, suspensas em um sistema de fluxo, desenvolvido de tal forma que estas células passem por um foco de luz, o laser. Na passagem pelo laser, registra-se a imagem (sombra) e fluorescência por leitor óptico; estes sinais ópticos são enviados a um sistema eletrônico que os converte em sinais eletrônicos, permitindo a leitura computadorizada. Dentre os parâmetros passíveis de medição, encontram-se: tamanho, granulosidade, complexidade interna e fluorescência relativa da célula (Silva – Tese de doutorado – 2003).

Foi utilizado o aparelho *Scalibur Becton Dickinson Immunocytometry Systems*, San José, CA, USA. A transmissão ou a refração da luz pelas células, foi captada 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, ato que permite sua leitura computadorizada (*Macintosh Apple*, San Jose, CA, USA) pelo *software Cell Quest Pro* (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA).

Os dados foram coletados por meio da análise de *gates*, sendo os resultados obtidos analisados pelo uso do programa *Cell Quest Pro* (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) para a avaliação da apoptose/necrose, ou através do programa *FlowJo* (*Treestar* – Versão 7.2.1 para Windows) para a avaliação da proliferação e da fenotipagem.

4.10.1 – Avaliação da Viabilidade de Linfócitos

Para verificar a eventual presença de apoptose e necrose dos linfócitos, foi adaptado o modelo descrito por Navarro (2005). Assim, foram utilizados os fluorocromos PI (iodeto de propídeo), indicador de perda de seletividade de membrana e conseqüentemente, de células inviáveis (necrose), além da Anexina V-FITC, marcador específico de fosfatidil-serina, proteína fisiologicamente expressa na parte intracelular da membrana para avaliar a apoptose, uma vez que ela se torna externalizada quando se inicia o processo apoptótico mediado por caspases (BEHBAHANI *et al.*, 2005).

Conforme metodologia proposta, pipetou-se 100 µL de sangue periférico heparinizado, procedendo-se à lise hipotônica das hemácias e, após lavagem das células com o tampão de ligação, estas foram incubadas com 100 µL de Anexina V-FITC (diluída 1:500), em temperatura ambiente e no escuro por 20 minutos. Após este período, as amostras foram ressuspensas em 400 µL de tampão de ligação, e em seguida foi realizada a leitura no citômetro de fluxo. O iodeto de propídeo (PI, 40 µL na concentração de 100 µg/mL) foi adicionado aos tubos no momento da leitura no citômetro.

Devido à dupla marcação celular com os fluorocromos, foram obtidas, por meio da seleção de *gate*, 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 (KAPISZEWSKA *et. al.*, 2007).

4.10.2 – Avaliação da Proliferação de Esplenócitos

4.10.2a – Obtenção dos Esplenócitos

Para verificar a proliferação de esplenócitos, o baço dos animais foi coletado de forma asséptica e, após lavagem com solução de RPMI estéril, foi macerado em 5 mL desta mesma solução. Estas células foram centrifugadas (1200 rpm, 8 min, 4°C) e o botão celular ressuspense em solução de cloreto de amônio para lise das hemácias. Este processo foi repetido até completa lise das hemácias.

Em seguida, as células foram ressuspensas em meio RMPI completo (10% SFB – soro bovino fetal) e incubadas em placas de 6 poços por 1 hora em estufa a 37°C e 5% de CO₂ para aderência dos monócitos e macrófagos. Após incubação, o sobrenadante contendo as células não aderentes, principalmente linfócitos, foi transferido para tubos do tipo falcons de 15 mL para serem contados em câmara de Neubauer com azul de Tripán, avaliando-se aqui a viabilidade das células. Fez-se, então, o ajuste de 2×10^7 células/ mL.

4.10.2b – Avaliação da Proliferação dos Esplenócitos

Após o ajuste do número de células para 2×10^7 células/mL, estas foram incubadas com o fluorocromo CFSE-DA (25µM) por 20 minutos a 37°C e 5% CO₂. Fez-se a lavagem destas células com RPMI completo estéril e novamente estas foram contadas, sendo ajustadas para uma concentração final de 2×10^5 células / 100µl / poço de cultura. As células foram, então, “plaqueadas” em placas de 96 *wells* fundo em “U” em triplicata, sendo mantidas em estufa a 37° C, 5% de CO₂ por 4 dias, para posterior avaliação por citometria de fluxo.

A proliferação destes esplenócitos foi avaliada sem estímulo (basal) e estimulada *in vitro* pelos mitógenos ConA 5µg/ml (Concanavalina A) e PHA (fitohemaglutinina A) para as células T e LPS 3µg/ml (Lipopolissacarídeo bacteriano) para as células B.

Um esquema da placa utilizada para este experimento é ilustrado na figura 2 a seguir.

4.10.3 – Avaliação da Fenotipagem de Linfócitos

Após a coleta de sangue periférico heparinizado, uma alíquota de 100 µL do mesmo foi adicionada aos tubos de citometria, procedendo-se à lise hipotônica das hemácias (2 mL de solução salina 0,2% adicionados aos tubos por 20 segundos seguido de 2 mL de solução salina 1,6%). Em seguida, as amostras foram incubadas com os anticorpos monoclonais conjugados com marcadores fluorescentes durante 1 hora, no escuro e em temperatura ambiente. Foram utilizados anticorpos monoclonais conjugados ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE): anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD45RA. As células marcadas duplamente para anti-CD3 e anti-CD4 foram tidas como linfócitos T *helper* (CD4+), as marcadas com anti-CD8 como linfócitos T citotóxicos e as marcadas com anti-CD45RA como linfócitos B.

Para determinar a quantidade de receptores benzodiazepínicos periféricos (PBR) presentes em leucócitos de ratos foi adaptado o modelo descrito por Sängier e colaboradores (2000).

Após a coleta do baço e do sangue, procedeu-se a lise das hemácias por meio de lise hipotônica (2 mL de solução salina 0,2% adicionados aos tubos por 20 segundos seguido de 2 mL

de solução salina 1,6%). As amostras foram centrifugadas a 1200rpm, 8 minutos, 4°C e se necessário, o procedimento foi repetido. As células foram contadas em câmara de Neubauer, ajustadas para $1,0 \times 10^6$ células por *ependorf* e posteriormente fixadas em 100 µl de solução paraformaldeído a 0,04% em PBS por 5 minutos. Após a fixação, as amostras foram centrifugadas (1200rpm, 8 minutos, 4°C) e ressuspensas em 100 µl de uma solução 0,1% de saponina em PBS 1% e Albumina Sérica Bovina por 5 minutos para permeabilização. Incubou-se o anticorpo primário (anti-PBR rabbit policlonal, gentilmente doado pelo Professor Vassilios Papadopoulos – Universidade McGill) diluído a 1:100, durante 60 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem das amostras em PBS, incubou-se o anticorpo secundário (anti-IgG goat anti rabbit – conjugado a FITC, Santa Cruz Biotechnology) diluído a 1:100 durante 30 minutos, à temperatura ambiente e no escuro. Como controle negativo, foram analisadas amostras incubadas apenas com o anticorpo secundário.

As amostras foram centrifugadas e ressuspensas em 500µL de PBS para leitura em Citometro de Fluxo (FACScan Becton Dycson®) e posterior análise. Verificou-se a porcentagem de células positivas para PBR (% de células que expressam PBR) e a intensidade de fluorescência emitida por célula (quantidade de PBR presente por célula), portanto, quanto maior a fluorescência que é emitida pela célula, maior a quantidade de receptores. Os resultados foram expressos em média geométrica.

4.11 – Dosagem dos Níveis Plasmáticos de Diazepam

Desenvolveu-se um método para a análise quantitativa dos níveis plasmáticos de diazepam e de seu principal produto de biotransformação ativo, desmetildiazepam, em amostras de plasma utilizando a técnica de microextração em fase líquida (LPME) e identificação por cromatografia em fase gasosa acoplada ao detector nitrogênio-fósforo (GC/NPD). Este método foi desenvolvido no Laboratório de Análises Toxicológicas (LAT) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

4.11.1 – Equipamentos

- Equipamento de cromatografia em fase gasosa acoplado com detector nitrogênio-fósforo 6890N modelo Agilent-Technologies, equipado com coluna capilar DB1 (Agilent Technologies) com as seguintes dimensões (25m x 0,2mm, 0,33µm);
- Agitador com movimento horizontal tipo Kahn – Nova Ética;

- Centrífuga Fanem – Excelsa II modelo 206BL
- Ultrassom –UNIQUE Modelo USC700.

4.11.2 – Condições Cromatográficas

As seguintes condições foram padronizadas para análise de diazepam e desmetildiazepam extraídos do plasma:

- Injetor: - temperatura: 250°C.
 - Modo Split (1:5);
- Coluna: - fluxo de nitrogênio constante: 2,0 mL/minuto;
 - temperatura inicial do forno: 40°C por 1 minuto;
 - rampa: 40°C/minuto até 230°C; 5°C/minuto até 250°C; 20°C/minuto até 300°C;
 - temperatura final do forno: 300°C por 2 minutos.
- Gás de arraste: Nitrogênio
- Detector: nitrogênio-fósforo (temperatura: 300°C);

4.11.3 – Amostras de Plasma

Para a realização da extração e detecção do diazepam e do seu principal produto de biotransformação ativo, desmetildiazepam, foram utilizadas amostras de plasma coletadas de ratos machos Wistar provenientes de proles obtidas no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), sendo estes já citados no item 4.1.

4.11.3a – Preparação da Amostra

A extração foi realizada através da técnica de microextração em fase líquida (LPME). Em um *vial* de 4mL foram adicionados 2mL de plasma de rato, 100μL de metanol e 1mL de solução tampão fosfato 0,1M (pH=7,5), além das soluções padrões de prazepam (PI), diazepam e desmetildiazepam. Em seguida, este tubo foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante, acondicionando-o em outro *vial* de 4mL.

A fibra foi colocada em contato com o solvente orgânico (nonanol) por 10 segundos e logo após, conectada a uma micro-seringa, para que o líquido aceptor pudesse ser introduzido e retirado com facilidade. Em seguida, esta fibra foi preenchida com seu líquido aceptor, cerca de 20µL do solvente orgânico (nonanol), e colocada em contato com a amostra.

Esse sistema foi submetido à agitação por 50 minutos para aumentar a velocidade de transferência dos analitos para a fase extratora, e após esse período, o líquido aceptor foi retirado com a micro-seringa, sendo 1µL injetado no cromatógrafo. Um esquema da utilização da LPME pode ser visualizado na **figura 3**.

Figura 3 – Sistema bifásico de microextração em fase líquida (LPME) empregado. (1) Micro-seringa; (2) Vial de amostra; (3) Líquido aceptor; (4) fibra porosa; (5) amostra; (6) agitador.

4.11.4 – Validação do Método

A validação de um método analítico é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência (RIBANI et al, 2004). A validação de um método deve garantir através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando aplicabilidade dos resultados (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

Para validação do método determinaram-se os seguintes parâmetros para todos os analitos de interesse (diazepam e desmetildiazepam): limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão intra e interensaio e recuperação

4.11.4a – Limite de Detecção e Quantificação

A obtenção dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foi feita através do método empírico, que consiste na análise de uma série de amostras de plasma negativas às quais foram adicionadas as soluções-padrão de benzodiazepínicos em concentrações decrescentes.

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003), porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas, no qual apresenta um coeficiente de variação que não exceda 20% para seis replicatas.

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003), apresentando um coeficiente de variação abaixo de 10% para seis replicatas.

4.11.4b – Linearidade

É a capacidade de um método analítico de demonstrar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (RIBANI et al, 2004). O estudo de linearidade foi realizado pela análise de amostras de plasma com 7 (seis) pontos em triplicata, submetidas ao método proposto nas seguintes concentrações: 25, 50, 100, 200, 500, 1000 e 2000ng/mL

As concentrações foram inseridas no eixo das abscissas (eixo X) e a razão obtida entre as áreas de cada fármaco e do padrão interno no eixo das ordenadas (eixo Y); através de regressão linear, o coeficiente de determinação (r^2) foi calculado e valores acima de 0,99 foram considerados satisfatórios para este estudo.

4.11.4c – Precisão intra-ensaio e interensaio

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio. (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). As precisões intra-ensaio e interensaio foram determinadas

indiretamente pelo cálculo de imprecisão por meio da determinação do coeficiente de variação do método (CV), de acordo com a fórmula:

$$CV(\%) = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{concentração média determinada}} \times 100$$

O estudo foi feito analisando-se amostras de plasma em três dias diferentes. As análises foram conduzidas em seis replicatas para cada concentração de controle de qualidade (CQ), onde foram utilizadas concentrações de 75 ng/mL para o controle de qualidade baixo; 750 ng/mL para o controle de qualidade médio e 1500 ng/mL para o controle de qualidade alto.

4.11.4d – Exatidão intra-ensaio e interensaio

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). A exatidão foi obtida através do cálculo da inexatidão, conforme a fórmula a seguir:

$$\text{Inexatidão (\%)} = \frac{\text{Concentração média experimental} - \text{Concentração teórica}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

A exatidão foi avaliada por meio da análise dos mesmos dados utilizados para os cálculos da precisão intra e interensaios. Os resultados foram expressos em porcentagem do erro relativo que, para esse tipo de estudo, não deve exceder o valor de 15% (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

4.11.4e – Recuperação

A recuperação avalia a capacidade do processo de preparação da amostra em extrair o analito da matriz, assim como a variação dessa capacidade durante as análises através do cálculo do coeficiente de variação (CV). O estudo foi feito por meio da análise direta de seis replicatas de soluções-padrão, onde foram utilizadas concentrações de 75 ng/mL, 750 ng/mL e 1500 ng/mL. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis,

porém, admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste de Bartlett, para verificação da homocedasticidade. Os dados paramétricos foram previamente submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas. Foram consideradas significantes as análises que apresentaram nível de significância $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

6 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

6.1 – Experimento 1: Avaliação dos efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 1 mg/kg sobre o hemograma, contagem de reticulócitos, peso relativo do baço, do fígado e das adrenais, celularidade do baço e células da medula óssea.

Foram utilizados 42 animais divididos ao acaso em 6 grupos: controle agudo (n=4), controle prolongado (n=6), veículo agudo (n=8), veículo prolongado (n=8), diazepam agudo (n=8) e diazepam prolongado (n=8). Neste experimento, os animais do grupo diazepam receberam o diazepam, por via i.p., na dose de 1 mg/kg, já os animais do grupo controle foram apenas manipulados. Os grupos experimentais foram descritos no item 4.4.

Uma hora após a única ou a última administração das soluções ou da última manipulação avaliou-se o hemograma, a contagem de reticulócitos, o peso relativo do baço, do fígado e das adrenais, bem como a celularidade do baço e da medula óssea dos animais conforme método descrito nos itens 4.5, 4.6, 4.7 e 4.8.

A **tabela 1** mostra os resultados referentes ao hemograma e a contagem de reticulócitos após o tratamento agudo e prolongado com diazepam na dose de 1mg/kg. Observou-se uma diminuição nos valores de hemácias ($F(5,36)=3,401$; $p<0,05$), de hemoglobina ($F(5,36)=4,593$; $p<0,01$) e de hematócrito ($F(5,36)=4,145$; $p<0,05$) nos animais do grupo diazepam prolongado em relação aos do grupo diazepam agudo. Já no que diz respeito ao número total de leucócitos periféricos, não se observam alterações significantes deste parâmetro após tratamento com o diazepam ($p>0,05$). A **figura 4** ilustra esses resultados.

Tabela 1 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 1mg/kg sobre o hemograma e a contagem de reticulócitos

Eritrograma	Agudo			Prolongado		
	Controle ¹	Veículo	Diazepam	Controle ¹	Veículo	Diazepam
Hemoglobina (g/dL)	15,5 ± 0,29	16,45 ± 0,67	16,75 ± 0,94	15,22 ± 0,80	15,78 ± 0,86	14,94 ± 1,30 ^a
Hematócrito (%)	43,83 ± 1,46	46,39 ± 1,95	48,5 ± 3,66	43,23 ± 2,47	44,66 ± 2,61	42,61 ± 4,05 ^a
Hemácias (cél/s × 10 ⁶ / mm ³)	8,00 ± 0,16	8,24 ± 0,39	8,67 ± 0,59	7,74 ± 0,48	8,06 ± 0,60	7,69 ± 0,68 ^b
Leucócitos (cél/s × 10 ³ / mm ³)	3,20 ± 0,36	4,18 ± 2,00	5,16 ± 1,8	4,12 ± 0,95	5,04 ± 0,78	5,16 ± 1,80
Reticulócitos	6,76 ± 0,43	7,69 ± 1,19	7,14 ± 0,88	7,09 ± 0,31	6,87 ± 0,51	6,98 ± 0,77

Os valores representam média ± desvio padrão. 1-Animais apenas manipulados. ^a $p<0,01$ em relação ao grupo diazepam agudo;

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

Figura 4 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 1 mg/kg sobre o hemograma e a contagem de reticulócitos. Os animais do grupo controle foram apenas manipulados. Os dados representam os valores de médias $\pm$ desvio padrão dos animais. ^a p<0,01 em relação ao grupo diazepam agudo; ^b p<0,05 em relação ao grupo diazepam agudo

A **tabela 2** mostra os resultados referentes ao diferencial das células sanguíneas após tratamento agudo e prolongado com diazepam na dose de 1mg/kg. Observou-se um aumento das células segmentadas nos animais do grupo veículo prolongado em relação aos do grupo veículo agudo ($F(5,36)=7,755$; $p<0,05$) e aos do grupo controle prolongado ($F(5,36)=7,755$; $p<0,05$), assim como um aumento dessas células nos animais do grupo diazepam prolongado em relação aos

animais do grupo controle prolongado ($F(5,36=7,755; p<0,01)$) e em relação aos animais do grupo diazepam agudo ($F(5,36=7,755; p<0,01)$). A **figura 5** ilustra esses resultados.

Tabela 2 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 1mg/kg sobre o diferencial das células sanguíneas

Diferencial do Sangue	Agudo			Prolongado		
	Controle ¹	Veículo	Diazepam	Controle ¹	Veículo	Diazepam
Segmentados (mm^3)	970 $\pm$ 139,4	1071 $\pm$ 243,2	1043 $\pm$ 232,1	1073 $\pm$ 301,5	1644 $\pm$ 267,8 ^{bd}	1815 $\pm$ 659,1 ^{ac}
Linfócitos (mm^3)	1578 $\pm$ 928,2	2630 $\pm$ 1241,8	2355 $\pm$ 506,1	2776 $\pm$ 680,5	3042 $\pm$ 590,0	3092 $\pm$ 948,5
Monócitos (mm^3)	141 $\pm$ 33,5	172 $\pm$ 75,3	209 $\pm$ 67,2	210 $\pm$ 76,3	256 $\pm$ 47,3	255 $\pm$ 81,5
Eosinófilos (mm^3)	0 $\pm$ 0	61 $\pm$ 76,3	40 $\pm$ 37,5	57 $\pm$ 20,6	64 $\pm$ 39,3	68 $\pm$ 67,4

Os valores representam média $\pm$ desvio padrão dos animais. 1- Animais apenas manipulados. ^a $p<0,01$ em relação ao grupo controle prolongado; ^b $p<0,05$ em relação ao grupo veículo agudo; ^c $p<0,01$ em relação ao grupo diazepam agudo; ^d $p<0,05$ em relação ao grupo controle prolongado.

Figura 5 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 1 mg/kg sobre o diferencial das células sanguíneas. Os animais do grupo controle foram apenas manipulados. Os dados representam os valores de médias $\pm$ desvio padrão dos animais. ^a $p<0,01$ em relação ao grupo controle prolongado; ^b $p<0,05$ em relação ao grupo veículo agudo; ^c $p<0,01$ em relação ao grupo diazepam agudo; ^d $p<0,05$ em relação ao grupo controle prolongado

A **tabela 3** mostra os resultados referentes ao peso relativo do baço, do fígado e das adrenais após tratamento agudo e prolongado com diazepam na dose de 1mg/kg. Verifica-se de sua análise que o diazepam na dose de 1mg/kg não foi capaz de alterar esses parâmetros analisados ($p>0,05$).

Tabela 3 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 1mg/kg sobre o peso relativo do baço, do fígado e das adrenais

Peso Relativo	Agudo			Prolongado		
	Controle ¹	Veículo	Diazepam	Controle ¹	Veículo	Diazepam
Baço (g)	0,20 ± 0,05	0,21 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,22 ± 0,04	0,29 ± 0,08	0,26 ± 0,09
Fígado (g)	3,75 ± 0,43	3,94 ± 0,25	3,89 ± 0,22	4,06 ± 0,13	4,21 ± 0,54	3,86 ± 0,17
Adrenal (g)	0,016 ± 0,002	0,019 ± 0,002	0,018 ± 0,002	0,016 ± 0,002	0,02 ± 0,002	0,02 ± 0,003

Os valores representam média ± desvio padrão dos animais. 1- Animais apenas manipulados.

Os dados referentes à celularidade do baço e da medula óssea são apresentados na **tabela 4**; observa-se que tanto a administração aguda quanto a prolongada de diazepam (1 mg/kg) não foi capaz de alterar tais parâmetros ($p>0,05$).

Tabela 4 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 1mg/kg sobre a celularidade do baço e da medula óssea

Celularidade	Agudo			Prolongado		
	Controle ¹	Veículo	Diazepam	Controle ¹	Veículo	Diazepam
Baço (céls × 10 ⁸)	2,93 ± 0,82	3,32 ± 1,14	3,92 ± 0,42	4,03 ± 0,64	3,65 ± 0,67	3,7 ± 0,54
Medula óssea (céls × 10 ⁷)	2,88 ± 1,12	3,27 ± 1,07	3,85 ± 0,75	4,04 ± 1,17	3,45 ± 0,84	3,88 ± 1,00

Os valores representam média ± desvio padrão dos animais. 1- Animais apenas manipulados.

A **tabela 5** mostra os resultados referentes ao esplenograma realizado após tratamento agudo e prolongado com diazepam na dose de 1mg/kg. Verificou-se um aumento das células segmentadas apenas nos animais do grupo controle prolongado em relação aos do grupo controle agudo ($F(5,36)=3,389$; $p<0,05$). A **figura 6** ilustra esses resultados.

Tabela 5 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 1mg/kg sobre o esplenograma dos animais

Esplenograma (cél/s x 10 ⁷ /mL)	Agudo			Prolongado		
	Controle ¹	Veículo	Diazepam	Controle ¹	Veículo	Diazepam
Blastos	0,12 ± 0,1	0,07 ± 0,06	0,10 ± 0,04	0,11 ± 0,05	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,05
Forma Jovem	0,02 ± 0,02	0	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0
Forma Anel	0,02 ± 0,02	0	0,01 ± 0,02	0	0,01 ± 0,02	0,02 ± 0,03
Segmentados	0,14 ± 0,07	0,22 ± 0,09	0,28 ± 0,06	0,31 ± 0,08 ^a	0,28 ± 0,08	0,20 ± 0,06
Eosinófilos	0,02 ± 0,02	0,01 ± 0,02	0,04 ± 0,05	0,09 ± 0,1	0,04 ± 0,08	0,08 ± 0,09
Linfócitos	2,69 ± 0,37	2,94 ± 0,29	2,98 ± 0,33	2,93 ± 0,49	2,74 ± 0,53	2,77 ± 0,49
Eritroblastos Jovens	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,03	0,04 ± 0,04	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,04	0,05 ± 0,02
Eritroblastos Maduros	0,37 ± 0,03	0,36 ± 0,13	0,45 ± 0,08	0,51 ± 0,07	0,43 ± 0,12	0,46 ± 0,12
Relação G/E	0,48 ± 0,29	0,71 ± 0,24	0,71 ± 0,24	0,73 ± 0,18	0,75 ± 0,37	0,66 ± 0,36

Os valores representam média ± desvio padrão dos animais. G/E= Relação grânulo/eritróide. ^ap<0,05 em relação ao grupo controle agudo. 1- Animais apenas manipulados.

Figura 6 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 1 mg/kg sobre esplenograma de ratos. Os animais controle foram apenas manipulados. Os dados representam os valores de médias $\pm$ desvio padrão dos animais. ^ap<0,05 em relação ao grupo controle agudo

A **tabela 6** mostra os resultados referentes ao mielograma dos animais após tratamento agudo e prolongado com diazepam, na dose de 1mg/kg. Observou-se um aumento do número de blastos nos animais do grupo diazepam agudo e controle prolongado em relação aos animais do grupo controle agudo ($F(5,36)=2,912$; $p<0,05$), bem como uma diminuição da relação grânulo/eritróide nos animais dos grupos veículo e diazepam agudo e controle prolongado em relação aos animais do grupo controle agudo ($F(5,36)=3,250$; $p<0,05$). A **figura 7** ilustra esses resultados.

Tabela 6 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 1mg/kg sobre o mielograma dos animais

Mielograma (célx 10^7 /mL)	Agudo			Prolongado		
	Controle ¹	Veículo	Diazepam	Controle ¹	Veículo	Diazepam
Blastos	0,04 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,04	0,11 $\pm$ 0,05 *	0,12 $\pm$ 0,05 *	0,08 $\pm$ 0,05	0,07 $\pm$ 0,03
Forma Jovem	0,06 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,05	0,09 $\pm$ 0,05	0,09 $\pm$ 0,03	0,1 $\pm$ 0,04	0,08 $\pm$ 0,04
Forma Anel	0,16 $\pm$ 0,12	0,13 $\pm$ 0,05	0,18 $\pm$ 0,07	0,20 $\pm$ 0,06	0,17 $\pm$ 0,07	0,18 $\pm$ 0,09
Segmentados	1,54 $\pm$ 0,72	1,56 $\pm$ 0,52	1,85 $\pm$ 0,38	1,90 $\pm$ 0,51	1,67 $\pm$ 0,50	1,97 $\pm$ 0,48
Eosinófilos	0,26 $\pm$ 0,10	0,27 $\pm$ 0,10	0,29 $\pm$ 0,09	0,27 $\pm$ 0,09	0,26 $\pm$ 0,09	0,25 $\pm$ 0,07
Linfócitos	0,51 $\pm$ 0,04	0,67 $\pm$ 0,25	0,71 $\pm$ 0,15	0,91 $\pm$ 0,50	0,66 $\pm$ 0,30	0,84 $\pm$ 0,27
Eritroblastos Jovens	0,03 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,05	0,07 $\pm$ 0,04	0,08 $\pm$ 0,04	0,08 $\pm$ 0,03	0,07 $\pm$ 0,05
Eritroblastos Maduros	0,30 $\pm$ 0,11	0,40 $\pm$ 0,14	0,46 $\pm$ 0,12	0,45 $\pm$ 0,12	0,42 $\pm$ 0,12	0,42 $\pm$ 0,12
Relação G/E	6,18 $\pm$ 0,63	4,64 $\pm$ 0,80 *	4,70 $\pm$ 0,75 *	4,62 $\pm$ 0,52 *	4,47 $\pm$ 0,95	5,17 $\pm$ 0,82

Os valores representam média $\pm$ desvio padrão dos animais. G/E= Relação grânulo/eritróide. 1- Animais apenas manipulados. * $p<0,05$ em relação ao grupo controle agudo.

Figura 7 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 1 mg/kg sobre mielograma de ratos. Os animais controles foram apenas manipulados. Os dados representam os valores de médias $\pm$ desvio padrão dos animais. * p<0,05 em relação ao grupo controle agudo

6.2 – Experimento 2: Avaliação dos efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 1 mg/kg sobre a viabilidade de linfócitos do sangue periférico.

Foram utilizados 32 animais divididos ao acaso em 4 grupos iguais: veículo agudo, veículo prolongado, diazepam agudo e diazepam prolongado. Os animais do grupo diazepam agudo receberam por via i.p. uma única administração de diazepam 1 mg/kg, enquanto que os animais do grupo veículo agudo receberam a mesma dose (1ml/kg) do veículo do diazepam. Os animais do grupo diazepam prolongado receberam durante 21 dias o diazepam na dose de 1 mg/kg, por via i.p., e os animais do grupo veículo prolongado receberam idêntico volume (1ml/kg) do veículo do diazepam. Uma hora após a única ou a última administração das soluções avaliou-se a viabilidade dos linfócitos periféricos dos animais conforme método descrito no item 4.10.1.

As figuras 8 a 11 ilustram alguns dos citogramas ilustrativos dos dados referentes à SSC e FSC de leucócitos de sangue de ratos e os histogramas que ilustram a fluorescência destas células frente aos diferentes marcadores utilizados. Citogramas e histogramas como estes 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 8 corresponde às populações de leucócitos periféricos de animais controles, especificamente ele mostra a seleção que se fez da população de interesse (linfócitos) usada para a realização das análises de viabilidade de leucócitos, assim também, como para as análises de proliferação de esplenócitos e fenotipagem de leucócitos apresentadas a seguir.

Figura 8 – Citograma de leucócitos circulantes de animais controles; R1= linfócitos; R2= monócitos; R3= neutrófilos;

Nas figuras 9 e 10, podem-se observar exemplos de histogramas de fluorescência de populações de linfócitos, obtidas frente aos diferentes fluorocromos, isto é, Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (PI), respectivamente, e utilizadas neste trabalho. Observa-se a presença de dois picos celulares, sendo o da esquerda (1) correspondente ao basal e o da direita (2) correspondente às células marcadas com o fluorocromo.

Figura 9 – Histograma de leucócitos incubados com Anexina V-FITC. 1= fluorescência basal; 2= fluorescência fluorocromo;

Figura 10 – Histograma de leucócitos incubados com Iodeto de propídeo. 1= fluorescência basal; 2= fluorescência fluorocromo;

Figura 11 – Citograma de linfócitos periféricos incubados com Anexina V-FITC e PI; 1= Células viáveis; 2= Células apoptóticas; 3= Células em apoptose tardia/necrose; 4= Células Necróticas

Finalmente, a figura 11 exemplifica um dos citogramas usados para a análise de viabilidade celular por quadrantes de dupla marcação, de um animal do grupo controle, obtido pela seleção da população de interesse, também quando incubado com Anexina V-FITC e PI. O quadrante superior esquerdo representa as células necróticas, o superior direito representa as células em apoptose tardia/necrose, o inferior esquerdo representa as células viáveis, e por fim, o inferior direito representa as células apoptóticas.

Como informado, os citogramas e histogramas acima apresentados ilustram o que foi detectado por meio do citômetro e pelo software *FlowJo* durante as análises de viabilidade de linfócitos, ou seja, as populações celulares distintas, suas diferentes respostas e conseqüentemente suas diferentes intensidades de fluorescência. É importante ressaltar, nesse sentido, que todos os dados colhidos no experimento 5, e apresentados a seguir, foram obtidos dessa forma.

A **tabela 7** apresenta os resultados referentes à viabilidade de linfócitos do sangue periférico dos animais tratados aguda e prolongadamente com diazepam na dose de 1mg/kg. Verificou-se que, tanto o tratamento agudo quanto o tratamento prolongado de diazepam, nesta dose, não foi capaz de alterar tais parâmetros ($p > 0,05$).

Tabela 7 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 1 mg/kg sobre a viabilidade de linfócitos periféricos

Apoptose	Agudo		Prolongado	
	Veículo	Diazepam	Veículo	Diazepam
Necrose	0,87 ± 0,52	0,92 ± 0,52	0,92 ± 0,52	0,50 ± 0,15
Apoptose	2,49 ± 1,48	2,89 ± 1,53	2,85 ± 1,26	2,53 ± 1,03
Apoptose tardia/Necrose	0,85 ± 0,62	1,05 ± 0,74	0,49 ± 0,31	0,84 ± 0,48
Células Viáveis	94,98 ± 2,83	94,32 ± 3,45	95,47 ± 2,14	96,08 ± 1,46

Os valores representam média ± desvio padrão dos animais.

6.3 – Experimento 3: Avaliação dos efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 1 mg/kg sobre a proliferação de esplenócitos.

Foram utilizados 32 animais divididos ao acaso em 4 grupos iguais: veículo agudo, veículo prolongado, diazepam agudo e diazepam prolongado. O tratamento dos animais foi semelhante ao descrito no item 6.2. Uma hora após a única ou a última administração das soluções avaliou-se a proliferação de linfócitos dos animais conforme método descrito no item 4.10.2.

Para a avaliação da proliferação de esplenócitos as populações celulares foram previamente selecionadas da mesma maneira que as utilizadas para a avaliação da viabilidade de linfócitos, conforme ilustrado na figura 7.

As figuras 12 a 15 exemplificam os citogramas seguidos dos histogramas de animais do grupo controle quando não estimulados, ou após a estimulação com LPS, PHA ou ConA, respectivamente. Observa-se nos citogramas um deslocamento da população, devido ao maior número de células imaturas e maiores. Com relação aos histogramas, é possível observar um deslocamento da fluorescência para a esquerda, devido à diminuição da concentração do fluorocromo, neste caso CFSE, que através do processo de divisão celular foi distribuído às demais células.

Figura 12 – Citograma e histograma de células sem estímulo (basal)

Figura 13 – Citograma e histograma de células após o estímulo com o mitógeno PHA. Observa-se que após adição do mitógeno tem-se no citograma um deslocamento das células. Já nos histogramas nota-se um deslocamento para a esquerda

Figura 14 – Citograma e histograma de células após o estímulo com o mitógeno LPS. Observa-se que após adição do mitógeno tem-se no citograma um deslocamento das células devido ao maior número de células imaturas e maiores. Já nos histogramas nota-se um deslocamento para a esquerda

Figura 15 – Citograma e histograma de células após o estímulo com o mitógeno ConA. Observa-se que após adição do mitógeno tem-se no citograma um deslocamento das células devido ao maior número de células imaturas e maiores. Já nos histogramas nota-se um deslocamento para a esquerda

Como já salientado, os citogramas e histogramas apresentados têm apenas o objetivo de ilustrar o que foi detectado por meio do citômetro e pelo software *FlowJo* durante as análises de proliferação de esplenócitos, ou seja, as populações celulares distintas, suas diferentes respostas e conseqüentemente suas diferentes intensidades de fluorescência. Os dados colhidos no experimento 6 e apresentados a seguir, foram todos obtidos da mesma forma.

Quando avaliamos a porcentagem de proliferação dos esplenócitos sem estimulação ou quando estimulados com um mitógeno, seja ele LPS, PHA ou ConA, observamos que o diazepam, administrado aguda e prolongadamente, na dose de 1mg/kg, não foi capaz de produzir qualquer tipo de alteração ($p>0,05$), sendo estes dados apresentados na **tabela 8**.

Tabela 8 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 1 mg/kg sobre a proliferação de esplenócitos

Proliferação	Agudo		Prolongado	
	Veículo	Diazepam	Veículo	Diazepam
Basal (%)	80,66 ± 3,30	82,86 ± 2,15	82,48 ± 2,32	79,21 ± 7,20
PHA (%)	83,21 ± 1,61	83,50 ± 1,66	82,11 ± 4,50	77,60 ± 5,17
LPS (%)	76,45 ± 2,88	77,60 ± 3,11	74,47 ± 5,30	73,16 ± 2,85
ConA (%)	64,73 ± 5,65	61,80 ± 6,90	62,11 ± 8,15	63,56 ± 6,21

Os valores representam média ± desvio padrão dos animais.

6.4 – Experimento 4: Avaliação dos efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 1 mg/kg sobre a fenotipagem de linfócitos do sangue periférico.

Foram utilizados 42 animais divididos ao acaso em 6 grupos: controle agudo (n=4), controle prolongado (n=6), veículo agudo (n=8), veículo prolongado (n=8), diazepam agudo (n=8) e diazepam prolongado (n=8). Neste experimento, os animais do grupo diazepam receberam o diazepam, por via i.p., na dose de 1 mg/kg, já os animais do grupo controle foram apenas manipulados. Os grupos experimentais foram descritos no item 4.4.

Uma hora após a única ou a última administração das soluções avaliou-se a fenotipagem de linfócitos do sangue periférico conforme método descrito no item 4.10.3.

Para a avaliação da fenotipagem de linfócitos periféricos as populações celulares foram previamente selecionadas da mesma maneira que as utilizadas para a avaliação da viabilidade de linfócitos, conforme ilustrado na figura 7.

As figuras 16 e 17 correspondem aos histogramas provenientes de animais do grupo controle agudo, e ilustram os dados de fluorescência das populações de linfócitos obtidas frente aos diferentes marcadores celulares, isto é, CD8-PE e CD45-FITC, respectivamente, e utilizados neste trabalho. Observa-se a presença de dois picos celulares, sendo o da esquerda correspondente ao basal e o da direita correspondente às células marcadas com o fluorocromo.

Figura 16 – Histograma de leucócitos incubados com CD8-PE, ilustrando a porcentagem de linfócitos positivos para CD8-PE (Células Tc)

Figura 17 – Histograma de leucócitos incubados com CD45-FITC, ilustrando a porcentagem de linfócitos positivos para CD45-FITC (Células B)

Estas figuras, de caráter ilustrativo, serão apresentadas apenas neste primeiro experimento, porém, é importante ressaltar que os dados colhidos no experimento 5, mostrados a seguir, foram obtidos da mesma forma.

A figura 18 exemplifica um dos citogramas usados para a análise da fenotipagem de leucócitos por quadrantes de dupla marcação, de um animal do grupo controle agudo, obtido pela seleção da população de interesse, após incubação e marcação com CD3-FITC e CD4-PE. Neste caso, o quadrante de interesse é o superior direito, que representa as células duplamente marcadas com os fluorocromos.

Figura 18 – Citograma de linfócitos periféricos incubados com CD3-FITC e CD4-PE, ilustrando os linfócitos duplo positivos para CD3-FITC e CD4-PE (Células Th)

A **tabela 9** mostra os resultados de fenotipagem de leucócitos do sangue periférico após o tratamento agudo e prolongado com diazepam na dose de 1mg/kg. Como se depreende de sua leitura, observou-se uma diminuição no número de células B (marcadas com CD45) dos animais do grupo veículo agudo em relação aos animais do grupo controle agudo ($F(5,35)=5,670$; $p<0,05$) e um aumento dessas células nos animais do grupo veículo prolongado em relação aos animais do grupo veículo agudo ($F(5,35)=5,670$; $p<0,05$). Os demais parâmetros não mostraram quaisquer tipos de alteração ($p>0,05$). A **figura 19** ilustra esses resultados.

Tabela 9 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 1mg/kg sobre a fenotipagem de linfócitos do sangue periférico

Fenotipagem	Agudo			Prolongado		
	Controle ¹	Veículo	Diazepam	Controle ¹	Veículo	Diazepam
CD3+CD4+ (%)	47,63 ± 8,43	54,25 ± 4,99	54,05 ± 6,11	48,61 ± 4,48	46,97 ± 6,18	46,13 ± 4,39
CD8+ (%)	20,74 ± 3,48	20,85 ± 3,73	16,85 ± 1,52	15,94 ± 1,39	17,62 ± 4,28	17,61 ± 3,62
CD45+ (%)	28,16 ± 6,64	18,72 ± 5,18 ^a	20,68 ± 5,93	28,76 ± 2,98	25,73 ± 2,88 ^b	26,29 ± 4,09

Os valores representam média ± desvio padrão dos animais. 1- Animais apenas manipulados. ^ap<0,05 em relação ao grupo controle agudo; ^bp<0,05 em relação ao grupo veículo agudo.

Figura 19 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 1 mg/kg sobre a fenotipagem de linfócitos do sangue periférico. Os animais controle foram apenas manipulados. Os dados representam os valores de médias ± desvio padrão dos animais. ^ap<0,05 em relação ao grupo controle agudo; ^bp<0,05 em relação ao grupo veículo agudo

6.5 – Experimento 5: Avaliação dos efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 1 mg/kg sobre os níveis séricos de corticosterona.

Foram utilizados 48 animais divididos ao acaso em 6 grupos: controle agudo (n=8), controle prolongado (n=8), veículo agudo (n=8), veículo prolongado (n=8), diazepam agudo (n=8) e diazepam prolongado (n=8). Neste experimento, os animais do grupo diazepam receberam o diazepam, por via i.p., na dose de 1 mg/kg, já os animais do grupo controle foram apenas manipulados. Os grupos experimentais foram descritos no item 4.4.

Uma hora após a única ou a última administração das soluções ou da última manipulação avaliou-se os níveis séricos de corticosterona dos animais conforme método descrito no item 4.9.

A **tabela 10** mostra os resultados referentes aos níveis séricos de corticosterona após tratamento agudo e prolongado com diazepam na dose de 1 mg/kg. Verifica-se de sua análise que o diazepam, nesta dose, não foi capaz de alterar o parâmetro analisado ($p>0,05$).

Tabela 10 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 1mg/kg sobre os níveis séricos de corticosterona

Parâmetro	Agudo			Prolongado		
	Controle ¹	Veículo	Diazepam	Controle ¹	Veículo	Diazepam
Corticosterona sérica (ng/mL)	152,67 ± 41,82	152,52 ± 93,69	151,25 ± 80,92	132,40 ± 71,49	117,58 ± 51,08	108,04 ± 79,99

Os valores representam média ± desvio padrão dos animais. 1- Animais apenas manipulados.

6.6 – Experimento 6: Avaliação dos efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre o hemograma, contagem de reticulócitos, peso relativo do baço, do fígado e das adrenais, celularidade do baço e células da medula óssea.

Foram utilizados 48 animais divididos ao acaso em 6 grupos: controle agudo (n=8), controle prolongado (n=8), veículo agudo (n=8), veículo prolongado (n=8), diazepam agudo (n=8) e diazepam prolongado (n=8). Neste experimento, os animais do grupo diazepam receberam o diazepam, por via i.p., na dose de 10 mg/kg, já os animais do grupo controle foram apenas manipulados. Os grupos experimentais foram descritos no item 4.4.

Uma hora após a única ou a última administração das soluções ou da última manipulação avaliou-se o hemograma, a contagem de reticulócitos, o peso relativo do baço, do fígado e das adrenais, bem como a celularidade do baço e da medula óssea dos animais conforme método descrito nos itens 4.5, 4.6, 4.7 e 4.8.

A **tabela 11** mostra os resultados referentes ao hemograma e a contagem de reticulócitos após o tratamento agudo e prolongado com diazepam na dose de 10 mg/kg. Observou-se um aumento nos valores da contagem de reticulócitos nos animais do grupo diazepam prolongado em relação aos dos grupos diazepam agudo, controle e veículo prolongado ($F(5,40)=14,335$; $p<0,001$). Já no que diz respeito aos demais parâmetros, não se observaram alterações significantes após o tratamento com o diazepam ($p>0,05$). A **figura 20** ilustra esses resultados.

Tabela 11 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 10mg/kg sobre o hemograma e a contagem de reticulócitos

Eritrograma	Agudo			Prolongado		
	Controle ¹	Veículo	Diazepam	Controle ¹	Veículo	Diazepam
Hemoglobina (g/dL)	13,84 ± 0,46	13,86 ± 0,60	14,26 ± 0,92	14,06 ± 0,90	14,71 ± 0,68	13,94 ± 1,08
Hematócrito (%)	40,11 ± 1,32	40,51 ± 2,29	42,34 ± 2,92	41,38 ± 2,33	40,62 ± 1,30	38,71 ± 3,35
Hemácias (cél/s × 10 ⁶ / mm ³)	7,23 ± 0,57	7,12 ± 0,50	7,62 ± 0,65	7,66 ± 0,29	7,90 ± 0,60	7,44 ± 0,78
Leucócitos (cél/s × 10 ³ / mm ³)	6,59 ± 1,20	6,44 ± 0,74	5,62 ± 1,31	6,94 ± 1,40	7,56 ± 1,98	5,85 ± 0,54
Reticulócitos	5,45 ± 0,72	6,07 ± 1,57	6,33 ± 1,10	6,15 ± 0,81	6,34 ± 1,23	10,40 ± 1,91 ^{ab}

Os valores representam média ± desvio padrão. 1-Animais apenas manipulados.^a $p<0,001$ em relação ao grupo diazepam agudo; ^b $p<0,001$ em relação aos grupos controle e veículo prolongado.

Figura 20 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre o hemograma e a contagem de reticulócitos. Os animais do grupo controle foram apenas manipulados. Os dados representam os valores de médias $\pm$ desvio padrão dos animais. ^a p<0,001 em relação ao grupo diazepam agudo; ^b p<0,001 em relação aos grupos controle e veículo prolongado

A **tabela 12** mostra os resultados referentes ao diferencial das células sanguíneas após o tratamento agudo e prolongado com diazepam na dose de 10 mg/kg. Observou-se um aumento das células segmentadas nos animais do grupo diazepam prolongado em relação aos animais dos grupos diazepam agudo ($F(5,40)=8,333$; $p<0,01$), controle prolongado ($F(5,40)=8,333$; $p<0,001$) e veículo prolongado ($F(5,40)=8,333$; $p<0,05$). A **figura 21** ilustra esses resultados.

Tabela 12 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 10 mg/kg sobre o diferencial das células sanguíneas

Diferencial do Sangue	Agudo			Prolongado		
	Controle ¹	Veículo	Diazepam	Controle ¹	Veículo	Diazepam
Segmentados (mm ³)	1074,1 ± 288,8	1116 ± 338,4	1492,6 ± 404,3	1369 ± 502,5	1669,5 ± 496,6	2635,7 ± 968,2 ^{abc}
Linfócitos (mm ³)	5438,5 ± 1052,2	4921,5 ± 1004,3	3709,4 ± 881	4874,8 ± 1823	5686,5 ± 1735,5	3566,9 ± 1622,6
Monócitos (mm ³)	15,25 ± 43,1	38,9 ± 44,8	23,3 ± 29,5	75,4 ± 75,6	62,1 ± 62,8	91,9 ± 55,7
Eosinófilos (mm ³)	52,6 ± 72,2	73,6 ± 74,3	76,6 ± 78,9	55,8 ± 59,4	138,1 ± 65,8	90,6 ± 82,8

Os valores representam média ± desvio padrão dos animais. 1- Animais apenas manipulados. ^ap<0,01 em relação ao grupo diazepam agudo; ^bp<0,05 em relação ao grupo veículo prolongado; ^cp<0,001 em relação ao grupo controle prolongado.

Figura 21 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre o diferencial das células sanguíneas. Os animais do grupo controle foram apenas manipulados. Os dados representam os valores de médias ± desvio padrão dos animais. ^ap<0,01 em relação ao grupo diazepam agudo; ^bp<0,05 em relação ao grupo veículo prolongado; ^cp<0,001 em relação ao grupo controle prolongado

A **tabela 13** mostra os resultados referentes ao peso relativo do baço, do fígado e das adrenais após tratamento agudo e prolongado com diazepam na dose de 10 mg/kg. Verificou-se um aumento do peso do baço nos animais do grupo diazepam prolongado em relação aos do grupo controle prolongado ($F(5,40)=3,424$; $p<0,05$), bem como um aumento do peso das adrenais nos animais do grupo diazepam prolongado em relação aos animais dos grupos diazepam agudo ($F(5,40)=8,311$; $p<0,001$), controle prolongado ($F(5,40)=8,311$; $p<0,01$) e veículo prolongado ($F(5,40)=8,311$; $p<0,01$). A **figura 22** ilustra esses resultados.

Tabela 13 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 10 mg/kg sobre o peso relativo do baço, do fígado e das adrenais

Peso Relativo	Agudo			Prolongado		
	Controle ¹	Veículo	Diazepam	Controle ¹	Veículo	Diazepam
Baço (g)	0,23 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,23 ± 0,05	0,26 ± 0,04	0,30 ± 0,07 ^a
Fígado (g)	4,06 ± 0,23	4,05 ± 0,26	3,84 ± 0,23	3,80 ± 0,17	3,68 ± 0,15	3,47 ± 0,19
Adrenal (g)	0,016 ± 0,002	0,018 ± 0,001	0,017 ± 0,002	0,018 ± 0,003	0,02 ± 0,003	0,02 ± 0,004 ^{bcd}

Os valores representam média ± desvio padrão dos animais. 1- Animais apenas manipulados. ^a $p<0,05$ em relação ao grupo controle prolongado; ^b $p<0,01$ em relação ao grupo controle prolongado; ^c $p<0,01$ em relação ao grupo veículo prolongado; ^d $p<0,001$ em relação ao grupo diazepam agudo.

Figura 22 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre o peso relativo do baço, do fígado e das adrenais. Os animais do grupo controle foram apenas manipulados. Os dados representam os valores de médias $\pm$ desvio padrão dos animais. ^ap<0,05 em relação ao grupo controle prolongado; ^bp<0,01 em relação ao grupo controle prolongado; ^cp<0,01 em relação ao grupo veículo prolongado; ^dp<0,001 em relação ao grupo diazepam agudo

Os dados referentes à celularidade do baço e da medula óssea são apresentados na **tabela 14**; observou-se uma diminuição da celularidade do baço nos animais do grupo controle prolongado em relação aos do grupo controle agudo ($F(5,41)=8,721$; $p<0,01$), assim como uma diminuição nos animais do grupo veículo prolongado em relação aos do grupo veículo agudo ($F(5,41)=8,721$; $p<0,05$) e nos animais do grupo diazepam prolongado em relação aos animais do grupo diazepam agudo ($F(5,41)=8,721$; $p<0,01$). A **figura 23** ilustra esses resultados.

Tabela 14 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 10 mg/kg sobre a celularidade do baço e da medula óssea

Celularidade	Agudo			Prolongado		
	Controle ¹	Veículo	Diazepam	Controle ¹	Veículo	Diazepam
Baço (cél/s × 10 ⁸)	4,45 ± 0,53	4,35 ± 0,94	4,30 ± 0,56	3,01 ± 0,64 ^a	3,07 ± 0,80 ^b	2,90 ± 0,71 ^c
Medula óssea (cél/s × 10 ⁷)	3,73 ± 0,50	3,56 ± 0,88	3,73 ± 0,91	4,21 ± 0,42	4,08 ± 0,33	4,40 ± 0,65

Os valores representam média ± desvio padrão dos animais. 1- Animais apenas manipulados. ^ap<0,01 em relação ao grupo controle agudo; ^bp<0,05 em relação ao grupo veículo agudo; ^cp<0,01 em relação ao grupo diazepam agudo.

Figura 23 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre a celularidade do baço e da medula óssea. Os animais do grupo controle foram apenas manipulados. Os dados representam os valores de médias ± desvio padrão dos animais. ^ap<0,01 em relação ao grupo controle agudo; ^bp<0,05 em relação ao grupo veículo agudo; ^cp<0,01 em relação ao grupo diazepam agudo

A **tabela 15** mostra os resultados referentes ao esplenograma realizado após tratamento agudo e prolongado com diazepam na dose de 10 mg/kg. Verificou-se um aumento das células segmentadas apenas nos animais do grupo diazepam agudo em relação aos do grupo veículo agudo ($F(5,40)=2,549$; $p<0,05$), assim como uma diminuição dos linfócitos nos animais do grupo controle prolongado em relação aos do grupo controle agudo ($F(5,41)=9,633$; $p<0,001$), do grupo veículo prolongado em relação aos do grupo veículo agudo ($F(5,41)=9,633$; $p<0,05$) e do grupo diazepam prolongado em relação aos do grupo diazepam agudo ($F(5,41)=9,633$; $p<0,01$). A **figura 24** ilustra esses resultados.

Tabela 15 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 10 mg/kg sobre o esplenograma dos animais

Esplenograma (cél/s x 10 ⁷ /mL)	Agudo			Prolongado		
	Controle ¹	Veículo	Diazepam	Controle ¹	Veículo	Diazepam
Blastos	0,14 ± 0,03	0,15 ± 0,07	0,14 ± 0,06	0,12 ± 0,04	0,08 ± 0,04	0,1 ± 0,05
Forma Jovem	0	0,009 ± 0,02	0	0,002 ± 0,006	0,007 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Forma Anel	0,01 ± 0,02	0,02 ± 0,02	0,006 ± 0,02	0,006 ± 0,01	0,004 ± 0,01	0,02 ± 0,02
Segmentados	0,21 ± 0,05	0,18 ± 0,07	0,34 ± 0,14 ^b	0,20 ± 0,08	0,26 ± 0,10	0,24 ± 0,10
Eosinófilos	0,03 ± 0,04	0,02 ± 0,03	0,02 ± 0,03	0,03 ± 0,03	0,04 ± 0,04	0,04 ± 0,03
Linfócitos	3,09 ± 0,44	2,92 ± 0,72	2,81 ± 0,46	1,91 ± 0,38 ^a	2,00 ± 0,56 ^b	1,78 ± 0,50 ^c
Eritroblastos Jovens	0,46 ± 0,99	0,40 ± 0,76	0,47 ± 1,01	0,30 ± 0,61	0,32 ± 0,65	0,35 ± 0,66
Eritroblastos Maduros	0,81 ± 0,14	0,85 ± 0,30	0,83 ± 0,20	0,63 ± 0,23	0,57 ± 0,27	0,58 ± 0,16
Relação G/E	0,27 ± 0,09	0,28 ± 0,12	0,38 ± 0,18	0,36 ± 0,18	0,48 ± 0,18	0,44 ± 0,12

Os valores representam média ± desvio padrão dos animais. G/E= Relação grânulo/eritróide. 1- Animais apenas manipulados.

^ap<0,001 em relação ao grupo controle agudo; ^bp<0,05 em relação ao grupo veículo agudo; ^cp<0,01 em relação ao grupo diazepam agudo

Figura 24 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre esplenograma de ratos. Os animais controle foram apenas manipulados. Os dados representam os valores de médias $\pm$ desvio padrão dos animais. ^ap<0,001 em relação ao grupo controle agudo; ^bp<0,05 em relação ao grupo veículo agudo; ^cp<0,01 em relação ao grupo diazepam agudo

A **tabela 16** mostra os resultados referentes ao mielograma dos animais após tratamento agudo e prolongado com diazepam, na dose de 10 mg/kg. Observou-se um aumento dos linfócitos nos animais do grupo controle prolongado em relação aos do grupo controle agudo ($F(5,41)=7,493$; $p<0,05$), assim como nos animais do grupo diazepam prolongado em relação aos do grupo diazepam agudo ($F(5,41)=7,493$; $p<0,001$). A **figura 25** ilustra esses resultados.

Tabela 16 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 10 mg/kg sobre o mielograma dos animais

Mielograma (cél/s x $10^7/\text{mL}$)	Agudo			Prolongado		
	Controle ¹	Veículo	Diazepam	Controle ¹	Veículo	Diazepam
Blastos	0,13 ± 0,08	0,16 ± 0,05	0,14 ± 0,06	0,19 ± 0,05	0,16 ± 0,04	0,13 ± 0,06
Forma Jovem	0,04 ± 0,04	0,02 ± 0,02	0,06 ± 0,05	0,04 ± 0,03	0,03 ± 0,03	0,05 ± 0,04
Forma Anel	0,18 ± 0,10	0,10 ± 0,06	0,16 ± 0,08	0,17 ± 0,07	0,21 ± 0,06	0,13 ± 0,11
Segmentados	1,47 ± 0,38	1,35 ± 0,55	1,48 ± 0,70	1,32 ± 0,47	1,56 ± 0,35	1,39 ± 0,39
Eosinófilos	0,21 ± 0,07	0,19 ± 0,06	0,20 ± 0,08	0,16 ± 0,10	0,16 ± 0,08	0,10 ± 0,07
Linfócitos	0,96 ± 0,29	0,98 ± 0,23	0,79 ± 0,16	1,57 ± 0,58 ^a	1,19 ± 0,34	1,75 ± 0,54 ^b
Eritroblastos Jovens	0,13 ± 0,04	0,11 ± 0,04	0,13 ± 0,08	0,13 ± 0,06	0,11 ± 0,05	0,18 ± 0,04
Eritroblastos Maduros	0,58 ± 0,18	0,61 ± 0,17	0,67 ± 0,11	0,62 ± 0,22	0,60 ± 0,12	0,66 ± 0,23
Relação G/E	2,80 ± 0,89	2,37 ± 0,78	2,41 ± 0,76	2,43 ± 0,92	2,87 ± 0,97	2,06 ± 0,73

Os valores representam média ± desvio padrão dos animais. G/E= Relação grânulo/eritróide. 1- Animais apenas manipulados. ^a $p<0,05$ em relação ao grupo controle agudo; ^b $p<0,001$ em relação ao grupo diazepam agudo.

Figura 25 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre mielograma de ratos. Os animais controles foram apenas manipulados. Os dados representam os valores de médias $\pm$ desvio padrão dos animais. ^ap<0,05 em relação ao grupo controle agudo; ^bp<0,001 em relação ao grupo diazepam agudo

6.7 – Experimento 7: Avaliação dos efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre a viabilidade de linfócitos do sangue periférico .

Foram utilizados 48 animais divididos ao acaso em 6 grupos iguais: controle agudo, controle prolongado, veículo agudo, veículo prolongado, diazepam (10mg/kg) agudo e diazepam (10mg/kg) prolongado. Neste experimento, os animais do grupo diazepam receberam por via i.p. a administração de diazepam na dose de 10 mg/kg. Os animais dos grupos veículo receberam 1ml/kg do veículo do diazepam de forma aguda (veículo agudo) ou prolongada (veículo prolongado), os dos grupos controle foram apenas manipulados por uma ou por 21 vezes.

Uma hora após a única ou a última administração das soluções avaliou-se a viabilidade de linfócitos do sangue periférico conforme método descrito no item 4.10.1.

A **tabela 17** mostra os resultados referentes à viabilidade de linfócitos a porcentagem de células provenientes de animais tratados aguda e prolongadamente com o diazepam, na dose de 10mg/kg, após a incubação com os diferentes fluorocromos. Verificou-se, um aumento das células necróticas nos animais dos grupos controle prolongado em relação aos animais do grupo controle agudo ($F(5,42)=15,886$; $p<0,05$), nos animais do grupo veículo prolongado em relação aos animais do grupo veículo agudo ($F(5,42)=15,886$; $p<0,001$), bem como um aumento dessas células nos animais do grupo diazepam prolongado em relação ao grupo diazepam agudo ($F(5,42)=15,886$; $p<0,001$). Observamos, também, uma diminuição das células apoptóticas nos animais dos grupos diazepam agudo em relação aos animais do grupo veículo agudo ($F(5,42)=27,933$; $p<0,05$), nos animais do grupo veículo prolongado em relação aos animais do grupo veículo agudo ($F(5,42)=27,933$; $p<0,001$), e nos animais do grupo diazepam prolongado em relação aos animais dos grupos diazepam agudo, controle prolongado e veículo prolongado ($F(5,42)=27,933$; $p<0,001$). A **figura 26** ilustra esses resultados.

Com relação às células em apoptose tardia/necrose, observamos nesta mesma figura um aumento dessas células nos animais do grupo controle prolongado em relação ao grupo controle agudo ($F(5,41)=13,263$; $p<0,001$) e nos animais do grupo veículo prolongado em relação ao grupo veículo agudo ($F(5,41)=13,263$; $p<0,001$), assim como uma diminuição destas células nos animais do grupo diazepam prolongado em relação aos animais dos grupos controle e veículo prolongado ($F(5,41)=13,263$; $p<0,05$).

E por fim, verificou-se um aumento das células viáveis nos animais do grupo diazepam prolongado em relação aos animais do grupo diazepam agudo ($F(5,41)=13,263$; $p<0,05$) e em relação aos animais dos grupos controle e veículo prolongado ($F(5,41)=13,263$; $p<0,001$).

Tabela 17 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 10mg/kg sobre a viabilidade de linfócitos periféricos

Apoptose	Agudo			Prolongado		
	Controle ¹	Veículo	Diazepam	Controle ¹	Veículo	Diazepam
Necrose	3,05 ± 2,55	1,71 ± 0,31	2,23 ± 0,41	5,02 ± 0,97 ^c	5,61 ± 1,48 ^a	5,94 ± 1,34 ^b
Apoptose	36,75 ± 7,29	40,55 ± 3,71	28,94 ± 5,54 ^h	25,47 ± 8,50	23,06 ± 4,34 ^a	4,84 ± 3,82 ^{bde}
Apoptose tardia/Necrose	0,58 ± 0,63 ^d	0,35 ± 0,13	0,26 ± 0,13	4,13 ± 2,15	4,31 ± 2,65 ^a	1,88 ± 0,68 ^{fg}
Células Viáveis	56,71 ± 4,22	56,48 ± 2,63	67,13 ± 4,19	58,29 ± 8,39	58,79 ± 14,66	80,86 ± 7,17 ^{dej}

Os valores representam média ± desvio padrão dos animais. 1- Animais apenas manipulados. ^a $p<0,001$ em relação ao grupo veículo agudo; ^b $p<0,001$ em relação ao grupo diazepam agudo; ^c $p<0,05$ em relação ao grupo controle agudo; ^d $p<0,001$ em relação ao grupo controle prolongado; ^e $p<0,001$ em relação ao grupo veículo prolongado; ^f $p<0,05$ em relação ao grupo controle prolongado; ^g $p<0,05$ em relação ao grupo veículo prolongado; ^h $p<0,05$ em relação ao grupo veículo prolongado; ⁱ $p<0,001$ em relação ao grupo controle agudo; ^j $p<0,05$ em relação ao grupo veículo agudo; ^k $p<0,01$ em relação ao grupo diazepam agudo.

Figura 26 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre a viabilidade de linfócitos do sangue periférico. Os animais controle foram apenas manipulados. Os dados representam os valores de médias $\pm$ desvio padrão dos animais. ^ap<0,001 em relação ao grupo veículo agudo; ^bp<0,001 em relação ao grupo diazepam agudo; ^cp<0,05 em relação ao grupo controle agudo; ^dp<0,001 em relação ao grupo controle prolongado; ^ep<0,001 em relação ao grupo veículo prolongado; ^fp<0,001 em relação ao grupo controle agudo; ^gp<0,001 em relação ao grupo controle prolongado; ^hp<0,05 em relação ao grupo veículo agudo; ⁱp<0,001 em relação ao grupo diazepam agudo; ^jp<0,05 em relação ao grupo controle prolongado; ^kp<0,001 em relação ao grupo veículo prolongado.

6.8 – Experimento 8: Avaliação dos efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre a proliferação de esplenócitos .

Foram utilizados 48 animais divididos ao acaso em 6 grupos iguais: controle agudo, controle prolongado, veículo agudo, veículo prolongado, diazepam (10mg/kg) agudo e diazepam (10mg/kg) prolongado. O tratamento dos animais foi semelhante ao descrito no item 6.5.

Uma hora após a única ou a última administração das soluções avaliou-se a proliferação de esplenócitos conforme método descrito no item 4.10.2.

Quando avaliamos a porcentagem de proliferação dos esplenócitos sem estimulação ou quando estimulados com um mitógeno, seja ele LPS, PHA ou ConA, observamos que o diazepam, administrado aguda e prolongadamente, na dose de 10mg/kg, não foi capaz de produzir qualquer tipo de alteração ($p>0,05$), sendo estes dados apresentados na **tabela 18**.

Tabela 18 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 10mg/kg sobre a proliferação de esplenócitos

Proliferação	Agudo			Prolongado		
	Controle ¹	Veículo	Diazepam	Controle ¹	Veículo	Diazepam
Basal (%)	73,62 ± 2,80	71,89 ± 2,14	71,04 ± 2,88	75,19 ± 3,00	74,18 ± 5,17	74,38 ± 5,35
PHA (%)	48,30 ± 2,75	44,50 ± 3,64	44,39 ± 4,00	45,58 ± 2,43	43,37 ± 2,43	41,42 ± 5,80
LPS (%)	69,13 ± 2,18	66,86 ± 3,25	65,10 ± 4,12	71,29 ± 2,43	68,63 ± 3,72	68,97 ± 4,28
ConA (%)	62,09 ± 1,16	60,70 ± 2,74	58,34 ± 2,78	59,58 ± 2,37	61,04 ± 2,05	60,06 ± 6,02

Os valores representam média ± desvio padrão dos animais. 1- Animais apenas manipulados.

6.9 – Experimento 9: Avaliação dos efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre a fenotipagem de linfócitos do sangue periférico.

Foram utilizados 40 animais divididos ao acaso em 6 grupos: controle agudo, controle prolongado, veículo agudo, veículo prolongado, diazepam (10mg/kg) agudo e diazepam (10mg/kg) prolongado. O tratamento dos animais foi semelhante ao descrito no item 6.5.

Uma hora após a única ou a última administração das soluções avaliou-se a fenotipagem de linfócitos do sangue periférico conforme método descrito no item 4.10.3.

A **tabela 19** mostra e a **figura 27** ilustra a porcentagem de células após a incubação com os diferentes marcadores celulares de animais tratados aguda e prolongadamente com o diazepam, na dose de 10mg/kg. Sua leitura permite verificar uma diminuição das células *Thelper* (duplamente marcadas com CD3 e CD4) nos animais do grupo diazepam prolongado em relação aos animais do grupo diazepam agudo ($F(5,40)=5,788$; $p<0,01$).

Com relação às células Tcitotóxicas (marcadas com CD8) observou-se que o diazepam, na dose de 10mg/kg, foi capaz de produzir um aumento significativo dessas células quando administrado agudamente em relação aos animais dos grupos controle e veículo agudo ($F(5,41)=5,812$; $p<0,05$) e, também, quando administrado prolongadamente em relação aos animais dos grupos controle e veículo prolongado ($F(5,41)=5,812$; $p<0,05$).

Verificou-se, também, uma diminuição das células B (marcadas com CD45) nos animais do grupo veículo agudo em relação aos animais do grupo controle agudo ($F(5,39)=20,605$; $p<0,01$), nos animais do grupo diazepam agudo em relação aos animais do grupo controle agudo ($F(5,39)=20,605$; $p<0,001$) e em relação aos animais do grupo veículo agudo ($F(5,39)=20,605$; $p<0,01$), assim como uma diminuição dessas células nos animais do grupo diazepam prolongado em relação aos animais do grupo controle prolongado ($F(5,39)=20,605$; $p<0,05$). Observou-se, também, um aumento dessas células B nos animais do grupo veículo prolongado em relação aos animais do grupo veículo agudo ($F(5,39)=20,605$; $p<0,01$) e nos animais do grupo diazepam prolongado em relação aos animais do grupo diazepam agudo ($F(5,39)=20,605$; $p<0,001$).

Tabela 19 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 10mg/kg sobre a fenotipagem de linfócitos do sangue periférico

Fenotipagem	Agudo			Prolongado		
	Controle ¹	Veículo	Diazepam	Controle ¹	Veículo	Diazepam
CD3+CD4+ (%)	47,94 ± 3,89	54,28 ± 5,64	54,17 ± 5,11	48,86 ± 4,86	48,36 ± 2,52	45,50 ± 4,26 ^a
CD8+ (%)	17,30 ± 3,41	16,91 ± 1,54	21,61 ± 2,79 ^{bc}	16,79 ± 1,31	16,94 ± 1,48	21,83 ± 4,90 ^{de}
CD45+ (%)	30,54 ± 3,75	20,44 ± 4,20 ^g	11,94 ± 3,26 ^{ci}	31,25 ± 6,15	28,95 ± 2,60 ^c	24,28 ± 5,96 ^{fh}

Os valores representam média ± desvio padrão dos animais. 1- Animais apenas manipulados. ^a $p<0,01$ em relação ao grupo controle agudo; ^b $p<0,05$ em relação ao grupo controle agudo; ^c $p<0,05$ em relação ao grupo veículo agudo; ^d $p<0,05$ em relação ao grupo controle prolongado; ^e $p<0,05$ em relação ao grupo veículo prolongado; ^f $p<0,05$ em relação ao grupo controle prolongado; ^g $p<0,01$ em relação ao grupo controle agudo; ^h $p<0,001$ em relação ao grupo diazepam agudo; ⁱ $p<0,001$ em relação ao grupo controle agudo

Figura 27 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre a fenotipagem de linfócitos do sangue periférico. Os animais controle foram apenas manipulados. Os dados representam os valores de médias $\pm$ desvio padrão dos animais. ^ap<0,01 em relação ao grupo controle agudo; ^bp<0,05 em relação ao grupo controle agudo; ^cp<0,05 em relação ao grupo veículo agudo; ^dp<0,05 em relação ao grupo controle prolongado; ^ep<0,05 em relação ao grupo veículo prolongado; ^fp<0,05 em relação ao grupo controle prolongado; ^gp<0,01 em relação ao grupo controle agudo; ^hp<0,001 em relação ao grupo diazepam agudo; ⁱp<0,001 em relação ao grupo controle agudo

6.10 – Experimento 10: Avaliação dos efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre os níveis séricos de corticosterona.

Foram utilizados 48 animais divididos ao acaso em 6 grupos: controle agudo (n=8), controle prolongado (n=8), veículo agudo (n=8), veículo prolongado (n=8), diazepam agudo (n=8) e diazepam prolongado (n=8). Neste experimento, os animais do grupo diazepam receberam o diazepam, por via i.p., na dose de 10 mg/kg, já os animais do grupo controle foram apenas manipulados. Os grupos experimentais foram descritos no item 4.4.

Uma hora após a única ou a última administração das soluções ou da última manipulação avaliou-se os níveis séricos de corticosterona dos animais conforme método descrito no item 4.9.

A **tabela 20** mostra os resultados referentes aos níveis séricos de corticosterona após tratamento agudo e prolongado com diazepam na dose de 10 mg/kg. Verificou-se um aumento da corticosterona sérica nos animais do grupo diazepam agudo em relação aos do grupo controle agudo ($F(5,40)=63,391$; $p<0,001$) e aos do grupo veículo agudo ($F(5,40)=63,391$; $p<0,001$), assim como um aumento desta nos animais do grupo diazepam prolongado em relação aos do grupo controle prolongado ($F(5,40)=63,391$; $p<0,001$) e aos do grupo veículo prolongado ($F(5,40)=63,391$; $p<0,001$). Observou-se, também, uma diminuição da corticosterona sérica nos animais do grupo diazepam prolongado em relação aos animais do grupo diazepam agudo ($F(5,40)=63,391$; $p<0,01$). A **figura 28** ilustra esses resultados.

Tabela 20 – Efeitos da administração aguda e prolongada (21 dias) de diazepam 1mg/kg sobre os níveis séricos de corticosterona

Parâmetro	Agudo			Prolongado		
	Controle ¹	Veículo	Diazepam	Controle ¹	Veículo	Diazepam
Corticosterona sérica (ng/mL)	166,79 ± 60,71	205,84 ± 107,04	811,21 ± 127,4 ^{ab}	107,67 ± 63,05	73,71 ± 32,67	584,00 ± 161,19 ^{cde}

Os valores representam média ± desvio padrão dos animais. 1- Animais apenas manipulados. ^a $p<0,001$ em relação ao grupo controle agudo; ^b $p<0,001$ em relação ao grupo veículo agudo; ^c $p<0,001$ em relação ao grupo controle prolongado; ^d $p<0,001$ em relação ao grupo veículo prolongado; ^e $p<0,01$ em relação ao grupo diazepam agudo;

Figura 28 – Efeitos da administração aguda e prolongada de diazepam 10 mg/kg sobre a corticosterona sérica. Os animais controle foram apenas manipulados. Os dados representam os valores de médias $\pm$ desvio padrão dos animais. ^ap<0,001 em relação ao grupo controle agudo; ^bp<0,001 em relação ao grupo veículo agudo; ^cp<0,001 em relação ao grupo controle prolongado; ^dp<0,001 em relação ao grupo veículo prolongado; ^ep<0,01 em relação ao grupo diazepam agudo

6.11 – Experimento 11: Avaliação da quantidade de receptores benzodiazepínicos periféricos (PBR) presentes em leucócitos de ratos do sangue periférico e do baço.

Foram utilizados 5 animais controles, ou seja, ratos que não foram manipulados e nem receberam qualquer tipo de tratamento. Avaliou-se a quantidade de receptores benzodiazepínicos periféricos (PBR) presentes em leucócitos de ratos obtidos do sangue periférico e do baço conforme método descrito no item 4.10.4.

A **tabela 21** mostra e a **figura 29** ilustra a porcentagem e a intensidade de fluorescência após a marcação das células com o anti-PBR. Verificou-se um aumento da intensidade de fluorescência dos neutrófilos ($p<0,05$) do sangue bem como dos monócitos do baço ($p<0,01$) quando comparado com a dos linfócitos. Não foram observadas diferenças entre as células analisadas no relativo a porcentagem de células positivas para PBR ($p>0,05$).

Figura 29 – Avaliação da quantidade de receptores benzodiazepínicos periféricos (PBR) presentes em leucócitos do sangue periférico e do baço de ratos. A – Porcentagem de fluorescência; B – Intensidade de fluorescência. Os dados representam os valores de médias $\pm$ desvio padrão dos animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo linfócito do sangue; ** $p < 0,01$ em relação ao grupo linfócito do baço

Tabela 21 – Avaliação da quantidade de receptores benzodiazepínicos periféricos (PBR) presentes em leucócitos do sangue periférico e baço de ratos

Parâmetro	PBR Sangue		PBR Baço	
	Linfócitos	Neutrófilos	Linfócitos	Monócitos
% de fluorescência	94,36 $\pm$ 8,51	94,18 $\pm$ 10,48	97,32 $\pm$ 1,04	95,77 $\pm$ 2,49
Intensidade de fluorescência	359,02 $\pm$ 75,75	470,87 $\pm$ 49,91*	339,57 $\pm$ 49,91	798,37 $\pm$ 243,68**

* $p < 0,05$ em relação ao grupo linfócitos do sangue; ** $p < 0,01$ em relação ao grupo linfócitos do baço.

6.12 – Experimento 12: Determinação dos níveis plasmáticos de diazepam e desmetilzidazepam, de ratos tratados experimentalmente com diazepam 10mg/kg, por meio da técnica de LPME e cromatografia gasosa acoplada ao detector nitrogênio-fósforo (GC/NPD).

Foram utilizados 48 animais divididos ao acaso em 6 grupos: controle agudo (n=8), controle prolongado (n=8), veículo agudo (n=8), veículo prolongado (n=8), diazepam agudo (n=8) e diazepam prolongado (n=8). Neste experimento, os animais do grupo diazepam receberam o diazepam, por via i.p., na dose de 10 mg/kg, já os animais do grupo controle foram apenas manipulados. Os grupos experimentais foram descritos no item 4.4.

Uma hora após a única ou a última administração das soluções ou da última manipulação coletou-se o sangue dos animais para a realização da determinação das dosagens plasmáticas de diazepam e seu maior produto de biotransformação, o desmetildiazepam, conforme método descrito no item 4.11.

O cromatograma a seguir (**Figura 30**) apresenta o perfil da análise de plasma adicionada de diazepam, desmetildiazepam e do padrão interno prazepam.

Figura 30 – Perfil cromatográfico pela análise por LPME GC/NPD de plasma adicionado de diazepam, desmetildiazepam e prazepam

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), obtidos pelo método empírico, estão descritos na **tabela 22**.

Tabela 22 – LOD (Limite de detecção) e LOQ (Limite de quantificação) para diazepam e desmetildiazepam

Analitos	LOD (ng/mL)	CV (%)	LOQ (ng/mL)	CV (%)
Diazepam	20	15,8	25	13,1
Desmetildiazepam	20	17,3	25	12,4

CV(%): coeficiente de variação.

Nas faixas de concentração estudadas – 25 a 2000ng/mL – obtiveram-se curvas lineares, com coeficiente de correlação linear calculados pela equação de regressão linear dentro dos limites estabelecidos ($R^2 > 0,9900$). Da mesma forma que, para os limites estabelecidos, têm-se coeficientes de variação dentro daqueles exigidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003).

Os gráficos apresentados a seguir (**Figuras 31 e 32**) ilustram a linearidade obtida para o diazepam e para o desmetildiazepam, respectivamente. Nestes gráficos, o eixo Y representa a área relativa calculada pela relação entre a área absoluta do pico dos analitos (respectivamente diazepam ou desmetildiazepam) e a área do pico do padrão interno. O eixo X corresponde às diferentes concentrações dos analitos.

Figura 31 – Estudo da linearidade do diazepam na faixa de concentração de 25 a 2000 ng/mL. Curva de calibração, equação da reta e coeficiente de correlação linear

Figura 32 – Estudo da linearidade do desmetildiazepam na faixa de concentração de 25 a 2000 ng/mL. Curva de calibração, equação da reta e coeficiente de correlação linear

As precisões intra e interensaios obtidas para os analitos diazepam e desmetildiazepam estão descritas na **tabela 23**, por meio do seu coeficiente de variação (CV). Observou-se que para o método desenvolvido foram obtidos valores de CV inferiores a 15%.

Tabela 23 – Precisão intra-ensaio e interensaio para o diazepam e o desmetildiazepam

Analitos	Precisão Intra-ensaio (%)			Precisão Interensaio (%)		
	75ng/mL	750ng/mL	1500ng/mL	75ng/mL	750ng/mL	1500ng/mL
Diazepam	8,4	4,4	3,9	6,4	6,3	3,6
Desmetildiazepam	6,7	6,4	5,9	9,0	7,4	7,1

A exatidão foi avaliada pela análise dos mesmos dados utilizados nos cálculos da precisão intra e interensaio e está descrita na **tabela 24**, por meio da porcentagem do erro relativo.

Tabela 24 – Exatidão intra-ensaio e interensaio para o diazepam e o desmetildiazepam

Analitos	Exatidão Intra-ensaio (%)			Exatidão Interensaio (%)		
	75ng/mL	750ng/mL	1500ng/mL	75ng/mL	750ng/mL	1500ng/mL
Diazepam	28,0	5,1	2,7	32,0	6,8	5,1
Desmetildiazepam	21,0	0,9	1,6	18,7	3,5	1,8

Para a avaliação da recuperação, fez-se a análise direta de soluções-padrão comparando-as com amostras adicionadas desses padrões. Esses resultados estão descritos na **tabela 25**.

Tabela 25 – Recuperação obtida para o diazepam e o desmetildiazepam

Analitos	Recuperação (%)		
	75ng/mL	750ng/mL	1500ng/mL
Diazepam	11,9	6,2	7,9
Desmetildiazepam	5,1	4,2	6,2

Após a validação do método, analisou-se as amostras de plasmas dos animais obtidas após a administração, aguda e prolongada, com o diazepam nas doses de 1 e 10 mg/kg. Esses resultados estão descritos na **tabela 26 e 27**.

Tabela 26 – Concentração plasmática de diazepam e desmetildiazepam após tratamento agudo e prolongado com diazepam (1 mg/kg)

Analitos	Agudo			Prolongado		
	Controle ¹	Veículo	Diazepam	Controle ¹	Veículo	Diazepam
Diazepam (ng/ml)	0	0	< LOQ	0	0	< LOQ
Desmetildiazepam (ng/ml)	0	0	< LOQ	0	0	< LOQ

Os valores representam média $\pm$ desvio padrão dos animais. 1- Animais apenas manipulados.

Tabela 27 – Concentração plasmática de diazepam e desmetildiazepam após tratamento agudo e prolongado com diazepam (10 mg/kg)

Analitos	Agudo			Prolongado		
	Controle ¹	Veículo	Diazepam	Controle ¹	Veículo	Diazepam
Diazepam (ng/ml)	0	0	88,7 $\pm$ 21,3	0	0	67,1 $\pm$ 10,3
Desmetildiazepam (ng/ml)	0	0	46,0 $\pm$ 15,3	0	0	32,9 $\pm$ 13,2

Os valores representam média $\pm$ desvio padrão dos animais. 1- Animais apenas manipulados.

Observou-se que não foi possível quantificar a concentração plasmática de diazepam após a administração com a dose de 1 mg/kg, já que os valores foram menores do que aqueles obtidos para o limite de quantificação. Já após a administração da dose de 10 mg/kg, observou-se que não houve diferença na concentração plasmática de diazepam e seu metabólito, desmetildiazepam, em ambos os tratamentos, agudo e prolongado ($p>0,05$).

7 – DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostram que o tratamento agudo ou prolongado com diazepam na dose de 1mg/kg (dose ansiolítica) não alterou alguns parâmetros relacionados à atividade de linfócitos de ratos. Mais especificamente, observou-se que o diazepam administrado nesta dose não alterou (1) a viabilidade, (2) a proliferação, (3) a porcentagem de células T e B (4) a celularidade do baço, (5) a celularidade da medula óssea e (6) os níveis séricos de corticosterona; porém, (7) diminuiu a quantidade de hemoglobina e de hemácias e (8) diminuiu o valor do hematócrito, apenas quando administrado prolongadamente.

De maneira diferente, uma dose maior (10mg/kg) do diazepam administrada de forma aguda ou prolongada alterou esses parâmetros. Observou-se, após ambos tratamentos, uma (9) diminuição dos linfócitos em apoptose, e conseqüentemente um aumento da porcentagem de linfócitos viáveis, (10) um aumento da porcentagem de células *Thelper* e Tcitotóxicas, (11) uma diminuição da porcentagem de células B e (12) um aumento dos níveis séricos de corticosterona. Além destes, observou-se, também, (13) um aumento de reticulócitos no sangue periférico, (14) um aumento das células segmentadas no sangue periférico e (15) um aumento do peso relativo da adrenal após a administração prolongada do diazepam, assim como (16) um aumento das células segmentadas encontradas no baço após administração aguda do diazepam.

Sabe-se da existência de sítios periféricos de ligação para BDZ, os chamados PBR, em vários órgãos (SAANO, 1988), em tecidos esteroidogênicos como adrenal e testículos (OKE et al., 1992; GARNIER et al., 1993; PAPADOPOULOS, 1993) e, também, em células do sistema imune como linfócitos, monócitos, macrófagos e polimorfonucleares (ZAVALA et al., 1984; FERRARESE et al., 1990; SCHLUMPF et al., 1990, 1992). Sendo assim, os dados do presente trabalho acompanham os da literatura ao relatar a habilidade que têm os BDZ de modular a distribuição de linfócitos e outros parâmetros hematológicos, pelo menos após uso de doses elevadas. Os mecanismos responsáveis por essas alterações, no entanto, não estão ainda muito bem caracterizados.

Em conjunto, nossos resultados mostram que a administração do diazepam em menor dose (1mg/kg) não foi capaz de alterar os parâmetros imunes analisados; porém, quando foi administrado em dose maior (10mg/kg) modificou alguns desses parâmetros. Nesse sentido, é

sabido que a administração de qualquer fármaco em doses elevadas acarreta uma maior concentração plasmática do mesmo, quando comparada com aquela decorrente da administração de uma menor dose. Sendo assim, não é difícil supor que a concentração plasmática do diazepam após a administração da dose de 1mg/kg tivesse sido menor do que aquela obtida após a dose de 10mg/kg, dificultando-se, então, a completa ativação dos receptores PBR, e consequentemente, a resposta ao medicamento. Embora simplista, essa hipótese é coerente, pois é básico em farmacologia a noção de que o efeito de um fármaco é diretamente proporcional ao número de receptores por ele ativados (GOODMAN; GILMAN, 2007).

De fato, após a administração de diazepam na dose de 10 mg/kg obtivemos uma concentração plasmática média de 88,7 ng/mL e 67,1 ng/mL, para os tratamentos agudo e prolongado, respectivamente. Porém, não foi possível quantificar a concentração plasmática de diazepam após a administração deste na dose de 1 mg/kg, provavelmente em função de ter sido a concentração encontrada menor do que o limite de quantificação da metodologia analítica desenvolvida, isto é, 25 ng/mL. Esses achados confirmam, então, a hipótese acima descrita de que a administração de doses elevadas de diazepam, por produzir maior concentração plasmática, induziu alterações mais significativas na atividade dos linfócitos.

Nossos resultados mostraram que o diazepam, na dose de 1mg/kg, nada produziu com relação aos linfócitos. Diversos trabalhos da literatura têm relatado a habilidade que os ligantes de PBR têm em alterar a atividade de células ligadas à resposta imune inata, mesmo após uso de baixas concentrações. Neste sentido, Zavala e colaboradores (1987) utilizando ligantes de PBR *in vitro*, na dose de 10nM, mostraram alteração do *burst* oxidativo de macrófagos murinos. Da mesma forma, Massoco e Palermo-Neto (1999) mostraram uma diminuição da atividade de macrófagos de camundongos após a administração de diazepam na dose de 1,5mg/kg, bem como uma diminuição do *burst* oxidativo de neutrófilos e de macrófagos de eqüinos após administração de baixas doses (0,06 ou 0,1mg/kg) de midazolam (MASSOCO; PALERMO-NETO, 2003).

Nesse contexto, já foram relatadas diferenças com relação à densidade dos PBR presentes em células do sistema imune. Alguns estudos de “binding” têm mostrado que essas células não possuem quantidades iguais de receptores PBR, mostrando ainda que, as células mais providas deste tipo de receptor são os monócitos e os polimorfonucleares, que apresentam uma densidade semelhante entre si, seguidos pelas células B e células NK e, apresentando menor densidade, as

células T (CD4+ e CD8+) (ROCCA et. al., 1993; CANAT et. al., 1992; ZAVALA et. al., 1990; 1997). Neste sentido, nossos achados de detecção de PBR por citometria de fluxo concordam com dados previamente descritos, já que também observamos uma diferença na quantidade de receptores PBR quando comparamos a diferentes células imunes. Mais especificamente, os monócitos e polimorfonucleares apresentaram um maior número desses receptores quando comparados com os linfócitos avaliados no sangue periférico e no baço.

Desta forma, a hipótese que nos parece mais provável para explicar essas divergências estaria, mais uma vez, ligada a diferenças existentes na ativação dos receptores PBR presentes nas células do sistema imune. Nesse caso, o menor número de receptores presentes nos linfócitos teria dificultado a ação e, conseqüentemente, os efeitos do diazepam. Seguindo essa linha de raciocínio, as células que apresentam maior densidade de receptores (neutrófilos e macrófagos), exatamente por apresentarem maior densidade de PBR seriam mais prontamente alteradas após o uso de baixas doses de diazepam, enquanto que as células que apresentam menor densidade desses receptores (como os linfócitos), necessitariam de doses maiores desse benzodiazepínico.

Sendo assim, é possível também sugerir que não tenhamos observado alterações após a administração do diazepam em dose menor (1mg/kg) não somente devido à baixa concentração plasmática do diazepam, mas também ao baixo número de receptores PBR encontrados nessas células. À luz dessas hipóteses, quer nos parecer sejam necessárias altas concentrações do mesmo para que sejam produzidas alterações em linfócitos.

De fato, quando administramos alta dose de diazepam (10mg/kg) observamos efeitos sobre os linfócitos, o que confirmaria nossa hipótese. Além disso, também observamos que as alterações induzidas pela dose de 10mg/kg se fizeram com maior intensidade sobre as células B, o que vai ao encontro de nossa hipótese, visto que vários trabalhos relatam terem as células B maior número de receptores PBR (100.000 – 350.000) que as células T (100.000 – 220.000) (ROCCA et. al., 1993; CANAT et. al., 1992; ZAVALA et. al., 1990; 1997).

Com relação à proliferação de esplenócitos, observamos que a administração aguda e prolongada de diazepam nas doses de 1mg/kg ou 10mg/kg não foi capaz de alterá-la após a estimulação *in vitro* com mitógenos (LPS, PHA e ConA). Nesse sentido, os trabalhos que relacionam o uso de BDZ com a proliferação de linfócitos são controversos quanto a essas

análises. Bessler e colaboradores (1992) mostraram que, após exposições *in vitro* ao Ro5-4864, PK 11195 e ao diazepam houve uma redução da proliferação de células T, sendo estes efeitos observados apenas após uso de altas concentrações (10 μ M) desses fármacos. Outros trabalhos semelhantes realizados *in vivo* têm indicado uma diminuição da proliferação de linfócitos T e B provenientes de camundongos e de ratos, após a administração da dose de 2,5 mg/kg (BALLANTYNE; HALPER, 1975) ou de 4 e 8mg/kg (DESCOTES et al., 1982; LASCHI et al., 1983) e, também, *in vitro*, após adição de diazepam, Ro 5-4864 e PK 11195 (RAMSEIER et al., 1993). Outro trabalho mostrou que baixas doses de alprazolam (0.02-1.0 mg/kg) aumentaram a proliferação de linfócitos induzida por mitógenos. No entanto, quando foram administradas altas doses do mesmo fármaco (5-10 mg/kg) não se observaram alterações nessa mesma variável (FRIDE et. al., 1990). Neste mesmo sentido, Kalashnikov e colaboradores (2002) relataram uma inibição da proliferação de esplenócitos após uso *in vitro* de altas concentrações de diazepam (1-5 μ g/ml), sendo que a utilização de baixas concentrações (< 1 μ g/ml) não alterou esse parâmetro.

É possível que diferenças quanto à espécie animal analisada, intervalos de tempo entre as doses e a observação dos efeitos assim como a forma de tratamento empregada, entre outros, respondam por essas divergências.

Outros trabalhos relataram alterações da proliferação de linfócitos relacionando-a à administração de diazepam durante o período pré ou pós-natal. Neste sentido, Schlumpf e colaboradores (1989a; 1989b; 1990; 1992; 1993; 1994) mostraram uma diminuição da proliferação de esplenócitos de uma prole de ratas tratadas com a dose de 1,25 mg/kg de diazepam durante a 2ª semana de gestação. Porém, essas alterações foram revertidas durante o crescimento dos animais, nada se observando na fase adulta. Nesse sentido e segundo Dostal e colaboradores (1995) há necessidade do uso de doses elevadas de diazepam (10mg/kg), durante o período pós-natal, para que se produzam alterações da resposta imune; esses autores mostraram, ainda, que os animais mais novos eram mais susceptíveis às alterações induzidas pelo diazepam que os animais mais velhos. De alguma forma, essa assertiva concorda com a hipótese que formulamos acima.

Sabe-se que o desenvolvimento e a maturação das células T começam no início da gestação; porém, somente no último período é que essas células estão aptas para responder a um antígeno. Sendo assim, é possível sugerir seja a fase fetal crítica para a instalação dos efeitos do diazepam, isto é o período que coincide com o desenvolvimento do sistema imune (LUEBKE et.

al., 2006). Sabe-se também, que os neonatos possuem uma alta porcentagem de linfócitos circulantes comparados com os adultos (CICCIMARRA, 1994); este fato poderia fazer destas células um alvo mais fácil para os efeitos de fármacos como, por exemplo, para os ligantes de PBR. Nesse contexto, é relevante lembrar que a densidade de receptores PBR aumenta rapidamente após o nascimento, alcançando níveis adultos entre a 2ª e a 4ª semana pós-natal (BRAESTRUP; NIELSEN, 1978; CANDY; MARTIN, 1979).

Sendo assim, é possível sugerir que a administração de diazepam nas doses de 1mg/kg ou 10mg/kg tenha sido inefetiva sobre a proliferação dos esplenócitos dos animais no presente trabalho por se tratarem de animais já adultos, isto é, com um sistema imune já desenvolvido e menos susceptível aos efeitos do diazepam. Além disso, também pelo fato de essas células possuírem, como já apontado, menor número de receptores PBR que neutrófilos e macrófagos; esse fato dificultaria a ligação do diazepam aos mesmos, minimizando, então, os efeitos desse medicamento sobre essas células. Mais uma vez, então, estaríamos vinculando os efeitos do diazepam com o número de PBR por ele ativados.

Nossos resultados referentes à viabilidade dos linfócitos circulantes de ratos nada mostraram após a administração de diazepam na dose de 1mg/kg; esses dados corroboram com a hipótese de ser essa dose muito baixa para alterar qualquer dos parâmetros imunes ligados aos linfócitos e agora analisados. Porém, observamos uma diminuição do número de linfócitos em apoptose após o tratamento agudo e prolongado com diazepam na dose de 10mg/kg e, conseqüentemente, um aumento das células viáveis.

Os PBR têm sido amplamente descritos e relacionados com mecanismos de apoptose celular (JORDÀ et. al., 2005; MAASER et. al., 2005; VEENMAN et. al., 2007; VLODAVSKY; SOUSTIEL, 2007); por isso, uma possível participação direta dos PBR presentes nos linfócitos parece-nos a hipótese mais provável para esclarecer os resultados relativos à apoptose agora encontrados após a administração da maior dose (10mg/kg) de diazepam.

Sabe-se que a morte celular programada é o principal mecanismo para a regulação do número de células, funcionando, também, como um mecanismo de defesa por remover células potencialmente perigosas e não desejadas. Alguns dos sinais de apoptose incluem diminuição celular, condensação de cromatina, clivagem do DNA, perda do potencial de membrana

mitocondrial, externalização de fosfatidilserina e fragmentação celular. Além disso, diversas mudanças na função e biogênese mitocondrial foram associadas à ocorrência de apoptose (CLARKE, 1990; SCHWARTZ et. al., 1993).

Sabe-se, ainda, que os PBR estão associados, nas mitocôndrias, com um canal anion voltagem-dependente (VDAC) ligado ao translocador do nucleotídeo adenina (ANT), sendo estes integrantes do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (*mitochondrial permeability transition pore* – MPTP). Este poro é um complexo multiprotéico formado na região de contato entre as membranas internas e externas das mitocôndrias, uma área importante para a coordenação metabólica entre o citosol, o espaço intermembrana e a matriz (McENERY et. al., 1992; HALESTRAP, 1999). O MPTP tem sido apontado como desempenhando importante papel em eventos como morte celular, em várias células.

Em algumas circunstâncias, a abertura desse poro altera o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), aumentando a permeabilidade da membrana e permitindo a passagem de fatores pró-apoptóticos como o citocromo *c* para dentro do citosol, levando a uma ativação de caspases o que culmina em morte celular por apoptose (VAN LOO et. al., 2002; ZAMZAMI et. al., 2001; MARTINOU et. al., 2001). Um sinal fundamental para a abertura deste poro é a alta concentração de cálcio; porém, os ligantes de PBR podem ativá-lo sem a adição de cálcio (CASSELAS et. al., 2002). Neste sentido, Marino e colaboradores já relataram alterações do influxo de cálcio mediado pelos PBR após a administração de diazepam. Alguns trabalhos chegaram a sugerir que os PBR estariam relacionados à regulação da permeabilidade iônica das membranas, fato que ocorreria durante o metabolismo da mitocôndria e de outras organelas (CASELLAS et. al., 2002).

Apesar de todas essas evidências, o papel dos ligantes de PBR na morte celular continua pouco conhecido. Bono e colaboradores (1999) mostraram que a administração *in vitro* de Ro5-4864 (agonista de PBR) protegeu as células da apoptose induzida por TNF- α , enquanto que o PK11195 (antagonista de PBR) aumentou o efeito pró-apoptótico deste mesmo TNF- α , sendo que a administração de clonazepam (agonista de CBR) não foi capaz de alterar a indução de apoptose, mostrando ser este efeito dependente de PBR. Porém, existem estudos mostrando que a administração de Ro5-4864 (DECAUDIN et. al., 2002) e de diazepam (TANIMOTO et. al., 1999) resultou em um aumento de apoptose celular, sendo o fato atribuído a uma redução do $\Delta\psi_m$

(TANIMOTO et. al., 1999). Neste sentido, nossos resultados concordam com aqueles apresentados por Bono e colaboradores (1999), já que observamos uma diminuição do número de células apoptóticas após a administração de 10 mg/kg de diazepam.

Sendo assim, é possível sugerir estejam esses resultados, muito provavelmente, ligados a uma ação direta do diazepam sobre os PBR presentes nas mitocôndrias dos linfócitos, protegendo-os, então, da apoptose. De qualquer forma, mostramos, mais uma vez, a relevância da dose de diazepam para a alteração desse parâmetro.

Como já amplamente discutido também não observamos efeitos do diazepam sobre a porcentagem de células T e células B após a administração de diazepam na dose de 1 mg/kg; esses dados, suportam mais uma vez, a hipótese de ser essa dose muito baixa para alterar quaisquer dos parâmetros imunes ligados aos linfócitos e aqui analisados. Esta hipótese ganha sentido se observamos que obteve-se um aumento da porcentagem das células T e uma diminuição da porcentagem das células B após o uso da dose de 10mg/kg, verificando-se a ocorrência de uma maior alteração nas células B quando comparadas às células T. Esses achados sugerem um envolvimento direto e/ou indireto dos PBR na modulação da proporcionalidade dessas células T e B.

Uma hipótese explicativa que inicialmente surge para esse achado experimental seria uma ação direta do diazepam nas adrenais via PBR, isto é, por meio do estímulo da liberação de glicocorticóides que, conseqüentemente, modulariam a resposta imune. Uma alta concentração destes receptores já foi descrita em tecidos esteroideogênicos, entre eles, a adrenal e sabe-se, que a estimulação destes receptores está relacionada à produção de glicocorticóides endógenos (PAPADOPOULOS, 1993). Sabe-se, também, que a estimulação dos PBR presentes nas mitocôndrias das células da adrenal aumenta a produção de esteróides por facilitar a entrada do colesterol na mitocôndria, onde é transformado em pregnenolona que originará posteriormente os glicocorticóides (KRUEGER; PAPADOPOULOS, 1990; PAPADOPOULOS et. al., 1992, 1997).

Assim, e alternativamente, os achados agora encontrados poderiam ser decorrência de uma ação direta do diazepam via PBR ou GABA_A presentes no SNC, mais precisamente no hipotálamo, resultando o fato em modificações de atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). Neste caso, ocorreria uma liberação do fator de corticotrofina (CRF) pelo hipotálamo, e

conseqüente liberação de ACTH pela hipófise, levando a uma produção aumentada de glicocorticóides pela adrenal que modularia a resposta imune, mais especificamente, a proporcionalidade e/ou distribuição das células T e B. Neste sentido, CALOGERO et. al. (1990) mostraram, em ratos, que ligantes BZD periféricos podem estimular o eixo HHA aumentando de maneira dose dependente a secreção de ACTH e de corticosterona, sendo este efeito central e não periférico. Uma terceira hipótese por certo, sugeriria a ocorrência de ambas as ações: direta na adrenal e indireta no SNC/hipotálamo.

Os efeitos fisiopatológicos da liberação de ACTH e de glicocorticóides já foram extensivamente estudados (BESEDOVSKY et. al., 1981; BLALOCK; SMITH, 1980; BESEDOVSKY et. al., 1986; MACPHEE et. al., 1989). Sabe-se que esta ativação é entendida como um mecanismo de regulação no qual os hormônios liberados exercem um papel modulador de diversas funções orgânicas relacionadas com o controle de processos inflamatórios e/ou infecciosos, modificando a distribuição de células imunes (TROTIER et. al., 2008) e inibindo a produção de interleucina-1 (IL-1), via ação imunossupressora dos glicocorticóides. É bem conhecido o efeito inibitório dos glicocorticóides sobre a produção e liberação de citocinas (ALMAWI et. al., 1996), assim também como a capacidade destes em modular as células envolvidas com a resposta imune inflamatória, bem como com o balanço entre células Th1 e Th2 (WEBSTER et. al., 1988; BUCKINGHAM et. al., 1997; BARTOLOMUCCI, 2007).

Todas as hipóteses até agora apresentadas têm em comum o aumento da produção e/ou liberação dos glicocorticóides. Neste sentido, sabe-se que os glicocorticóides induzem uma *down-regulation* da imunidade mediada por células Th1, aumentando, aquela mediada por células Th2 e, conseqüentemente levando a uma diminuição da produção de IL-2 e IFN- γ e a um aumento da produção de IL-4, IL-10 e IL-13. Portanto, um aumento dos níveis de glicocorticóides induziria uma supressão da imunidade celular e uma estimulação da imunidade humoral (NIKOLAI, 2001; BARTOLOMUCCI, 2007). A relação da proporcionalidade Th1xTh2 com os presentes achados de aumento de células T e diminuição de células B parece-nos obscura. No entanto, estaria o aumento do número de células T e a diminuição de células B, após o uso do diazepam na dose de 10mg/kg, relacionados ao balanço Th1 x Th2? Ou esses achados estariam relacionados a uma mudança na distribuição dessas células? Embora interessante essas perguntas carecem de resposta e precisam de dados experimentais adicionais que as respondam de forma mais adequada.

Neste sentido, sabe-se que a administração prolongada de diazepam leva ao desenvolvimento de tolerância (TAUPIN, et. al., 1991; RAMSEIER et. al., 1993; ZANOTTI et. al., 1999). De fato, após a administração aguda de diazepam (10mg/kg) observou-se, neste trabalho, um aumento dos níveis séricos de corticosterona; entretanto e, no presente experimento, os níveis de corticosterona, após administração prolongada, apesar de encontrarem-se, também, aumentados, foram menores do que os valores encontrados após o tratamento agudo, fato que, também, sugere o desenvolvimento de tolerância para os efeitos do diazepam sobre os níveis desse hormônio. Nesse sentido, os níveis plasmáticos de diazepam após administração prolongada não foram diferentes estatisticamente daqueles observados após o tratamento agudo; este achado sugere que a tolerância observada aos efeitos do diazepam seja do tipo funcional e não metabólica. De fato, é sabido que os benzodiazepínicos não induzem tolerância metabólica (GOODMAN; GILMAN, 2007), ou seja, sua concentração plasmática permanece igual mesmo após tratamentos repetidos com o medicamento. Desta forma, então, a tolerância observada para os efeitos do diazepam sobre os níveis de corticosterona estaria relacionada com alterações na densidade de receptores, neste caso de PBR presentes nas adrenais, e/ou na sensibilidade destes ao diazepam

Por outro lado, presente constatação de que os níveis séricos de corticosterona estavam altos, após ambos os tratamentos, enfraquece a hipótese do envolvimento da corticosterona com os presentes achados experimentais. Uma vez que, como citado anteriormente, altos níveis de glicocorticóides induziriam um aumento da resposta Th2 e, conseqüentemente, um aumento de células B, o que não foi observado neste trabalho.

Nessa situação, uma possível participação direta dos PBR presentes nos linfócitos pareceria-nos a hipótese mais provável para esclarecer os resultados de alteração de células T e B agora encontradas. Neste sentido, é possível que o diazepam tenha atuado diretamente nos receptores presentes nos linfócitos alterando sua diferenciação e, conseqüentemente, a porcentagem dessas células no compartimento sanguíneo. De fato, há trabalhos relatando que o uso *in vitro* de ligantes de PBR produz alterações da diferenciação e maturação de células mesenquimais e do timo (LEE et. al., 2004; ROCHARD et. al., 2004),.

De qualquer forma, observamos que a alteração foi mais evidente nas células B do que nas células T; como citado anteriormente, diferenças existentes quanto à densidade de receptores PBR

nas células B e T poderiam justificar esses achados. Esta situação também carece de mais análises.

Sabe-se que os linfócitos B são os responsáveis pela resposta imune humoral por serem os produtores de anticorpos, os chamados plasmócitos; além disso, também são células apresentadoras de antígeno (BARTOLOMUCCI, 2007; WEBSTER-MARKETON; GLASER, 2008). Sendo assim, a diminuição dessas células após a administração de diazepam poderia levar a uma diminuição da resistência orgânica dos animais a enfermidades. Esta hipótese parece-nos verdadeira uma vez que, a administração de diazepam, na dose de 2 e 3 mg/kg a roedores adultos e que foram inoculados com *M.bovis*, diminuiu a defesa orgânica dos mesmos ao microorganismo produzindo um aumento de mortalidade (RIGUI et. al., 1999). Idêntico fato foi observado em prole adulta de fêmeas tratadas com 1,5 mg/kg de diazepam durante a gestação (UGAZ et. al., 1999). Da mesma forma que, a administração de diazepam, na dose de 3 mg/kg, a camundongos que foram inoculados com tumor de Ehrlich diminuiu a produção de NO e o espraçamento de macrófagos, levando a um maior crescimento tumoral e, portanto, uma diminuição da resistência dos animais ao tumor (SAKAI et. al., 2006a).

Como abordado anteriormente, sabe-se que o uso prolongado de diazepam induz tolerância e mais, sabe-se que a dose de 10mg/kg de diazepam é capaz de evidenciar esse fato em modelo experimental de inflamação por carragenina e de avaliação de *burst* oxidativo de neutrófilos sanguíneos de ratos (LAZZARINI et. al., 2003; SILVA et. al., 2003). Desta forma, utilizou-se, neste trabalho, uma dose mais baixa de diazepam, a dose de 1mg/kg, para confirmar se esta também seria capaz de induzir tolerância. Entretanto, diferente da dose maior, a dose de 1mg/kg não foi capaz de aumentar os níveis séricos de corticosterona após tratamento agudo ou crônico e não induziu tolerância.

De fato, Mikkelsen e colaboradores (2005) relataram que a administração de baixas doses de diazepam 0,025 – 0,5 mg/kg não foi capaz de alterar os níveis séricos de corticosterona e que esta alteração só foi observada após a administração de doses maiores que 2 mg/kg, o que confirmaria o nosso resultado, já que também não observamos qualquer alteração nos níveis de corticosterona após o uso de uma baixa dose de diazepam (1mg/kg).

Neste sentido, sabe-se, também, que os glicocorticóides endógenos são capazes de alterar a mobilização de neutrófilos dos seus compartimentos até a periferia, mesmo em condições não inflamatórias (FARSKY et. al., 1995). Da mesma forma, que é sabido que o diazepam administrado agudamente, mas não prolongadamente, na mesma dose utilizada neste trabalho (10 mg/kg) é capaz de diminuir o edema de pata induzido por carragenina, devido a um mecanismo que envolve o NO e os PBR presentes nas células imunes (LAZZARINI et. al., 2003; 2006). Sendo assim, é possível sugerir que o aumento celular do número/porcentagem de segmentados encontrado no baço após tratamento agudo com o diazepam na dose de 10 mg/kg seria devido ao aumento dos níveis séricos de corticosterona, e mais, que muito provavelmente essas células não teriam conseguido migrar para o compartimento sangüíneo, ficando retidas no baço. Já após o tratamento prolongado, essas células teriam sido capazes de migrar do baço para o compartimento sangüíneo, visto que observamos aumento de células segmentadas nesse compartimento. Este achado também sugere o desenvolvimento de tolerância aos efeitos do diazepam após administração prolongada. No caso, a tolerância seria do tipo funcional, visto que os níveis plasmáticos de diazepam após administração aguda e prolongada não diferiram entre si.

Curiosamente e de maneira bastante interessante, observamos neste trabalho efeitos do diazepam sobre as células vermelhas circulantes. Mais especificamente, observamos uma diminuição dos valores de hemoglobina e de hemácias, bem como uma diminuição dos valores de hematócrito, após a administração prolongada de diazepam na dose de 1mg/kg. Entretanto, após a administração prolongada de diazepam na dose de 10 mg/kg, observou-se apenas um aumento de reticulócitos.

Sabe-se que existem diversos ligantes endógenos para os PBR, como o DBI (diazepam binding inhibitor), a porfirina e a protoporfirina IX (VERMA et. al., 1987; 1988; BERKOVICH et. al., 1993). Essas porfirinas desempenham papel importante na síntese de hemoglobina, já que formam um grupo de diversos compostos como o heme e o citocromo.

A biosíntese do heme inicia-se fora da mitocôndria com a condensação de duas moléculas de ácido aminolevulínico à porfobilinogênio, seguido da condensação de quatro moléculas de porfobilinogênio à uroporfirinogênio III. Este último é descarboxilado a coproporfirinogênio III, que é translocado para dentro da mitocôndria. Os PBR estão envolvidos com o transporte do coproporfirinogênio III de fora para dentro da mitocôndria (TAKETANI et. al., 1994; 1995).

Nessa passagem, o coproporfirinogênio III é oxidado à protoporfirinogênio e, em seguida, a protoporfirina IX. Por fim, a ferroquelatase completa a síntese adicionando ferro à protoporfirina IX, formando, então, o heme (WENDLER et. al., 2003). Sendo assim, é possível que o diazepam, por ter se ligado aos PBR presentes nessas células possa ter, de algum modo, interferido com a biosíntese do heme, promovendo, então, as alterações encontradas.

No entanto, a alteração das concentrações de hemoglobina e de hemácias, bem como a alteração do valor do hematócrito, encontradas após a administração prolongada de diazepam (1mg/kg) apesar de estatisticamente significativa pode não ter significado biológico relevante, visto que os valores de reticulócitos não foram alterados.

A dose maior de diazepam (10 mg/kg) produziu um aumento de reticulócitos no sangue periférico, fato este que não foi observado após o uso da dose menor (1 mg/kg), já que nesta dose observamos apenas a diminuição dos valores de hemoglobina e de hemácias, bem como uma diminuição dos valores de hematócrito. Neste sentido, é possível sugerir que a dose de 10 mg/kg de diazepam também tenha alterado esses parâmetros hematológicos, porém, por ser uma dose maior, supõe-se que esses tenham acontecido num período anterior aos 21 dias. Desta forma, após o tratamento por 21 dias observou-se apenas o final do processo, o aumento de reticulócitos. No entanto, e como citado anteriormente, apesar de esta alteração ser estatisticamente significativa, mais uma vez, não teria um significado biológico, já que os demais parâmetros analisados estavam normais. Porém, e mais uma vez, faz-se necessário um estudo que avalie em detalhes e relacione os efeitos do diazepam com esses parâmetros hematológicos.

Em conjunto, nossos resultados mostraram que a administração de diazepam na dose de 1mg/kg não foi capaz de alterar os parâmetros imunes analisados e ligados aos linfócitos, porém, quando administrado na dose de 10mg/kg produziu algumas alterações interessantes. Importante lembrar que a dose de 1 mg/kg também não foi capaz de induzir tolerância, diferente da maior dose de diazepam (10 mg/kg), que levou ao desenvolvimento de tolerância funcional. Desta forma, por se tratar de um fármaco bastante utilizado na clínica médica para tratamento da ansiedade em dose próxima daquela utilizada em nossos experimentos (1 mg/kg) pode-se sugerir que o diazepam assim administrado seja incapaz de interferir com os linfócitos e/ou com a resposta imune adquirida, ao contrário do já relatado para a imunidade inata, em especial, para os

macrófagos e neutrófilos. Porém, seria recomendável manter um bom acompanhamento médico daqueles que fazem uso deste medicamento, especialmente, em doses elevadas.

Com relação ao desenvolvimento do método cromatográfico, muitas técnicas têm sido descritas para a determinação de diazepam em fluidos biológicos; a maioria delas faz uso da cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama e espectrometria de massa e, em muitos casos, faz-se a derivatização. Com relação aos procedimentos de extração, a extração em fase sólida e a extração líquido-líquido são as técnicas mais utilizadas (COUGH; BAKER, 1982; BLACK et. al., 1994; WANG et. al., 2006; CORDERO; PATERSON, 2007). Porém, são ainda pouco encontradas técnicas para a determinação do diazepam que envolvam microextração líquido-líquido. De fato, encontrou-se na literatura apenas um trabalho relacionado a esta técnica com subsequente detecção do diazepam em matriz biológica (UGLAND et. al., 2000). O presente trabalho procurou otimizar esse método, uma vez que a LPME (Microextração em fase líquida) apresenta uma série de vantagens.

Sabe-se ser o diazepam biotransformado no fígado, pelas enzimas do citocromo P450; assim, aproximadamente 60% de uma quantidade administrada é convertida à desmetildiazepam, sendo este o principal metabólito encontrado no plasma (JOICE et. al., 1984; KINANI et. al., 2007). Por esse motivo, o método aqui apresentado buscou, também, a detecção do desmetildiazepam.

A LPME é uma alternativa para os métodos de uso em grande escala, já que reduz bastante o consumo de solventes orgânicos. Além disso, costuma apresentar maior simplicidade e praticidade, possibilitando uma menor manipulação da amostra, o que é extremamente vantajoso em relação às outras técnicas de extração.

Além disso, a LPME é uma técnica que apresenta grande potencial para realização de uma extração prévia à injeção no CG, tanto para o diazepam quanto para o desmetildiazepam. De fato, o volume de solvente utilizado é reduzido, pode-se, com esta técnica extrair várias amostras ao mesmo tempo. Mais que isso, o sistema bifásico da LPME não requer evaporação do solvente e, tampouco, a reconstituição da amostra para injeção no CG.

Durante o desenvolvimento do presente método de extração alguns imprevistos surgiram, fazendo-se necessárias certas mudanças. Assim, no início da técnica foram utilizados os solventes

octanol:acetato de butila (1:1), que não mostraram boa eficiência na extração, assim como aconteceu com o solvente decanol. Houve, pois, necessidade de substituir estes solventes pelo nonanol que mostrou melhor resultado.

A matriz biológica utilizada neste trabalho (plasma) é muito complexa, pois apresenta muitas proteínas que acabam dificultando o processo de extração. Neste sentido, sabe-se que os analitos utilizados, diazepam e desmetildiazepam, ligam-se fortemente a essas proteínas plasmáticas (MEYLAN; HOWARD, 1995). Portanto, fez-se necessária a liberação destes analitos antes do processo de extração. Para isso, fez-se uso do metanol, um solvente que, por alterar a estrutura química das proteínas, reduz a ligação droga-proteína.

Além disso, para uma melhor homogeneização da amostra e uma melhor eficácia de extração, optou-se por substituir o agitador magnético pelo agitador horizontal. Para o método desenvolvido, fez-se o uso do detector NPD (nitrogênio-fósforo) já que este apresenta alta sensibilidade e especificidade, não sendo necessário com seu uso um extenso procedimento de *clean-up*; de fato, muitos dos componentes lipídicos presentes na matriz e que poderiam interferir com a detecção dos analitos não são detectados pelo sistema, o que o torna vantajoso em relação a outros (LAU et. al., 1979).

Com o intuito de futuramente utilizar esta mesma técnica de extração em nossos laboratórios para dosagem de diazepam em plasma humano, optou-se pela troca do padrão interno; assim, o flunitrazepam, inicialmente proposto, foi substituído pelo prazepam, que não é utilizado comercialmente. Desta forma, não há qualquer possibilidade de o uso do medicamento utilizado interferir no pico do padrão interno, pois isto levaria a uma interpretação errônea dos dados.

Após estabelecer melhores condições de extração, iniciaram-se os estudos para a validação do método. Assim, as curvas de calibração foram feitas, tanto para o diazepam quanto para o desmetildiazepam, utilizando-se de amostras de plasma negativo adicionadas de concentrações conhecidas de soluções-padrão de analitos antes do processo de extração. Observou-se uma linearidade adequada das curvas para os analitos estudados, já que foram obtidos coeficientes de regressão linear maiores que 0,99. Os resultados obtidos para a precisão intra-ensaio e interensaio também foram adequados, já que os valores de coeficiente de variação foram menores que 15%

para ambas as precisões. Para o estudo da exatidão utilizaram-se os valores obtidos para a precisão intra-ensaio e interensaio, e neste caso a ANVISA admite valores de erro menores que 15%. A média (750 ng/mL) e alta concentração (1500 ng/mL) apresentaram valores de exatidão dentro dos limites aceitáveis. Especificamente, para a primeira concentração obteve-se um erro de 5,12% e 0,9%, para o diazepam e desmetildiazepam, respectivamente; para a última obteve-se um erro de 2,7% e 1,6% para o diazepam e desmetildiazepam, respectivamente. Já quando analisou-se a baixa concentração (75 ng/mL) do analito obteve-se um valor de exatidão de 28% e 21%, para o diazepam e desmetildiazepam, respectivamente. Apesar de esses últimos valores estarem acima daqueles estabelecidos como ideal pela ANVISA, pode-se dizer que o método proposto é preciso e linear, sendo, pois, aceitável.

Os estudos de recuperação foram feitos para avaliar a quantidade de analito recuperado após o método de extração desenvolvido, comparando-se a resposta obtida pela injeção direta de soluções-padrão com as amostras de plasma adicionadas dos padrões, em diferentes concentrações. A baixa concentração (75 ng/mL) foi a que apresentou melhor valor de recuperação para os analitos avaliados, 11,9% e 5,1%, para o diazepam e desmetildiazepam, respectivamente. Porém, mesmo tendo-se encontrado baixos valores de recuperação, estes ainda estão dentro daqueles aceitos pela ANVISA, já que o método apresentou valores aceitáveis de precisão e exatidão.

Após a validação do método, foi possível determinar a concentração plasmática de diazepam e desmetildiazepam após tratamento com a dose de 10 mg/kg de diazepam. Obtivemos uma concentração plasmática média de diazepam de 88,7 ng/mL e de 67,1 ng/mL após os tratamentos agudo e prolongado, respectivamente, e uma concentração plasmática média de desmetildiazepam de 46,0 ng/mL e de 32,9 ng/mL após os tratamentos agudo e prolongado, respectivamente. Como citado anteriormente, sabe-se que os benzodiazepínicos não induzem tolerância metabólica (GOODMAN; GILMAN, 2007). Assim, nossos achados concordam com essa assertiva, já que as concentrações plasmáticas de diazepam e desmetildiazepam encontradas após tratamentos agudo e prolongado com diazepam não diferiram entre si.

Como o método desenvolvido consegue quantificar apenas concentrações de diazepam e desmetildiazepam acima de 25 ng/mL, não foi possível determinar a concentração plasmática destes após a administração do diazepam na dose de 1mg/kg, provavelmente, em função de ter

sido a concentração plasmática encontrada após esse tratamento menor do que esse limite de quantificação

Tem sido uma tendência em análises toxicológicas a miniaturização de técnicas analíticas de preparação de amostras. Neste sentido, a aplicação da LPME, conforme procedimento descrito acima, forneceu resultados satisfatórios. Foi possível obter extratos com ótimo *clean up*, uma redução no consumo de solvente, além de ter se tornado desnecessária a evaporação do solvente e a recuperação do analito, diminuindo, também a possibilidade de *carry-over*, já que não se fez a reutilização da fibra de propileno utilizada na extração. Desta forma, pode-se dizer que o método para a determinação plasmática de diazepam e desmetildiazepam, apresentado neste trabalho, mostrou ótimos resultados, estando de acordo com as normas e padrões de referências estabelecidos pela ANVISA por meio da Resolução 899/2003.

8 – CONCLUSÕES

Mostrou-se que a administração aguda e prolongada de diazepam na dose de 1 mg/kg não produziu alterações sobre a viabilidade de linfócitos, a proliferação de esplenócitos, a porcentagem de células T e B, a celularidade de baço, a celularidade de medula óssea e os níveis séricos de corticosterona.

Entretanto, a administração prolongada de diazepam na dose de 1 mg/kg:

- ✓ Diminuiu a quantidade de hemoglobina e de hemácias;
- ✓ Diminuiu o valor de hematócrito;

Observou-se que a administração aguda e prolongada de diazepam na dose de 10 mg/kg não alterou a proliferação de esplenócitos.

Porém, após ambos os tratamentos, verificou-se que a administração de diazepam na dose de 10mg/kg:

- ✓ Diminuiu o número de células apoptóticas;
- ✓ Aumentou o número de células viáveis;
- ✓ Aumentou a porcentagem de células T;
- ✓ Diminuiu a porcentagem de células B;
- ✓ Aumentou os níveis séricos de corticosterona.

Em seu conjunto, esses resultados sugerem que a administração de diazepam em baixa dose (1mg/kg) não interfere com a viabilidade de linfócitos, a proliferação de esplenócitos, a porcentagem de células T e B, a celularidade do baço, a celularidade da medula óssea e os níveis séricos de corticosterona. Entretanto, o uso de diazepam em dose mais elevada (10 mg/kg) altera tais parâmetros, além de induzir a tolerância funcional. Muito provavelmente, esses efeitos tenham a ver com o número de receptores PBR presentes nas células avaliadas e/ou com os níveis plasmáticos do diazepam após as doses administradas.

Finalmente, a técnica de LPME empregada demonstrou ter grande potencial para extração prévia à injeção no CG, tanto para o diazepam quanto para o desmetildiazepam, além de estar em acordo com as normas e padrões de referências estabelecidos na Resolução 899 da ANVISA.

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMAWI, W. Y.; BEYHUM, H. N.; RAHME, A. A.; REIDER, M. J. Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. **J of Leukocyte Biology**, v. 60, p. 563-72, 1996.
- 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.
- 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.
- ANDERSEN, S.; HALVORSEN, T. G.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis, a promising tool for the determination of chiral drugs in biological matrices. **J. Chromatogr. A.**, v. 963, p. 303-23, 2002.
- 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.**, vol. 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. 517-26, 1985
- ANHOLT, R. R. H.; PEDERSEN, P. L. DE SOUZA, E. B.; SNYDER, S. H. The peripheral-type benzodiazepine receptor-localization to the mitochondrial outer membrane. **J Biological Chem.** 261, 576-83, 1986.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VISALEGIS. Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=5745&word=>.
- ARGUELLES, A.E.; ROSNER, J. Diazepam and plasma testosterone levels. **Lancet**, v. 27, p. 607-608, 1975.
- 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. 1407-14, 1987.
- BALLANTYNE, D.L.; HALPER, D.D. Prolongation of skin allograft survival by Valium (diazepam). **Transplant Proc.**, v.7, p.581-93, 1975.
- BARTOLOMUCCI, A. Social stress, immune functions and disease in rodents. **Frontiers Neuroendocrinol.**, v. 28, p. 28-49, 2007.
- BASEHER, C.; BALASUBRAMANIAN, R.; LEE, H. K. Determination of organic micropollutants in rainwater using hollow fiber membrane/liquid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A.**, v. 1016, p. 11-20, 2003.
- 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, n. (1-2), p.181-88, 2004.
- BEHBAHANI, H.; RICKLE, A.; CONCHA, H.; ANKARCORONA, M.; WINBLAD, B. Flow Cytometry as a Method For Studying Effects of Stressors on Primary Rats Neurons. **J Neurosci Res.**, v.82(3), p.432-41, 2005.
- BERKENBOSCH, J.; VAN OERS, J.; DEL REY, A.; TILDER, F.; Besedovsky, H. Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. **Science**, v.238, p.524-26, 1987.

- BERKOVICH, A.; FERRARESE, C.; CAVALETTI, G.; ALHO, H.; MARZORATI, C.; BIANCHI, G.; GUIDOTTI, A.; COSTA, E. Topology of two DBI receptors in human lymphocytes. **Life Sci.**, v. 52(15), p. 1265-77, 1993.
- 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. 323-25, 1977.
- BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **End Rev.**, vol.17, p.64-102, 1996.
- BESEDOVSKY, H.O; DEL REY, A. SORKIN, E. Linfokine-containing supernatants from com A-stimulated cells increase corticosterone blood levels. **J. Immunol.** v.126, p. 385, 1981.
- BESSLER, H.; WEIZMAN, R.; GAVISH, M.; NOTTI, I.; DJALDETTI, M. Immunomodulatory effect of peripheral benzodiazepine receptor ligands on human mononuclear cells. **J Neuroimmunol.**, vol. 38(1-2), p.19-25, 1992.
- BISSERBE, J. C., PATEL, J., ESKAY, R. L. Evidence that peripheral-type benzodiazepine receptor ligand Ro 5-4864 inhibits beta-endorphin release from AtT-20 cells by blockade voltage-dependent calcium channels. **J. Neurochem.**, v.47, p.1419-1424., 1986.
- BLACK, D. A.; CLARK, G. D.; HAVER, V. M.; GARBIN, J. A.; SAXON, A. J. Analysis of urinary benzodiazepines using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, **J. Anal. Toxicol.** , v. 18, p. 185-88, 1994.
- BLAHOS, H. J.; WHALIN, M. E.; KRUEGER, K. E. Identification and purification of a 10-kilodalton protein associated with the mitochondrial benzodiazepine receptor. **J Biol Chem** vol.270, p.20285-91, 1995.
- BLALOCK, J. E.; SMITH, E. M. Human leukocyte interferon: structural and biological relatedness to adrenocorticotrophic hormone and endorphins. **Procc. Nat. Acad. of Sci. USA**, v. 77, p. 5972-74, 1980.
- BLALOCK, J.E. The immune system as a sensory organ. **J.Immunology.**,132, v.3, p. 1067-70, 1984.
- BONO, F.; LAMARCHE, I.; PRABONNAUD, V.; LE FUR, G.; HERBERT, J. M. Peripheral benzodiazepine receptor agonists exhibit potent antiapoptotic activities. **Biochem Biophys Res Communun.**, v.265, p.457-61, 1999.
- BORMANN, J., Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. **Trends Neurosci.** v. 11(3), p. 112-116, 1998^a.
- BRAESTRUP, C.; NIELSEN, M. Ontogenic development of benzodiazepine receptors in the brain. **Brain Res.**, v. 147, p. 170-73, 1978.
- BUCKINGHAM, J. C.; GILLIES, G. E.; COWELL, A. M., Stress, stress hormones and the immune system. John Wiley Ltd., Chichester, 1997.
- 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. 239-48, 1983.

CALOGERO, A. E.; KAMILARIS, T. C.; BERNARDINI, R.; JOHNSON, E. O.; CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. Effects of peripheral benzodiazepine receptor ligands on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in the rat. **J Pharmacol Exp Ther.**, v.253(2), p.729-37, 1990.

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, 1992.

CANDY, J. M.; MARTIN, I. L. The postnatal development of the benzodiazepine receptor in the cerebral cortex and cerebellum of the rat. **J Neurochem.**, v.32, p. 655-58, 1979.

CASELLAS, P.; GALIEGUE, S.; BASILE, A. S. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. **Neurochem. Intern.**, v. 40, p. 475-86, 2002.

CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas. Disponível em: http://www.unifesp.br/dpsicobio/cebrid/lev_domiciliar2005/index.htm.

CHANG, M. P.; CASTLE S. C.; NORMAN, D. C. Suppressive effects of alprazolam on the immune response of mice. **Int J Immunopharmacol.**, v.13(2-3), p. 259-266, 1991.

CICCIMARRA, F. Fetal and neonatal immunology. **J Perinat Med.**, v. 22 (suppl. 1), p. 84-87, 1994.

CLARKE, G. D.; RYAN, P. J. Tranquillizers can block mitogenesis in 3T3 cells and induce differentiation in Friend cells. **Nature.**, v. 287, p. 160-61, 1980.

CLARKE, P. G. H. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanism. *Anat Embryol.*, v. 181, p. 195-213, 1990.

COHEN, N.; ADER, R.; GREEN, N.; BOVBJERG, D.H. Conditioned suppression of a thymus-independent antibody response. **Psychos. medicine**, v. 41, p. 487-91, 1979.

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. 113-42, 1996.

CORDERO, R.; PATERSON, S. Simultaneous quantification of opiates, amphetamines, cocaine and metabolites and diazepam and metabolite in a single hair sample using GC-MS. *J Chromato B.*, v. 850, p. 423-31, 2007.

COUGH, T. A.; BAKER, P. B. Identification of major drugs of abuse using chromatography. *J Chromatogr Sci.*, v. 20, p. 289-329, 1982.

CURRAN, T.; MORGAN, J. I. Superinduction of c-fos by nerve growth factor in the presence of peripherally active benzodiazepines. **Science.**, v. 229, p.1265-68, 1985.

DACIE, J. V., LEWIS, S. M. Practical haematology. 8ed., Churchill Livingstone, p.57-8, 1995.

DECAUDIN, D.; CASTEDO, M.; NEMATI, F.; BEURDELEY-THOMAS, A.; DE PINIEUX, G.; CARON, A.; POULIART, P.; WIJDENES, J.; ROUILLARD, D.; KROEMER, G.; POUPON, M. F. Peripheral benzodiazepine receptor ligands reverse apoptosis resistance of cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer Research.**, v. 62, p.1388-93, 2002.

DESCOTES, J.; TEDONE, R.; EVREUX, J. Suppression of humoral and cellular immunity in normal mice by diazepam. **Immunol. Letters.**, v. 5, p. 41-3, 1982.

DINGEMANSE, J.; BREIMER, D. D. Benzodiazepine receptors. **Pharmacy Int.** v.5, p.33-36, 1984.

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.

DOSTÁL, M.; BENESOVÁ, O.; TEJKALOVÁ, H.; SOUKUPOVÁ, D. Immune response of adult rats is altered by administration of diazepam in the first postnatal week. **Reprod Toxicol.**, v. 9(2), p. 115-21, 1995.

FARSKY, S. P.; SANNOMIYA, P.; GARCIA-LEME, J. Secreted endogenous glucocorticoids regulate leukocyte-endothelial interactions in inflammation. A direct vital microscopic study. **J Leukoc Biol**, v. 57, p. 379-86.

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. 375-78, 1990.

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. 205-15, 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. 322-8, 2005.

FRIDE, E.; SKOLNICK, P.; ARORA, P. K. Immunoenhancing effects of alprazolam in mice. **Life Sci.**, v. 47, p. 2409-20, 1990.

GALIÈGUE, S.; JBILO, O.; COMBES, T.; BRIBES, E.; CARAYON, P.; LE FUR, G.; CASSELAS, P. Cloning and characterization of PRAX-1: a new protein that specifically interacts with the peripheral benzodiazepine receptor. **J Biol Chem** v.274, p.2938-52, 1999.

GARNIER, M.; BOUJRAD, N.; OKE, B. O.; BROWN, A. S.; RIOND, J.; FERRARA, P.; SHOYAB, M.; SUAREZ-QUIAN, C. A.; PAPADOPOULOS, V. Diazepam binding inhibitor is a paracrine/autocrine regulator of Leydig cell proliferation and steroidogenesis: action via the peripheral-type benzodiazepine receptor and independent mechanisms. **Endocrinology** v.132, p.444-58, 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.1589-601, 1992.

GILAR, M.; BOUVIER, E. S. P.; COMPTON, B. J. Advances in sample preparations in electromigration chromatographic and mass spectrometric separation methods. **J Chromatogr A.**, v. 909, p. 111-35, 2001.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. Bases Farmacológicas da Terapêutica. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 11 ed., 2007.

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

GWOSDOW, A. R.; O'CONNELL, N.; SPENCER, J. A.; KUMAR, M. S.; AGARWAL, R. K.; BODE, H.H.; ABOU SAMRA, A. B. Interleukin-1 induced corticosterona release occurs by an adrenergic mechanism from rat adrenal gland. **Am. J. Physiol.**, v.263, p.461-66, 1992.

HALESTRAP, A. P. The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury. **Biochem Soc Symp.**, v. 66, p. 181-203, 1999.

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. 540-54, 2005

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

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

HIRSCH, T.; DECAUDIN, D.; SUSIN, S. A.; MARCHETTI, P.; LAROCLETTE, N.; RESCHE-RIGON, M.; KROEMER, G. PK11195, a ligand of the mitochondrial benzodiazepine receptor, facilitates the induction of apoptosis and reverses Bcl-2-mediated cytoprotection. **Exp Cell Res.** v.241(2), p.426-34., 1998

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.

IKEZAKI, K.; BLACK, K. L. Stimulation of cell growth and DNA synthesis by peripheral benzodiazepines. **Cancer Lett.**, v. 49, p. 115-20, 1990.

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

JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. Mass transfer characteristics of a solvent extraction of a single drop at the tip of a syringe needle. **Anal Chem.**, v. 69, p. 235-39, 1997.

JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. Solvente microextraction into a single drop. **Anal Chem.**, v. 68, p. 2236-40, 1996.

JORDÀ, E. G.; JIMÉNEZ, A.; VERDAGUER, E.; CANUDAS, A. M.; FOLCH, J.; SUREDA, F. X.; CAMINS, A.; PALLÀS, M. Evidence in favour of a role for peripheral-type benzodiazepine receptor ligands in amplification of neuronal apoptosis. *Apoptosis.*, v. 10(1), p. 91-104, 2005.

JOYCE, J. R.; BAL, T. S.; ARDREY, R. E.; STEVENS, H. M.; MOFFAT, A. C. The decomposition of benzodiazepines during analysis by capillary gas chromatography/mass spectrometry. *Biomed Mass Spectrom.*, v. 11(6), p. 284-89, 1984.

KALASHNOKOV, S. V.; KALASHNIKOVA, E. A.; KOKAROVTSOVA, S. N. Immunomodulating effects of tofizopam (Grandaxin) and diazepam in vitro. **Mediators Inflamm.**, v. 11(1), p. 53-59, 2002.

KATAOKA, H. New trends in sample preparations for clinical and pharmaceutical analysis. **Trends Anal Chem.**, v.22 (4), p. 232-44, 2003.

KIECOLT-GLASER, J. K.; DURA, J. R. SPEICHER, C. E.; TRASK, O. J.; GLASER, R. Spousal caregivers of dementia victims: longitudinal changes in immunity and health. **Psychosom Med.**, v. 53, p. 345-62, 1991.

KIECOLT-GLASER, J. K.; GLASER, R.; SAVENSTEIN, S.; MALARKEY, W. B.; SHERIDAN, J. F. Chronic stress alters the immune response to influenza virus vaccine in older adults. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 93, p. 3043-47, 1996.

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. 131-37, 2007

KOZIKOWSKI A.P., KOTOULA M., MA D., BOUJRAD N., TUCKMANTEL W., PAPADOPOULOS V. Synthesis and biology of a 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl derivative of 2-phenylindole-3-acetamide: a fluorescent probe for the peripheral-type benzodiazepine receptor. **J Med Chem.**, v. 40(16), p. 2435-39, 1997.

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

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.569-85, 2003.

- LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Application of hollow fiber liquid phase microextraction for the determination of insecticides in water. **J. Chromatogr. A.**, v. 1072, p. 55-61, 2005.
- LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE). São Carlos. RiMa, 2004.
- LANDAU, M.; WEIZMAN, A.; ZOREF-SHANI, E.; BEERY, E.; WASSEMAN, L.; LANDAU, O. Antiproliferative and differentiating effects of benzodiazepine receptor ligands on B16 melanoma cells. *Biochem Pharmacol.*, v.56, p.1029-34, 1998.
- LASCHI, A.; DESCOTES, J.; TACHOM, P.; EVREUX, J.C. Adverse influence of diazepam upon resistance to *Klebsiella pneumoniae* infection in mice. **Toxicol. letters**, v. 16 (3-4), p. 281-4, 1983.
- LAU, C. E.; TANG, M.; FALK, J. L. Micro-sample gas-chromatographic technique for the analysis of barbiturates. *Pharm Biochem Behav.* V. 11, p. 355-57, 1979.
- LAZZARINI, R., MALUCELLI, B.E., MUSCARÁ, M.N., DE NUCCI, G., PALERMO-NETO, J. Reduction of inflammation in rats by diazepam: tolerance development. **Life Science**, v. 72, p. 2361-68, 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, p.3027-34, 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.
- 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. 1839-47, 1983.
- LEE, D. H.; KANG, S. K.; LEE, R. H.; RYU, J. M.; PARK, H. Y.; CHOI, H. S.; BAE, Y. C.; SUH, K. T.; KIM, Y. K.; JUNG, J. S. Effects of peripheral benzodiazepine receptor ligands on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cell. **J Cell Physiol**, v.198, p. 91-99, 2004.
- LENFANT, M.; HAUMONT, J.; HORAK, P.; SEBASTOVA, L.; MASEK, K. **Int. J Immunotherapy.**, vol. 4, p. 125-129, 1988
- LENFANT, M.; HAUMONT, J.; ZAVALA, F. In vivo immunomodulating activity of PK 11195, a structurally unrelated ligand for "peripheral" benzodiazepine binding sites: I. Potentiation in mice of the humoral response to sheep red blood cells. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 8, p. 825-828, 1986.
- 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. 181-90, 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. 1164-71, 2008.
- LIU, J.; RONE, M. B.; PAPADOPOULOS, V. Protein-protein interactions mediate mitochondrial cholesterol transport and steroid biosynthesis. **J Biol Chem.**, v. 281(50), p. 38879-93, 2006.
- LUEBKE, R. W.; CHEN, D. H.; DIETERT, R. YANG, Y.; KING, M.; LUSTER, M. I. The Comparative Immunotoxicity of Five Selected Compounds Following Developmental or Adult Exposure'. *J Toxicol and Environ Health, Part B*, v. 91, p. 1-26, 2006.

- MAASER, K.; SUTTER, A. P.; SCHERÜBL, H. Mechanisms of mitochondrial apoptosis induced by peripheral benzodiazepine receptor ligands in human colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, v. 332(3), p. 646-52, 2005.
- MACPHEE, I. A.; ANTONI, F. A.; MASON, D.W. Spontaneous recovery of rats from experimental allergic encephalomyelitis is dependent on regulation of the immune system by endogenous adrenal corticosteroids. *J Exp Med.*, v. 169(2), p. 431-45, 1989.
- MADDEN, K.S.; FELTEN, D.L. Experimental basis for neural-immune interactions. *Physiological Reviews*, v.75, n. 1, p. 77-106, 1995.
- MARANGOS, P.J.; PATEL, J.; BOULENGER, J.P.; CLARK-ROSEMBERG, P. Characterization of peripheral-type benzodiazepine binding sites in brain using [3H]Ro 5-4864. *Mol. Pharmacol.*, v. 22, p. 26-32, 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.
- MARTINO, J. C.; GREEN, D. R. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, v. 2, p. 63-7, 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.; PALERMO-NETO, J. Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study. *Veter. Immunol. Immunopathology*, v. 95, p. 11-19, 2003.
- MASON, J. W. A review of psychoendocrine research on the sympathetic-adrenal medullary system. *Psychosom Med.*, v. 30, p. 631-53, 1968a.
- MASON, J. W. A review of psychoendocrine research on the pituitary-adrenal cortical system. *Psychosom Med.*, v. 30, p. 576-609, 1968b.
- MATTHEW, E.; LASKIN, J. D.; ZIMMERMAN, E.; WEINSTEIN, J. B.; HSU, K. C. Benzodiazepines have high-affinity binding sites and induce melanogenesis in B16/C3 melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 78, p. 3935-39, 1981.
- MCENERY, M. W.; SNOWMAN, A. M.; TRIFILETTI, R. R.; SNYDER, S. H. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent ion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.89, p.3170-74, 1992.
- McEWEN, B. S.; BIRON, C. A.; BRUNSON, K. W.; BULLOCH, K.; CHAMBERS, W. H.; DHABHAR, F.; GOLDFARB, R. H.; KITSON, R. P.; MILLER, A. H.; SPENCER, R. L.; WEISS, J. M. The role of adrenocorticoids as modulators of the immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Res. Rev.*, v.23, p.79-133, 1997.
- MCEWEN, B.S. Protective and damaging effects of stress mediators. *New Engl. J. Med.*, v.338, p. 171-179, 1998.
- MCEWEN, B.S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res.*, v.886, p. 172-89, 2000.
- MEYLAN, W. M.; HOWARD, P. H. Atom/fragment contribution method for estimating octanol-water partition coefficients. *J Pharm Sci.*, v. 84(1), p. 83-92, 1995.

- MIKKELSEN, J. D.; SODERMAN, A.; KISS, A.; MIRZA, N. Effects of benzodiazepine receptor agonists on the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. **Eur J Pharmacol.**, v.519, p. 223-30, 2005.
- MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Toxicologia Analítica (Ciências Farmacêuticas). Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008.
- NAITOH Y.; FUKATA, J.; TOMINAGA, T.; NAKAI, Y.; TAMAI, S.; MORI, K.; IMURA, H. (1988). Interleukina-6 stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone in conscious, freelymoving rats. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.155, p.1459-63, 1988.
- NICOSIA, A.; GIARDINA, L.; DI LEO, F.; MEDICO, M.; MAZZOLA, C.; GENAZZANI, A. A.; DRAGO, F. Long-lasting behavioral changes induced by pre- or neonatal exposure to diazepam in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 469, p. 103-09, 2003.
- NIKOLAI, P. Towards a unified model of neuroendocrine immune interaction. **Immunol Cell Biol.**, v. 79, p. 35035-57, 2001.
- NIKOLIC, V.; JOVANOVA-NESIC, K.; JANKOVIC, B.D. Locus cereleus and immunity. I. Supression of plaque-forming cell response and antibodyproduction in rats with lesioned locus ceruleus. **Inter. J. Neuroscience**, v.68, p.283-87, 1993.
- 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. 131-38, 1990.
- OKE, B. O.; SUAREZ-QUIAN, C. A.; RIOND, J.; FERRARA, P.; PAPADOPOULOS, V. Cell surface localization of the peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in adrenal cortex. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 87, p. R1-R6, 1992.
- PALERMO-NETO, J.; 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.**, 2008 (*in press*).
- 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. 222-40, 1993.
- PAPADOPOULOS, V.; AMRI, H.; LI, H.; BOUJRAD, N.; VIDIC, B.; GARNIER, M. Targeted disruption of the peripheral-type benzodiazepine receptor gene inhibits steroidogenesis in the R2C Leydig tumor cell line. **J Biol Chem.**, V.272(51), p. 32129-35, 1997.
- PAPADOPOULOS, V.; BARALDI, M.; GUILARTE, T. R.; KNUDSEN, T. B.; LACAPÈRE, J. J.; LINDEMANN, P.; NORENBORG, M. D.; NUTT, D.; WEIZMAN, A.; ZHANG, M. R.; GAVISH, M. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 27(8), p. 402-9, 2006.
- PAPADOPOULOS, V.; GUARNERI, P.; KREUGER, K. E.; GUIDOTTI, A.; COSTA, E. Pregnenolone biosynthesis in C6-2B glioma cell mitochondria: regulation by a mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.89(11), p.5113-7, 1992.
- 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.
- PAULA, V. F. Avaliação dos efeitos do N-metil-3,4 metilenodioximetanfetamina (MDMA - Ecstasy) sobre parâmetros comportamentais, neuroendócrinos e de atividade de neutrófilos em camundongos – Tese de mestrado, São Paulo, 2007.
- PAWLIKOWSKI, M. Immunomodulating effect of peripheral acting benzodiazepines. In *Peripheral Benzodiazepine Receptors.*, p. 125-35. Academic Press. London, 1993.

- 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. 161-66, 1988.
- PAWLIKOWSKI, M.; STEPIEN, H.; KOMOROWSKI, J. Hypothalamic-pituitary-thyroid axis and the immune system. *Neuroimmunomodulation*, v.1, p.149-152, 1994. **Psychopharmacol.**, v.38, p. 239-48, 1983.
- PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. **J Chromatogr B.**, v. 817, p. 3-12, 2005.
- PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-liquid-liquid microextraction for samples preparations of biological fluids prior to capillary electrophoresis. **Anal Chem.**, v. 71, p. 2650-56, 1999.
- PESOLD, C.; CARUNCHO, H. J.; IMPAGNATIELLO, F.; BERG, M. J.; FRITSCHY, J. M.; GUIDOTTI, A.; COSTA, E. Tolerance to diazepam and changes in GABAA receptor subunit expression in rat neocortical areas. **Neuroscience.**, v.79 (2), p.477-87, 1997.
- PIERRE, C.; SYLVAINE, G.; ANTHONY, S. B. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. **Neurochem Int.**, v. 40, p. 475-86, 2000.
- PRATT, J. A.; BRETT, R. R.; LAURIE, D. J. Benzodiazepine dependence: from neural circuits to gene expression. **Pharmacol Biochem Behav.**, v.59 (4), p.925-34, 1998.
- PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **Trends Anal Chem.**, v. 22 (10), p. 565-74, 2003.
- PUIA, G.; SANTI, M. R.; VICINI, S.; PRITCHETT, D. B.; PURDY, R. H.; PAUL, S. M.; SEEBURG, P. H.; COSTA, E. Neurosteroids act on recombinant human GABA_A receptors. **Neuron.**, v.4, p.759-65, 1990.
- RABIN, B. S. Stress, immune functions and health. The connection. Wiley & Sons. New York, 1999.
- 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.
- RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. **Trends Anal Chem.**, v. 23, p. 1-10, 2004.
- RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; KROGH, M.; UGLAND, H. G.; GRONHAUG, T. Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr A.**, v. 873, p. 3-11, 2000.
- REICHLIN, S. Neuroendocrine-immune interactions. **The New England J. of Med.**, v. 329, n. 17, p.1246-53, 1993.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim.Nova*, São Paulo, v.27, n.5, p.771-80, 2004.
- 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. 1145-153, 1999.
- RISS, J.; CLOYD, J.; GATES, J.; COLLINS, S. Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics. *Acta Neuro Scand.*, 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.

- ROCHARD, P.; GALIEGUE, S.; TINEL, N.; PELERAUX, A.; BORD, A.; JBILO, O.; CASELLAS, P. Expression of the peripheral benzodiazepine receptor triggers thymocyte differentiation. **Gene Expr.**, v. 12(1), p. 13-27, 2004.
- ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. **Mem. Inst. Butantan.**, v.20, p.315-28, 1947.
- 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.
- 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.
- 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. 1777-83, 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.
- SAPOLSKY, R.; RIVIER, C.; YAMAMOTO, G.; PLOTSKY, P.; VALE, W. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. **Science**, v.1, p.522-24, 1987.
- 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. 108-15, 2006.
- SCHLUMPF, M.; LICHTENSTEIGER, W.; van Loveren, H. Impaired host resistance to *Trichinella spiralis* as a consequence of prenatal treatment of rats with diazepam. **Toxicology**, v.94, p. 223-230, 1994.
- SCHLUMPF, M.; LICHTENSTEIGER, W.; RAMSEIER, H. R. Diazepam treatment of pregnant rats differentially affects interleukin-1 and interleukin-2 secretion in their offspring during different phases of postnatal development. **Pharmacol Toxicol.**, v.73, p.335, 1993a.
- SCHLUMPF, M.; PARMAR, R.; LICHTENSTEIGER, W. Prenatal benzodiazepine immunosuppression: Possible involvement of peripheral benzodiazepine site. **Developmental Pharmacology Therapeutics.** , v.15, p. 178-85, 1990.
- SCHLUMPF, M.; PARMAR, R.; LICHTENSTEIGER, W. Prenatal diazepam induced persisting down regulation of peripheral (ω^3)benzodiazepine receptor on rat splenic macrophages. **Life Sci.**, v.52, p.927-34, 1993b.
- SCHLUMPF, M.; PARMAR, R.; SCHREIBER, A.; BÜTIKOFER, H.R. Nervous and immune system as targets for developmental effects of benzodiazepines: a review of recent studies. **Developmental Pharmacology and Therapeutics**, v. 18, p. 145-58, 1992.
- SCHLUMPF, M.; RAMSEIER, H.; ABRIEL, H.; YOUNBI, M.; BAUMANN, J. B.; LICHTENSTEIGER, W. Diazepam effects on the fetus. **Neurotoxicology.**, v. 10, p. 501-16, 1989b.
- SCHLUMPF, M.; RAMSEIER, H.; LICHTENSTEIGER, W. Prenatal diazepam induced persisting depression of cellular immune responses. **Life Sciences**, v.44, p. 493-501, 1989a.
- SCHWARTZ, L. M.; SMITH, S. W.; JONES, M. E. E.; OSBORNE, B. A. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci USA.*, v. 90, p. 980-84, 1993.

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.231-36, 1994.

SHARP, B. M.; 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.3131-33, 1989.

SILVA F.R, LAZZARINI R, DE SA-ROCHA L.C, MORGULIS 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.

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

STEPIEN, H.; PAWLIKOWSKA, A.; PAWLIKOWSKI, M. Effects of benzodiazepines on thymus cell proliferation. **Thymus.**, v. 12, p. 171-78, 1988.

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

TAKETANI, S.; KOHNO, H.; OKUDA, M.; FURUKAWA, T.; TOKUNAGA, R. Induction of peripheral-type benzodiazepine receptors during differentiation of mouse erythroleukemia cells. A possible involvement of these receptors in heme biosynthesis. **J Biol Chem.**, v. 269, p. 7527-31, 1994.

TAKETANI, S.; KOHNO, H.; OKUDA, M.; FURUKAWA, T.; TOKUNAGA, R. Involvement of peripheral benzodiazepine receptors in the extracellular transport of heme and porphyrins. **J Biochem.**, v. 117, p. 875-80, 1995.
TANIMOTO, Y.; ONISHI, Y.; SATO, Y.; KISAKI, H. Benzodiazepine receptor agonists modulate thymocyte apoptosis through reduction of the mitochondrial transmembrane potential. **Jpn J Pharmacol.**, v. 79, p.177-83, 1999.

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

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.

TROTTIER, M. D.; NEWSTED, M. M.; KING, L. E.; FRAKER, P. J. Natural glucocorticoids induce expansion of all developmental stages of murine bone marrow granulocytes without inhibiting function. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 105(6), p. 2028-33, 2008.

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.

UGAZ, E. M. A.; PINHEIRO, S. R.; GUERRA, J. L.; PALERMO-NETO, J. Effects of prenatal diazepam treatment on *Mycobacterium bovis*-induced infection in hamster. **Immunopharmacol.**, v. 41, p. 209-17, 1999.

- UGLAND, H. G.; KROGH, M.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction as a sample preparation technique prior to capillary gas chromatographic-determination of benzodiazepines in biological matrices. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.*, v. 749 (1), p. 85-92, 2000.
- VAN LOO, G.; SAELENS, X.; VAN GURP, M.; MACFARLENE, M.; MARTIN, S. J.; VANDENABEELE, P., The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. **Cell Death Differ.**, v. 9, p. 1042, 2002
- 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 responde. *Curr Pharm Des.*, v. 13(23), 2007.
- VERMA, A.; NYE, S.; SNYDER, S. Porphyrins are endogenous ligands for the mitochondrial (peripheral-type) benzodiazepine receptor. **Biochemistry.**, v. 84, p. 2256-60, 1987.
- VERMA, A.; SNYDER, S. Characterization of porphyrin interactions with peripheral type benzodiazepine receptors. **Mol Pharmacol.**, v. 34, p. 800-05, 1988.
- 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.
- WANG, L.; ZHAO, H.; QIU, Y.; ZHOU, Z. Determination of four benzodiazepine residues in pork using multiwalled carbon nanotube solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.*, v. 1136 (1), p. 99-105, 2006.
- WEBSTER, C. Y.; TORPY, D. J.; ELENKOV, I. J.; CHROUSOS, G. P. Corticotropin-releasing hormone and inflammation. In: MCCANN, M.; LIPTON, J. M.; STERNBERG, E. M.; CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W.; SMITH, C. C. (Ed.). **Neuroimmunomodulation: molecular aspects, integrative systems and clinical advances**. New York: Ann. N.Y. Acad. Sci., p. 21-32, 1988.
- WEBSTER, J. I.; TONELLI, L.; STERNBERG, E. M. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol.*, v.20, p.125-63, 2002.
- WEBSTER-MARKETONI, J. I.; GLASER, R. Stress hormones and immune function. **Cell Immunol.**, 2008.
- WEIGGERS, G. J.; REUL, J. M. H. M. Induction of cytokine receptors by glucocorticoids: functional and pathological significance. **TIPS**, v.19, p.317-21, 1998.
- WEIZMAN R, LESCHINER S, SCHLEGEL W, GAVISH M. Peripheral-type benzodiazepine receptor ligands and serum steroid hormones. **Brain Research**, v. 772, p. 203-08, 1997.
- WENDLER, G.; LINDEMANN, P.; LACAPÈRE, J. J.; PAPADOPOULOS, V. Protoporphyrin IX binding and transport by recombinant mouse PBR. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 311(4), p. 847-52, 2003.
- WISDEN, W.; SEEBURG, P. H. GABA_A receptor channels: from subunits to functional entries. **Curr Opin Neurobiol.**, v.2, p.263-69, 1992.
- WOODS, J.H., KATZ, J.L., WINGER, G. Benzodiazepines: Use, abuse, and consequences. **Pharmacol. Rev.**, Baltimore, v.44, n.2, p.151-347, 1992.
- ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 2, p.67-71. 2001.
- ZANOTTI, A.; NATOLINO, F.; CONTARINO, A.; LIPARTITI, M.; GIUSTI, P. Abecarnil enhances recovery from diazepam tolerance. *Neuropharmacology.*, v. 38(9), p. 1281-8, 1999.

ZAVALA, F. Benzodiazepine, Anxiety and Immunity. **Pharmacol Ther.**, v.75 (3), p.199-216, 1997.

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

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

ZAVALA, F.; VEBER, F.; DESCAMPS-LATSCHA, B. Altered expression of neutrophil peripheral benzodiazepine receptor in X-linked chronic granulomatous disease. **Blood.**, v. 16, p. 184-88, 1990.

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 Ciências Farmacêuticas**
Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

CEEA nº 65/2006

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"Efeitos da administração de diazepam sobre parâmetros comportamentais, imunológicos e bioquímicos de ratos"** (Protocolo CEEA nº117), sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Camila Bento de Lima** e do orientador(a) Prof(a).Dr(a). **Regina Lúcia de Moraes Moreau**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 11/09/2006.

São Paulo, 11 de setembro de 2006.

Prof. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da administração de diazepam sobre parâmetros comportamentais, imunológicos e bioquímicos de ratos", protocolado sob o nº948/2006, utilizando 156 (cento e cinquenta e seis) 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 16/08/06".

(We certify that the Research "Effects of diazepam on immunity, behavior and biochemistry parameters in rats", protocol number 948/2006, utilizing 156 (one hundred fifty six) rats, under the responsibility of Prof. Dr. João Palermo Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 08/16/2006).

São Paulo, 17 de agosto de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP