

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TOXICOLOGIA E ANÁLISES
TOXICOLÓGICAS

Efeitos da meta-clorofenilpiperazina (mCPP) sobre
mecanismos da mobilização leucocitária: Estudos *in vivo* e
in vitro

Lara Lombardi

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Regina Lúcia M. Moreau

São Paulo
2012

Lara Lombardi

Efeitos da meta-clorofenilpiperazina (mCPP) sobre mecanismos da
mobilização leucocitária: Estudos *in vivo* e *in vitro*.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Regina Lúcia M. Moreau
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Agradecimentos

Aos meus pais Kátia Nunes da Costa Neves Lombardi e Moacyr de Oliveira Lombardi Jr. por doarem parte de suas vidas à minha; aos meus irmãos Júlia e Yann pela amizade e por me acompanharem de perto nessa jornada da vida. Aos meus avós, Lena, Dete, Moa e Jeco, por olharem sempre por mim e me darem força; aos meus tios Ilka e Marco, por serem sempre tão presentes. Sempre fui e sempre serei grata a vocês.

Ao Henrique, pelo sopro de consciência e alegria, por estar sempre ao meu lado, obrigada!

À minha orientadora, Profa. Dra. Regina Lúcia M. Moreau, pela oportunidade, confiança, apoio e ensinamentos, muito obrigada.

Aos amigos,

A todos os meus amigos e amigas de longa data que me acompanharam em tantas etapas e transições importantes da minha vida, em especial: Juliana D. Macedo, Thais Matsushigue, M. Fernanda Foschi, Natália Mantovani, Rodolfo Mateus, André Abibe e Lilian Casanova;

Aos novos amigos Ana Lúcia Shimada, Tiago Oliveira, Rodrigo Dias, André Ribeiro, Natália Guimarães e André Nakasato pelo companheirismo e momentos de descontração;

À Dra. Cristina Hebeda e à Dra. Simone Bolonheis pelo auxílio constante no desenvolvimento deste trabalho, pelas discussões, ensinamentos e incentivos;

A todos do Laboratório de Toxicologia Experimental pela boa convivência e ajuda, aprendi muito com cada um de vocês: Isabel Machado, Marcela, José Roberto Santin, Carine Drewes, Camila Araújo, Gabriela Muller, Viviane Ferraz de Paula, Stephen Rodrigues e André Shimoyama;

Ao Professor Dr. Robert Rittner (IQ-UNICAMP), por ter me apresentado de maneira tão cuidadosa o universo infindável que é fazer pesquisa, minha gratidão e admiração.

Aos colaboradores,

À Profa. Dra. Sandra Farsky, pelo empenho em tornar possível a realização deste trabalho, por abrir as portas de seu laboratório à mim, pelos ensinamentos e oportunidades, minha sincera gratidão;

À Profa. Dra. Primavera Borelli e todos do Laboratório de Hematologia pelos valiosos ensinamentos e ajuda, em especial à Dra. Karina Nakajima;

Ao Msc. Rafael Lanaro do CCIH-UNICAMP pela amostra de padrão de mCPP cedida, possibilitando assim a realização deste trabalho, e pelo apoio e incentivo à minha vinda a São Paulo para cursar pós-graduação em Toxicologia na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, muito obrigado;

Aos professores e colegas da Toxicologia;

Aos funcionários Ângelo, D. Luzia, D. Dalva, D. Helena, Sueli, Elaine, Jorge, Nancy e Samantha.

Ao Biotério de Criação e Experimentação Animal da FCF/IQ pelo fornecimento dos animais utilizados neste trabalho.

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas por acolherem-me como aluna de pós-graduação.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

A realização deste trabalho só foi possível através da colaboração, ajuda, apoio e incentivo de muitas pessoas. A todos que direta ou indiretamente participaram deste trabalho e deste período de profundo aprendizado para mim, minha eterna gratidão!!!

RESUMO

Efeitos da meta-clorofenilpiperazina (mCPP) sobre mecanismos da mobilização leucocitária: Estudos *in vivo* e *in vitro*

Lara Lombardi, Regina Lúcia de Moraes Moreau.

A meta-clorofenilpiperazina (1-(3-clorofenil)piperazina; mCPP) é uma piperazina sintética que vem sendo apreendida de forma crescente no mercado de drogas ilícitas, primeiro na Europa e, a partir de 2006, também no Brasil. Recentemente há relatos de aumento significativo da apreensão de comprimidos vendidos como *ecstasy* e que na realidade contêm mCPP, porém estudos sobre potenciais riscos dessa utilização à saúde ainda são escassos. O papel da mCPP como agonista de receptores serotoninérgicos já está bem descrito na literatura, razão pela qual esta substância é amplamente empregada em trabalhos científicos, principalmente psiquiátricos. No entanto, poucos são os trabalhos realizados com o intuito de investigar mais profundamente as ações desencadeadas no organismo pela substância em si. É sabido que a serotonina é um neurotransmissor liberado por plaquetas no local de inflamação e que exerce papel imunomodulatório importante sobre as células imune. Assim, considerando (1) a relevância atual da mCPP no contexto de apreensão de drogas de abuso, (2) a necessidade de estudos sobre efeitos das drogas de abuso no organismo, (3) escassez de avaliações dos efeitos da mCPP sobre o sistema imunológico e (4) sua provável correlação com este sistema a partir de suas ações em receptores serotoninérgicos, o presente trabalho pretendeu iniciar investigações acerca da atividade da mCPP sobre as respostas imune inatas e sobre os mecanismos da mobilização leucocitária. Para tanto, ratos Wistar machos foram tratados com mCPP (1mg/kg, v.o.) e foram realizadas quantificações de leucócitos na medula óssea, no compartimento circulante e no foco inflamatório (peritônio), em presença ou ausência de estímulo inflamatório (LPS, 1 mg/mL, i.p.), como também da mieloperoxidase presente em tecido hepático, pulmonar e do baço. Complementando os estudos *in vivo*, ainda foi quantificada a cortisona plasmática em animais que receberam tal tratamento tendo seus receptores de glicocorticoides previamente antagonizados (RU38486). Neutrófilos coletados do exsudato peritoneal foram incubados nas concentrações de 10 μ M, 100 μ M e 1000 μ M *in vitro* e investigados a migração neutrofílica, a expressão das moléculas de adesão na superfície neutrofílica, a quantificação de mediadores inflamatórios no sobrenadante de cultura de neutrófilos e o processo de adesão neutrófilo-endotélio, com células

endoteliais coletados a partir do cremáster. Os resultados demonstram que a mCPP diminuiu a quantificação de leucócitos no exsudato peritoneal e, concomitantemente, aumentou o influxo de PMN para o tecido pulmonar, em vigência de estímulo inflamatório. Ainda, *in vivo*, não foi possível observar diferenças na concentração de cortisona sérica entre animais cujos receptores de glicocorticóides foram antagonizados e aqueles cujos receptores em questão encontravam-se normais. *In vitro*, a mCPP, nas três concentrações empregadas, e tanto na vigência quanto na ausência de estímulo (LPS ou fMLP), causou alterações na migração dos neutrófilos, na adesão deste tipo celular ao endotélio, na expressão de moléculas de adesão (L-selectina, β 2-integrina e PECAM-1) na superfície neutrofílica e na quantificação das concentrações de mediadores inflamatórios (NO, IL-1 β , IL-10, TNF- α) no sobrenadante de cultura de neutrófilos.

Os resultados obtidos sugerem, em conjunto, que a mCPP exerce atividade pró-inflamatória no que se refere à atividade neutrofílica, bem como sugerem que o fármaco seja capaz de amplificar a resposta inflamatória em modelo animal de rato, tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

Palavras-chave: mCPP; neutrófilo; inflamação.

ABSTRACT

Effects of the meta-chlorophenylpiperazine (mCPP) over the leukocyte mobilization mechanisms: in vivo and in vitro studies.

Lara Lombardi, Regina Lúcia de Moraes Moreau.

The meta-chlorophenylpiperazine is a synthetic piperazine which has been seized increasingly in the illicit drug market, primarily in Europe and after 2006, in Brazil. Recently, there has been a significant increase on the apprehension of tablets sold as ecstasy but that in reality contain mCPP. Despite its importance, studies over its potential health risks are few.

The mCPP role as serotonergic receptor agonist is well known in the literature, reason why this substance is widely employed in scientific research, particularly in psychiatric studies. But there are few reports that aim to investigate thoroughly the actions that this substance triggers in the organisms. It is also known that serotonin is a neurotransmitter released by platelets at the site of inflammation and plays important immunomodulatory role on immune cells.

Therefore, considering (1) the relevance of mCPP in the drug abuse context nowadays, (2) the necessity of researching the effects of the drug abuse in the organisms, (3) the lack of studies containing analysis of the mCPP effects over the immune system and (4) the probable correlation between mCPP and this system, through its activity in serotonergic receptors, this report intended to lead investigations about the mCPP activity over the innate immune response and over the leukocyte mobilization mechanisms. For this purpose, Wistar male rats were treated with mCPP (1mg/kg, v.o.), their leukocytes were measured in the bone marrow, in the circulating compartment and in the inflammatory foci (peritoneum) in the presence or absence of inflammatory stimuli (LPS, 1 mg/mL, i.p.) and the myeloperoxidase present in liver tissue, lung and spleen was also quantified.

In addition to in vivo studies, the cortisone plasma was quantified in animals receiving such treatment with glucocorticoid receptors antagonized previously (RU38486). Neutrophils collected from the peritoneal exudate were incubated at concentrations of 10 mM, 100 mM and 1000 mM in vitro. It was then investigated the neutrophil migration and the expression of adhesion molecules on the surface of neutrophils as well as the quantification of inflammatory mediators in the culture supernatant. The process of neutrophil-neutrophil adhesion to endothelium was also analyzed and endothelial cells were collected from the cremaster.

Results reflect that mCPP decreased the amount of leukocytes at the peritoneal exudate and, concomitantly, increased the influx of PMN into the lung tissue during an

inflammatory stimulus. Also, *in vivo*, it was possible to observe differences in the concentration of serum from animals which cortisone glucocorticoid receptors were previously antagonized and those in which the receptors in question were normal. *In vitro*, mCPP in three concentrations employed, and both in the presence or absence of stimulus (LPS or fMLP) caused changes in the migration of neutrophils, in the cell adhesion to the endothelium, in the expression of adhesion molecules (L-selectin, integrin- β 2 and PECAM-1), on the surface of neutrophils and in the concentrations of inflammatory mediators (NO, IL-1 β , IL-10, TNF- α) in the culture supernatant of neutrophils.

The results suggest that, together, mCPP exerts pro-inflammatory activity with respect to neutrophil activity. They also suggest that the drug is able to amplify the inflammatory response in an animal model rat both *in vivo* and *in vitro*

Key-words : mCPP, neutrophils, inflammation.

Lista de figuras

Figura 1. Formas ilícitas contendo mCPP.....	3
Figura 2. Estruturas químicas das principais piperazinas.....	7
Figura 3. Via metabólica predominante na biotransformação hepática da mCPP.....	10
Figura 4. Esquema de tratamento empregado nos ensaios <i>in vivo</i>	29
Figura 5. Efeitos da mCPP sobre a mobilização de células nucleadas da medula óssea e de leucócitos circulantes em ratos Wistar machos.....	38
Figura 6. Efeitos da mCPP sobre o influxo de leucócitos no exsudato peritoneal de ratos Wistar machos.....	39
Figura 7. Efeitos da mCPP sobre a atividade da mieloperoxidase em fígado, baço e pulmões de ratos Wistar machos.....	40
Figura 8. Efeitos da mCPP sobre a concentração de cortisona circulante.....	41
Figura 9. Efeitos da mCPP sobre a quimiotaxia de neutrófilos <i>in vitro</i>	42
Figura 10. Efeitos da mCPP sobre a aderência de neutrófilos em cultura primária de células endoteliais, ambos coletados de ratos Wistar machos, aplicando-se LPS como estímulo inflamatório.....	43
Figura 11. Efeitos da mCPP, <i>in vitro</i> , sobre a expressão de (A) L-selectina, (B) β 2-integrina e (C) PECAM-1, em neutrófilos coletados da cavidade peritoneal de ratos Wistar machos 4 horas após a injeção de 10 ml de solução de glicogênio de ostra 1%.....	44
Figura 12. Efeitos da mCPP <i>in vitro</i> sobre produção de (A) NO, (B) TNF- α , (C) IL-10 e (D) IL-1 β por neutrófilos coletados da cavidade peritoneal de ratos Wistar machos 4 horas após a injeção de 10 ml de solução de glicogênio de ostra 1%.....	46

Lista de abreviações e símbolos

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BZP	Benzilpiperazina
NK	<i>Natural killer</i>
C _{máx}	Concentração máxima
CRH	<i>Corticotropin-Releasing Hormone</i>
CYP	Enzimas do complexo citocromo P450
E-selectina	<i>Endothelial leukocyte adhesion molecule - 1</i>
ELISA	Ensaio imunoenzimático
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
FITC	Isoticianato de fluoresceína
G-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular - 1
IEAP	Imunoestimulantes patógeno-associados
IL	<i>Interleucin</i>
IL-1ra	Antagonista de receptor IL-1
IFN- γ	<i>Interferon-γ</i>
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
i.p.	Intraperitoneal
LPS	Lipopolissacarídeo
L-selectina	<i>Leukocyte selectin</i>
mCPP	Meta-clorofenilpiperazina
MDMA	3,4 – Metilenodioximetanfetamina
MDBP	1-(3,4- metilenodioxibenzi)piperazina
MeOPP	1-(4-metoxifenil)piperazina
MN	Mononuclear
MPO	Mieloperoxidase.
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
pCPP	Pára-clorofenilpiperazina
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule - 1</i>

PMN	Polimorfonuclear
oCPP	Orto-clorofenilpiperazina
RU38486	<i>Mifepristone</i>
SFD-1	<i>Stromal derived factor-1</i>
SERT	<i>Serotonin reuptake transporter</i>
TFMPP	1-[3-(trifluoro-metil)fenil]piperazina
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
TNF- α	<i>Tumoral necrose factor - α</i>
SNA	Sistema nervoso autônomo
VCAM-1	Molécula de adesão vascular-1
v.o.	Via oral
5-HT	Serotonina

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. mCPP e propriedades farmacológicas.....	7
2.2. Toxicocinética.....	9
2.3. Efeitos tóxicos.....	10
2.4. Serotonina, agonistas e antagonistas serotoninérgicos e resposta inflamatória.....	12
2.5. Sistema imunológico e inflamação.....	14
2.6. Neutrófilo.....	17
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. Objetivos Gerais.....	23
3.2. Objetivos Específicos.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. Fármacos, reagentes e substâncias biológicas.....	26
4.2. Animais.....	27
4.3. Ensaio <i>in vivo</i>	27
4.3.1. Delineamento Experimental.....	27
4.3.2. Determinação do número de leucócitos no sangue circulante.....	29
4.3.3. Determinação do número de leucócitos no exsudato peritoneal.....	29
4.3.4. Determinação do número de células nucleadas na medula óssea.....	30
4.3.5. Medida da atividade tecidual de mieloperoxidase (MPO) em tecido pulmonar, hepático e do baço.....	30
4.3.6. Quantificação da concentração de cortisona sérica.....	31
4.4. Ensaio <i>in vitro</i>	32
4.4.1. Obtenção de neutrófilos migrados para o exsudato peritoneal.....	32
4.4.2. Obtenção de células endoteliais.....	32
4.4.3. Quimiotaxia de neutrófilos – Câmara de Boyden.....	33
4.4.4. Ensaio de aderência neutrófilo-endotélio.....	34

4.4.5. Quantificação das moléculas de adesão.....	34
4.4.6. Quantificação de mediadores inflamatórios.....	35
4.5. Análise Estatística.....	36
5. RESULTADOS.....	37
5.1. Efeitos da exposição <i>in vivo</i> à mCPP.....	38
5.1.1. Mobilização de células nucleadas na medula óssea e de leucócitos no sangue circulante.....	38
5.1.2. Mobilização de leucócitos no exsudato peritoneal.....	39
5.1.3. Atividade tecidual de mieloperoxidase (MPO) em tecido pulmonar, hepático e do baço.....	40
5.1.4. Quantificação da concentração de cortisona sérica.....	41
5.2. Efeitos da exposição <i>in vitro</i> à mCPP.....	41
5.2.1. Quimiotaxia de neutrófilos.....	41
5.2.2. Aderência neutrófilo-endotélio.....	42
5.2.3. Expressão de moléculas de adesão em neutrófilos.....	43
5.2.4. Concentração de mediadores inflamatórios em sobrenadante de cultura de neutrófilos.....	45
6. DISCUSSÃO.....	47
7. CONCLUSÃO.....	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
9. ANEXOS.....	75

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Como é sabido, o sistema imune compõe a primeira linha de defesa do organismo contra invasores. Para isso, conta com uma diversidade de células com funções específicas submetidas a refinado controle, o qual é responsivo a uma gama de mediadores. Este sistema encontra-se integrado com todos os tecidos, periféricos e centrais, para o pleno desenvolvimento de sua função, sendo também responsivo a alterações que venham a ocorrer nestes tecidos e compartimentos distintos.

O uso recreativo de drogas, legalizadas ou não, tem despertado sérias preocupações sobre as consequências de tais substâncias para o sistema imunológico. *Cannabis*, cocaína, opióides e anfetaminas são amplamente utilizadas como drogas recreativas ilegais, e são descritos na literatura relatos clínicos sobre a associação de seu uso com doenças infecciosas. Ademais, drogas legalizadas, como é o caso do etanol e do tabaco, estão ligadas a um consumo excessivo e correlacionam-se com problemas graves de saúde. Estudos experimentais corroboram com as observações clínicas sobre a associação de drogas de abuso com imunomodulação (FRIEDMAN *et al.*, 2003), justificando a importância de investigações que desenvolvam e estudem mais profundamente este tema.

A meta-clorofenilpiperazina (1-(3-clorofenil)piperazina) ou mCPP é uma nova droga sintética que apareceu pela primeira vez em 2004 na Suécia e desde então passou a ser encontrada em quantidades significativas no mercado de substâncias ilícitas na Europa (KOVALEVA, 2008). Ilustrando tal fato, em 2006, aproximadamente 823.000 comprimidos desta droga foram apreendidos em países da União Européia (KOVALEVA *et al.*, 2008).

A razão da utilização da mCPP como droga de abuso se deve ao fato dela exercer efeitos similares (efeitos subjetivos e sobre o sistema serotoninérgico) à MDMA (3,4 - Metilenodioximetanfetamina) (KOVALEVA *et al.*, 2008; BOSSONG *et al.*, 2009) e, inicialmente, não existir restrições legais quanto ao seu uso. Além da mCPP, outras piperazinas como BZP (benzilpiperazina) e TFMPP (1-[3-(trifluoro-metil)fenil]piperazina) também têm sido amplamente apreendidas no mercado ilícito em formas de apresentação similares às do *ecstasy* (JONHSTONE *et al.*, 2007).

A mCPP ilícita é normalmente utilizada por via oral, mas uma vez que há relatos de sua apreensão sob a forma de pó, é possível sugerir sua aplicação por via inalatória ou endovenosa (KOVALEVA *et al.*, 2008; BOSSONG *et al.*, 2009). A maioria das amostras apreendidas são comprimidos vendidos como sendo *ecstasy*, podendo conter apenas a mCPP ou uma combinação de mCPP e MDMA (BOSSONG, 2009). Na forma de pó, já foram encontradas amostras vendidas como sendo cocaína (BOSSONG, 2005). A mCPP também pode ser comprada pela *internet* com a denominação de “X4”, um comprimido contendo uma combinação de 4 tipos de piperazinas (mCPP, TFMPP, oCPP e pCPP) (BOSSONG, VAN DIJK & NIESINK, 2005).

Os comprimidos de mCPP são encontrados nas mais diversas cores, formas, tamanhos e com vários logos (Fig. 1). São bastante semelhantes aos comprimidos de *ecstasy*, sendo impossível fazer a distinção entre eles apenas pela aparência. A quantidade de mCPP presente nos comprimidos apreendidos pode variar de 1 a 83 mg (BOSSONG *et al.*, 2009).



Figura 1. Formas ilícitas contendo mCPP.

A mCPP pode ser obtida por meio de muitas rotas de síntese existentes, das quais a mais comum é a reação da dietanolamina com 3-cloroanilina; outros dois isômeros de mCPP (pCPP e oCPP) podem ser produzidos de maneira análoga (EUROPOL-EMCDDA, 2007).

A primeira apreensão de mCPP ocorrida no Brasil foi realizada pela Polícia Federal em Goiás, na Central de Distribuição dos Correios em Aparecida de Goiânia. Em 13 de novembro de 2007 foram apreendidos 1000 comprimidos, que seriam encaminhados para o Rio de Janeiro. Em Itumbiara (GO) ocorreu a segunda apreensão relatada no país; a mCPP foi descoberta por meio de exame pericial em 500 comprimidos (MEDEIROS, 2009). Entre os meses de janeiro e maio de 2008, foram apreendidos 112 comprimidos de mCPP pela polícia civil do Estado de São Paulo, que foram periciados no Laboratório de Toxicologia Forense do Núcleo de Perícias Criminalísticas de Campinas – Superintendência da Polícia Técnico Científica do Estado de São Paulo (Lanaro et al. 2010).

De acordo com registros da Polícia Federal, comprimidos contendo piperazinas têm sido apreendidos no Brasil desde 2006; esse número aumentou consideravelmente, de 2007 (18 unidades) até julho de 2008 (1.220 unidades). Muito provavelmente esse aumento deveu-se a ausência, até então, de legislação que restringisse e regulamentasse sua utilização e consumo (MALDANER, 2009). Porém, em 05 de novembro de 2008, a mCPP e em 26 de fevereiro de 2009, a BZP (benzilpiperazina) e a TFMP (1-[3-(trifluoro-metil) fenil] piperazina), foram incluídas na lista das substâncias psicotrópicas de uso proscrito no Brasil (lista F2 da Portaria SVS/MS 344/98) (ANVISA, 2009).

Apesar de a mCPP encontrar-se constantemente no cenário de apreensão de drogas recreativas ilícitas – levando-a, inclusive, a ser incluída na lista de

substâncias proscritas pela ANVISA e por órgãos internacionais – a literatura sobre seus efeitos restringe-se a investigações psiquiátricas relativas ao seu uso como protótipo de agonista serotoninérgico, no desenvolvimento de métodos analíticos ou reportes clínicos. No que se refere aos seus efeitos sobre o sistema imunológico, as informações ainda são bastante escassas.

Levando-se em consideração (1) a relevância atual da mCPP no contexto de apreensão de drogas de abuso, (2) a necessidade de estudos sobre efeitos das drogas de abuso no organismo, (3) escassez de avaliações dos efeitos da mCPP sobre o sistema imunológico e (4) sua provável correlação com este sistema a partir de suas ações em receptores serotoninérgicos, foi decidido realizar este trabalho. Nesse contexto, buscamos investigar efeitos da mCPP sobre a imunidade inata, mais estreitamente sobre a mobilização leucocitária.

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. mCPP e propriedades farmacológicas

A mCPP, assim como a N-benzilpiperazina (BZP), 1-(3,4-metilenodioxibenzi)piperazina (MDBP), 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina (TFMPP) e a 1-(4-metoxifenil)piperazina (MeOPP) são *design drugs*, derivados sintéticos das piperazinas (Fig.2). As piperazinas são uma extensa classe de compostos químicos com propriedades farmacológicas importantes que foram introduzidas na metade da década de 50 como antihelmínticos. Atualmente, são encontrados compostos piperazínicos que incluem agentes antipsicóticos (olanzapina, clozapina), antidepressivos (trazodona, nefazodona) e fármacos para o tratamento da disfunção erétil (sildenafil, vardenafil) (EUROPPOL-EMCDDA, 2007; KOVALEVA *et al.*, 2008; VORCE *et al.*, 2008).

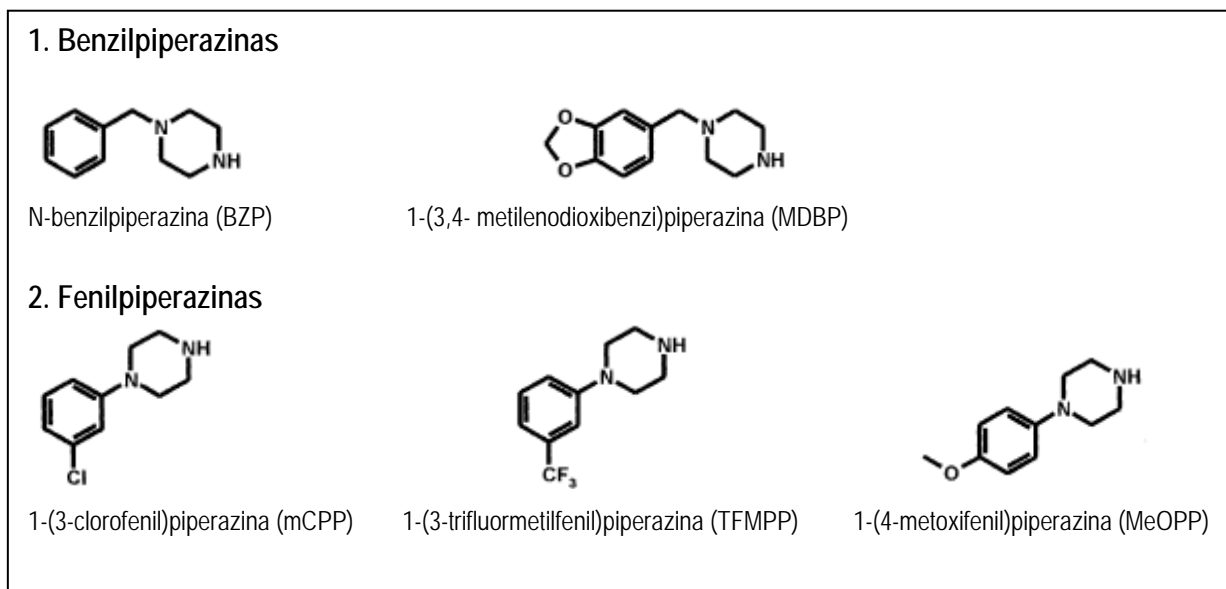


Figura 2. Estruturas químicas das principais piperazinas

A mCPP apresenta tanto efeitos pós quanto pré-sinápticos no sistema serotoninérgico. Atua como agonista de vários tipos de receptores 5-HT incluindo 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C}, como agonista parcial com baixa atividade nos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D}, como antagonista, além de induzir a liberação de

serotonina (5-HT) dependente de transportador de serotonina (SERT) e inibir a recaptura de 5-HT (GOBBI *et al.*, 2002; THOMAS *et al.*, 1996; GIJSMAN *et al.*, 2004). Também interage com receptores dopaminérgicos, acetilcolinérgicos, alfa e beta-adrenérgicos (ELLENHORN *et al.*, 2006).

Devido a sua grande afinidade pelos receptores e transportadores de serotonina, a mCPP tem sido utilizada na psiquiatria para investigar a função serotoninérgica central (KAHN & WETZLER, 1991). Também tem sido utilizada em pesquisas sobre efeitos comportamentais e neuroendócrinos de pacientes com transtornos de ansiedade (obsessivo-compulsivo, esquizofrenia, pânico, depressão); os resultados mostraram que a mCPP ocasiona razoável piora desses sintomas, como a esquizofrenia e ataques de pânico (KRYSTAL *et al.*, 1993; GERMINE *et al.*, 1994).

No entanto, sua maior utilização é como um intermediário na síntese de trazodona, um antidepressivo de segunda geração e de outros compostos relacionados (nefazodona, etoperidona e mepiprazol). Estes compostos diferem apenas no substituinte ligado na parte piperazinilpropil; portanto, quando são biotransformados, são N-desalquilados, liberando a mCPP como metabólito farmacologicamente ativo. Dentre esses compostos, tradicionalmente, a trazodona tem sido mais aplicada. Esta é um forte antagonista de receptor 5HT_{2A}, efeito provavelmente envolvido em sua ação antidepressiva e ansiolítica. Também é antagonista de auto-receptores pré-sinápticos 5-HT₁ (STEFANINI *et al.*, 1976). Como a mCPP, seu metabólito ativo, é um potente agonista serotoninérgico direto, agindo sobre vários subtipos de receptores 5-HT, a mCPP contribui tanto com os efeitos terapêuticos quanto com os colaterais da trazodona (CACCIA *et al.*, 1981; GIJSMAN *et al.*, 1998).

Em adição à sua atividade serotoninérgica, a mCPP também causa uma elevação dose-dependente de ACTH, cortisol, prolactina, aumento da temperatura corporal, diminuição da ingestão de alimentos e aumento das medidas de ansiedade, efeitos esses observados tanto em humanos como em animais (COWEN *et al.*, 1995; KAHN *et al.*, 1990; GIBSON *et al.*, 1994; COWEN *et al.*, 1995).

2.2. Toxicocinética

Após administração de dose única intravenosa (0,1 mg/kg) e oral (0,5 mg/kg) de mCPP em 8 mulheres e 6 homens, GIJSMAN *et al.* (1998) demonstrou que existe uma grande variabilidade nos parâmetros farmacocinéticos. A biodisponibilidade oral variou de 14 a 108%, o *clearance* intravenoso de 12 a 92 mL/h, o $t_{1/2}$ de 2 a 12 h (intravenoso e oral) e o $C_{m\acute{a}x}$ de 8-132 ng/mL (oral) e 12-144 ng/mL (intravenoso). Os efeitos fisiológicos e subjetivos atingiram valor máximo entre 1 a 2 horas após administração oral, durando de 4 a 8 horas. De acordo com FEUCHTL *et al.* (2004) que também encontrou uma variabilidade semelhante na disposição cinética da mCPP, esse fato não pode ser explicado pela variação genética da CYP2D6, pois ela foi determinada em todos os voluntários. No entanto, BALDESSARINI (2006) demonstrou que a enzima CYP2C19 também participa da biotransformação da mCPP.

A mCPP apresenta metabolismo hepático, sendo o citocromo polimórfico P450 CYP2D6 a principal enzima envolvida em sua hidroxilação (ROTZINGER *et al.*, 1999) (Fig. 3). Como diversos outros fármacos também são biotransformados por essa enzima, metabolizadores lentos correm mais riscos em casos de interação de fármacos (PRITZKER *et al.*, 2002). As reações metabólicas de fase

dois são glicuronidação ou sulfatação, as quais levam à formação dos conjugados glicuronida e sulfato (STAACK *et al.*, 2003) (Fig. 3).

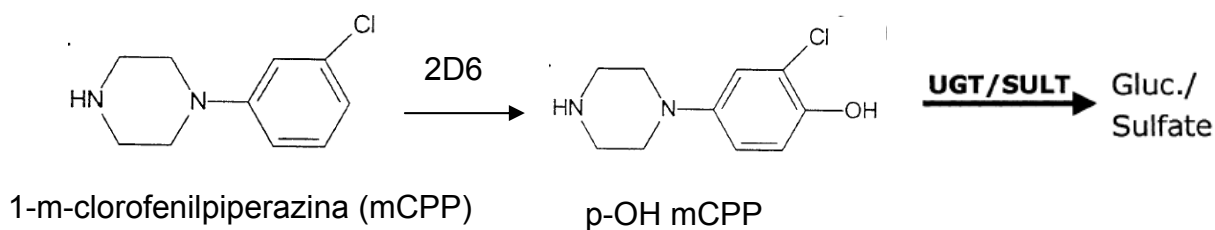


Figura 3. Via metabólica predominante na biotransformação hepática da mCPP.

2.3. Efeitos tóxicos

Em termos de efeitos tóxicos, pouco é conhecido sobre os efeitos da mCPP, seja a curto ou a longo prazo. Duas intoxicações envolvendo mCPP foram reportadas na Bélgica, uma das quais em um homem de 22 anos e que resultou em coma. Os sintomas que ocorreram após a ingestão oral de mCPP incluíram náusea, dor de cabeça, ansiedade, sintomas depressivos e agressividade. No entanto, como em ambos os casos relatados de intoxicações, outras substâncias psicoativas estavam presentes, havendo a possibilidade de que os sintomas relatados fossem correlacionados à essa associação (EUROPOL-EMCDDA, 2007). Casos de fatalidades devidas à trazodona também que sido reportadas na literatura (GOERINGER *et al.*, 2000; MARTÍNEZ *et al.*, 2005) e as análises toxicológicas sistemáticas de sangue *post-mortem* de um desses pacientes revelou a presença de 4900 ng/ml de trazodona e 600 ng/ml de mCPP (MARTÍNEZ *et al.*, 2005).

KOVALEVA *et al.* (2008) descreveram um caso de intoxicação, no qual a paciente havia ingerido três comprimidos contendo 90,9 mg de mCPP em um período de 5 horas, desenvolvendo o primeiro sintoma (náusea e sonolência) 30 minutos após tomar o terceiro comprimido. A concentração plasmática encontrada

de mCPP foi de 320 ng/mL. Apresentou também baixa concentração plasmática de anfetamina (40 ng/mL), etanol (0,7 g/L) e benzoilecgonina (47 ng/mL). O papel desses fármacos ou uma interação entre eles não pode ser excluída como uma explicação de sintomas como ansiedade, agitação, sonolência, rubor, alucinação visual e taquicardia nessa paciente. No entanto, parece que a atuação da mCPP prevaleceu no desenvolvimento da maior parte dos sintomas. A paciente inalou cocaína antes de tomar os três comprimidos (durante as 5 horas), sendo que os efeitos desse fármaco são rápidos (iniciam após 2 minutos, alcançando o pico em 20-30 minutos). As concentrações plasmáticas de anfetamina, benzoilecgonina e etanol encontravam-se baixas, enquanto que a de mCPP estava mais elevada do que aquela observada em estudos experimentais (KLASSEN *et al.*, 1998).

A mCPP vem sendo largamente encontrada em combinação com MDMA, mas os riscos dessa combinação à saúde não são conhecidos. Os efeitos alucinógenos e estimulantes da mCPP e de anfetaminas são similares no que diz respeito ao sistema serotoninérgico. A mCPP apresenta pouco efeito no sistema dopaminérgico e não apresenta atividades simpatomiméticas (MCCANN *et al.*, 1999). Os efeitos estimulantes do SNC, de anfetaminas e cocaína, resultam de sua habilidade para intensificar a liberação de norepinefrina e dopamina de terminais pré-sinápticos e inibir sua recaptação neuronal. Cocaína e anfetaminas também intensificam a neurotransmissão de serotonina, e a ingestão concomitante dessas dois fármacos ocasiona um aumento de risco do desenvolvimento de síndrome serotoninérgica. A eliminação metabólica da cocaína é mais rápida, fazendo com que duração da ação da cocaína seja menor em relação às anfetaminas. A meia-vida de eliminação varia de 8 a 30 horas para anfetaminas e de 0,5 a 1,5 horas, para cocaína (ELLENHORN *et al.*, 2006). As anfetaminas são metabolizadas por N-dealquilação, desaminação oxidativa e, em

menor grau, por hidroxilação aromática pelo citocromo CYP2D6, o qual está envolvido na p-hidroxilação da mCPP (BERTILSSON *et al.*, 2002; ELLENHORN *et al.*, 2006).

Usuários de MDMA apresentam respostas comportamentais alteradas (lentidão cognitiva e resposta “eufórica”) após administração do mCPP (MCCANN *et al.*, 1999; TANCER & JOHANSON, 2001; TANCER and JOHANSON, 2003). Essa resposta eufórica ao mCPP também é reportada em usuários de cocaína (BUYDENS-BRANCHEY *et al.*, 1997) e álcool (BENKELFAT *et al.*, 1991). O uso concomitante de mCPP com álcool pode resultar em potencialização de efeitos depressivos no SNC (BENKELFAT *et al.*, 1991).

2.4. Serotonina, agonistas e antagonistas serotoninérgicos e resposta inflamatória.

A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) é um neurotransmissor, uma amina vasoativa liberada pelas plaquetas no local de inflamação e um imuno-modulador. É sintetizada e liberada na circulação por células cromafins da mucosa gástrica e intestinal, rapidamente capturada pelas plaquetas, onde pode ser encontrada em altas concentrações e em uma menor extensão pelos linfócitos e monócitos/macrófagos (MOSSNER & LESCH, 1998). Em condições inflamatórias tais como na trombose e isquemia, as plaquetas ativadas liberam 5-HT, acarretando um aumento de sua concentração local na área inflamada (MOSSNER & LESCH, 1998, BENEDICT, C. R. *et al.*, 1986). Em moléstias infecciosas causadas por bactérias Gram-negativas, o lipopolissacarídeo endotóxico (LPS) liberado pela bactéria também pode ativar a 5-HT contida nas plaquetas por um mecanismo direto. A liberação de LPS também acarreta uma

translocação de plaquetas ao tecido inflamado com um conseqüente aumento na concentração local de 5-HT. Portanto, a 5-HT, além de sua possível interação com células sanguíneas, interage com macrófagos do tecido inflamado.

O papel imunomodulatório da 5-HT com relação aos seus efeitos inibitórios ou estimulatório sobre células imune incluindo T, B e células NK e monócitos/macrófagos, tem sido bastante investigado (HELLSTRAND & HERMODSSON, 1993; YOUNG & MATTHEWS, 1995). No entanto, há poucos estudos sobre o efeito da 5-HT sobre a produção de citocinas por imunócitos humanos. Várias citocinas são mediadoras de moléstias infecciosas e inflamatórias. O balanço entre citocinas com propriedades pró-inflamatórias (por ex. TNF α e IL-1) e aquelas com propriedades anti-inflamatórias (IL-6, IL-10 e antagonista de receptor IL-1) é importante no controle da duração e gravidade de uma resposta inflamatória. A presença de 5-HT nos sítios inflamatórios sugere seu possível envolvimento no controle desse equilíbrio.

Estudos conduzidos por Kubera *et al.* (2000, 2005) para investigar os efeitos da 5-HT e de agonistas e antagonistas da 5-HT na produção de IFN- γ , IL-10, TNF- α e IL-6 por células presentes no sangue total estimulados com ativadores policlonais, mostraram que: (i) a 5-HT intracelular é necessária para a produção de IFN- γ , IL-10, TNF- α e IL-6; (ii) concentrações de 5-HT extracelulares acima dos valores séricos fisiológicos pode suprimir a produção de IFN- γ , TNF- α e IL-6; (iii) concentrações fisiológicas de 5-HT extracelulares diminui a produção de IFN- γ , que pode ser atribuído a estímulo de receptores 5-HT₂, mas não 5-HT_{1A}; (iv) concentrações fisiológicas de 5-HT extracelulares aumenta a produção de TNF- α e IL-6, que pode ser parcialmente atribuído pelo estímulo de receptores 5-HT_{2B}, mas não 5-HT_{2C}.

De acordo com Rajkumar et al., 2009, pesquisas mostram que a mCPP é um agonista dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, ao mesmo tempo em que atua como antagonista nos receptores 5-HT_{2B}, 5-HT₃ e 5-HT₇. No entanto, o fármaco apresentaria maior afinidade para os receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}. A atuação do fármaco no receptor 5-HT_{2A}, principalmente, poderia estar envolvida na modulação da síntese de citocinas, uma vez que esse receptor pode estar envolvido na indução de citocinas via serotonina.

2.5. Sistema Imunológico e Inflamação

Os seres humanos estão expostos a milhões de patógenos diariamente por meio de contato, ingestão e inalação, sendo que nossa capacidade de evitar uma infecção a partir desse contexto depende do nosso sistema imune, inato e adaptativo. As respostas adaptativas são de lento desenvolvimento em uma primeira exposição a um novo patógeno, visto que clones específicos de células T e B devem ser ativados e expandir, podendo ser necessários muitos dias para que o processo seja efetivo. Desta forma, em uma primeira exposição a um novo patógeno que tenha obtido sucesso na transposição das barreiras de proteção mais externas (pele e superfícies epiteliais), durante as primeiras e críticas horas depende-se essencialmente do sistema imune inato como uma primeira linha de defesa do organismo invadido.

O sistema imune inato apoia-se no reconhecimento de determinados tipos de moléculas que são comuns a muitos patógenos (imunoestimulantes patógeno-associados, ou IEAP) e ausentes no hospedeiro, os quais estimulam respostas imune inatas – a resposta inflamatória e a fagocitose, por neutrófilos e macrófagos – com capacidade de ocorrer rapidamente.

São encontrados IEAP de vários tipos. Por diferenças existentes entre o início do processo de tradução gênico em procariotos e eucariotos, por exemplo, qualquer peptídeo contendo formilmetionina em sua extremidade N-terminal é reconhecido como proveniente de origem bacteriana. Assim, os peptídeos contendo formil-metionina agem como potentes quimioatraentes de neutrófilos, que migram rapidamente em direção daqueles e englobam a bactéria que os está produzindo.

Ainda, a superfície externa de muitos microorganismos é composta por moléculas inexistentes em seus hospedeiros pluricelulares e, por conseguinte, tais moléculas também agem como imunoestimulantes. Nesta classe inclui-se a parede celular de peptideoglicano, o flagelo da bactéria, o lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias gram-negativas, ácidos teiônicos de gram-positivas e moléculas da parede celular dos fungos.

Tais IEAP geralmente ocorrem na superfície do patógeno em padrões repetitivos que são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento padrão, do hospedeiro. Estes incluem receptores solúveis no sangue e receptores ligados à membrana de superfície das células hospedeiras (membros da família de receptores *Toll-like*).

Em humanos existem por volta de 10 subtipos de TLRs, dos quais vários participam ativamente do reconhecimento imune inato de IEPA e são ativados em resposta a diferentes ligantes. Os TLRs são abundantes na superfície de macrófagos, de neutrófilos e de células que revestem os pulmões e o intestino. A ativação destes receptores de membrana estimula a expressão de moléculas que tanto iniciam uma resposta inflamatória quanto auxiliam na indução de respostas da imunidade adaptativas (ALBERTS *et al.*, 4ª Ed., 2004; ABBAS, 5ª, 2005).

A presença de substâncias reconhecidas como não próprias ao organismo ou de tecido hospedeiro lesado são os estímulos que comumente desencadeiam a resposta inflamatória. Múltiplos produtos das vias bioquímicas envolvidas (cascata do sistema complemento, da coagulação e de quininas) alteram a permeabilidade vascular e o tônus vasomotor dos locais de injúria, bem como atraem leucócitos para estas regiões (CONE, 2001). Após a resposta inicial, com produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios (TNF- α e IL-1 β) e citocinas quimioatraentes pela população de macrófagos ativados, o processo mais crítico é a interação leucócito-endotélio (PARENTE et al., 1999).

O recrutamento leucocitário envolve uma série de interações com o endotélio vascular. A interação inicial envolve a marginação e *rolling* ao longo da superfície endotelial. Este processo é mediado, predominantemente, por selectinas, moléculas de adesão expressas tanto nos leucócitos (L-selectina) quanto nas células endoteliais (P- e E-selectina). O *rolling* leucocitário serve como um pré-requisito para a subsequente firme adesão dos leucócitos ao endotélio vascular. A adesão é, principalmente, mediada por interações das integrinas leucocitárias (β_1 e β_2) com seus respectivos ligantes endoteliais (incluindo ICAM e VCAM). A interação intercelular é estabilizada pela ligação moléculas de PECAM-1 expressas tanto no leucócito quanto no endotélio e, ainda, PECAM-1 expressa na superfície leucocitária promove a migração direcional, mediada por quimiocinas, para o sítio inflamatório (WU et al., 2005; PRIVRATSKY, 210). Em seguida à estas etapas, o leucócito é capaz de transmigrar para dentro do tecido inflamado (HICKEY et al., 1998).

Um componente importante da resposta imune inata inicial a vírus e bactérias é a produção e secreção de citocinas, proteínas secretadas por diversos tipos celulares do sistema imune, e que são mediadoras de muitas funções

efetoras da imunidade, tanto inata quanto adaptativa. Em infecções bacterianas, os macrófagos respondem às endotoxinas e a outros produtos bacterianos mediante a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1, principalmente) e quimiocinas. O TNF- α e a IL-1 atuam sobre o endotélio vascular no local da infecção para induzir a expressão de moléculas de adesão promotoras de uma ligação estável entre leucócitos e células endoteliais locais, enquanto que quimiocinas, produzidas pelos macrófagos, estimulam o extravasamento de leucócitos para a infecção. Dessa forma, ocorre a organização de uma reação imune inata visando a eliminação do patógeno invasor.

As mesmas respostas inflamatórias que são eficientes no controle local de infecções podem, no entanto, ser nocivas ao organismo se ocorrerem em uma infecção disseminada na corrente sanguínea – condição denominada sepse. A liberação sistêmica de moléculas de sinalização pró-inflamatória no sangue causa a dilatação dos vasos sanguíneos, perda do volume plasmático e coagulação sanguínea generalizada, levando ao quadro de choque séptico (BONE *et al.*, 1997; ALBERTS *et al.*, 4^a Ed., 2004).

2.6. Neutrófilo

A imunidade inata fornece uma primeira linha de defesa crítica em resposta a patógenos invasores. Em particular, os neutrófilos desempenham um importante papel na contenção da expansão e disseminação de infecções bacterianas e virais. No entanto, em muitas doenças inflamatórias, o acúmulo e a ativação de neutrófilos no tecido desencadeiam efeitos nocivos; portanto, sua produção controlada, mobilização e subsequente *clearance* constituem uma série de eventos finamente regulados. Sua função efetora é a fagocitose no local de inflamação, ao final da qual há rápida indução à apoptose, sendo o *clearance* de

seus restos celulares primordial na resolução da inflamação (Anabela Mota Pinto, 1ª. Ed., 2007; FURZE&RANKIN, 2008).

Os neutrófilos são leucócitos granulocíticos polimorfonucleares abundantes, perfazendo de 50 a 70% do total de leucócitos circulantes, e apresentam período de vida curto, de 6 a 10 horas. Quando infiltrado no tecido inflamado, sua meia-vida é muito aumentada: 20 horas após o início da reação inflamatória, um grande número dessas células ainda pode ser encontrado no local. O *turnover* neutrofílico é rápido, sendo que aproximadamente 10^9 células/kg de massa corporal deixam a medula por dia em humanos. A produção de neutrófilos pela medula óssea é, em média, de $1-2 \times 10^{11}$ células por dia em humanos saudáveis, as quais, ainda na medula óssea, passam por processo de diferenciação a partir de células progenitoras mielóides. Sua proliferação, diferenciação e consequente liberação para a circulação são processos submetidos à regulação por meio de diversas citocinas hematopoiéticas. Dentre elas, o fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) desempenha papel principal na proliferação e sobrevivência dos neutrófilos, tendo importância destacada durante processos inflamatórios ou infecciosos, em que é necessário aumento de neutrófilos nos compartimentos circulante e periférico. Um extenso estoque de neutrófilos, já maduros ou em estágio de maturação, é mantido na medula óssea (a reserva da medula óssea), os quais podem ser rapidamente mobilizados durante um episódio inflamatório ou infeccioso, resultando em destacado aumento de neutrófilos circulantes. A interação da quimiocina SFD-1 (*stromal derived factor-1*) com o receptor CXCR4 desempenha papel primordial para esta retenção de neutrófilos na medula óssea (YAMASHIRO *et al.*, 2001 FURZE&RANKIN, 2008; VON VIETINGHOFF & LEY, 2010).

Neutrófilos maduros diferenciam-se dos demais granulócitos por apresentarem núcleos multilobulados e grânulos citoplasmáticos específicos – azurófilos (primários), específicos (secundários), de gelatinase (terciários) e vesículas secretoras. Os grânulos azurófilos contêm, em geral, muitos componentes antimicrobianos e estão ligados à atividade fagocitária das células neutrofílicas. Dentre seus principais constituintes destaca-se a enzima mieloperoxidase (MPO), proteína catalizadora de produtos do *burst* respiratório (clorito e peróxido de hidrogênio) em hipoclorito, que corresponde a 5% do peso seco da célula, confere a coloração esverdeada ao exsudato purulento produzido durante o processo inflamatório, e pode ser utilizada como um marcador para localização e quantificação de neutrófilos presentes no tecido. Nos grânulos específicos encontram-se, além de componentes relacionados à fagocitose de microorganismos, receptores de membrana importantes para o desempenho das funções celulares na resposta imune inata, bem como componentes capazes de modificar o processo inflamatório a partir de alterações na quimiotaxia e na adesão celular. Como componentes dos grânulos terciários e das vesículas secretoras, destacam-se diversos tipos de receptores de membrana importantes para a efetividade das atividades neutrofílicas (GREER, FOERSTER & LUKENS, 11ª Ed., 2003).

O neutrófilo é o primeiro tipo celular a ser rapidamente recrutado, através de moléculas quimioatraentes, para o local de inflamação causada por microorganismos, constituindo a principal célula do infiltrado inflamatório de fase aguda. No processo de recrutamento para o tecido inflamado os neutrófilos são submetidos à refinadamente controlada cascata de eventos de marginação, interação com o endotélio e transmigração através deste, conforme descrito no item 2.5. Neste processo, o endotélio ativado produz mediadores que ativam a

célula neutrofílica, aumentando sua capacidade fagocítica e de disseminação no tecido-alvo. Dentro dos tecidos, os neutrófilos ativados fagocitam e erradicam microorganismos invasores através de mecanismos oxidativos (produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que resultam no *burst oxidativo*) e não oxidativos (liberação de moléculas, proteínas e proteases com atividade antimicrobiana) (FARSKY&MELLO, 1995; ALVES-FILHO *et al.*, 2005; SILLIMAN *et al.*, 2010; BORREGAARD, 2010).

Os neutrófilos ativados são também biosinteticamente ativos e, em resposta à estresses (fisiológicos ou estímulo inflamatório, por exemplo), sintetizam e liberam uma variedade de mediadores inflamatórios – como citocinas, quimiocinas e óxido nítrico – que são conhecidos por desempenharem papel crucial no processo inflamatório (YAMASHIRO, 2001; KASAMA, 2005; SILLIMAN, 2010).

O TNF- α está centralmente envolvido na resposta imune aguda à infecções e injúria tecidual, sendo secretado nestas situações, dentre outros tipos celulares, por neutrófilos. Nessas condições, TNF- α induz a expressão de moléculas de adesão – ICAM, E-selectina e VCAM-1, no endotélio, e L-selectina, no neutrófilo – e quimiotaxia dos neutrófilos, além de aumentar a liberação do arsenal microbiano em resposta ao estímulo inicial (GIBBS *et al.*, 1990; KASAMA *et al.*, 2005).

A citocina IL-1, que compreende IL-1 α e IL-1 β , consiste em um mediador pró-inflamatório importante na defesa do hospedeiro por exercer múltiplos efeitos durante a resposta imune e inflamatória. IL-1 β é significativamente secretada por neutrófilos frente a um estímulo inflamatório (LPS, por exemplo), desempenhando papel crucial na indução da expressão de moléculas de adesão na superfície endotelial (ICAM, P-selectina e VCAM-1) e leucocitária (L-selectina) e, portanto,

no estímulo ao recrutamento de leucócitos (KASAMA *et al.*, 2005; CHING *et al.*, 2005)

Os efeitos da IL-10 são importantes na regulação da resposta inflamatória, pois inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias em neutrófilos, como IL-1 β e TNF- α , e moléculas quimiotáticas, ao passo que estimula a expressão de proteínas anti-inflamatórias, como antagonista de receptor IL-1 (IL-1ra). Dessa forma, por interferir nos processos de *rolling* e aderência do neutrófilo ao endotélio, a IL-10 pode inibir o processo de recrutamento e transmigração através do endotélio (HICKEY *et al.*, 1998; KASAMA *et al.*, 2005).

O NO é produzido e secretado por diversos tipos celulares do sistema imune, apresentando alvos de variadas naturezas e, assim, desempenha importante e diversificado papel na imunidade e em processos inflamatórios e infecciosos. Notadamente, o NO regula negativamente a expressão endotelial de moléculas de adesão (VCAM-1, ICAM-1, E- e P-selectina), sendo esta modulação de extensão variada, enquanto que em neutrófilos, o NO pode inibir a expressão e/ou função de integrinas. O NO inibe a aderência de neutrófilos ao endotélio, influenciando a resposta leucocitária quimiotática através de vários mecanismos, como por exemplo, através da produção ou inibição da atividade de quimiocinas específicas (BOGDAN, 2001).

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da mCPP, *in vivo*, sobre a mobilização leucocitária, desde a medula óssea até o foco de lesão, em ratos Wistar machos, e os efeitos da mCPP, *in vitro*, sobre funções e mecanismos relacionados à migração neutrofílica, presentes em processos inflamatórios.

3.2. Objetivos Específicos

No desenvolvimento do projeto, foram investigados, *in vivo*:

- O número total de células nucleadas da medula óssea, em presença e em ausência de estímulo inflamatório;
- O número total e diferencial de leucócitos circulantes e de leucócitos presentes do exsudato peritoneal, em presença e em ausência de estímulo inflamatório;
- A atividade da mieloperoxidase em tecidos de fígado, baço e pulmões, em presença e em ausência de estímulo inflamatório;
- A quantidade de cortisona circulante, em presença e em ausência de estímulo inflamatório, frente a antagonista de receptores de glicocorticoides.

Complementarmente, *in vitro*, investigamos:

- A migração neutrofílica;
- A aderência do neutrófilo ao endotélio;
- A expressão de moléculas de adesão em neutrófilos (L-selectina, β_2 -Integrina, PECAM);

- A concentração de mediadores inflamatórios, em sobrenadante de cultura de neutrófilos (NO, TNF- α , IL-1 β e IL-10).

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Fármacos, reagentes e substâncias biológicas

A massa de 100 mg do fármaco meta-clorofenilpiperazina (mCPP) foi doado pelo MSc. Rafael Lanaro, do Centro de Controle de Intoxicação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (CCI-FCM/UNICAMP) (em anexo).

A Mifepristona (RU38486) 98%, o Glicogênio de Ostra (Tipo II), o Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (sorotipo 026:B6, 1 mg/mL) e o N-formil-Metil-Leucil-Fenilalanina (fMLP) foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA).

Ambos os anestésicos, xilazina e cetamina foram provenientes da Syntec[®] (Hortolândia, SP, Brasil) e o anticoagulante heparina, da Roche Químicos e Farmacêuticos S.A. (Brasil).

Os anticorpos monoclonais anti moléculas de adesão (anti-CD62L marcado com FITC (L-selectina); anti-CD18 marcado com FITC (β 2-Integrina) e anti-CD31 marcado com PECAM-1) foram obtidos da Southern Biotechnology Associates (San Diego, CA, EUA).

Os corantes May-Grünwald-Giemsa e Giemsa foram adquiridos da Merck & Co (NJ, EUA), enquanto que o kit de corantes Panótico Rápido foi obtido da IB Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda (Pinhais, PR, BR).

Os filtros de éster celulose 0,25 μ m foram obtidos da Millipore (SP, Brasil).

O meio de cultura RPMI 1640 foi adquirido da GIBCO[®] (Grand Island, NY, EUA) e o soro fetal bovino (SFB), da Gibco-BRL (MD, USA).

4.2. Animais

Foram empregados ratos Wistar machos, com peso entre 180 e 220g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições normais de biotério até o início dos experimentos, com livre acesso à ração e água. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, Protocolo nº 233, data: 13/07/2009). A eutanásia e os procedimentos experimentais foram conduzidos em animais anestesiados por via subcutânea com uma solução de cetamina (20 mg/kg) associada à xilazina (2 mg/kg) em uma proporção 2:1 (v:v).

4.3. Ensaios *in vivo*

4.3.1. Delineamento Experimental

Para os ensaios de mobilização de células nucleadas na medula óssea, quantificação de leucócitos no sangue circulante e no exsudato peritoneal, bem como da atividade tecidual da mieloperoxidase, os animais foram separados ao acaso em 4 grupos; 2 receberam mCPP (1 mg/kg, via oral) enquanto que os animais controle, solução salina 0,9%. Após 1 hora, todos os grupos foram desafiados ou não com estímulo inflamatório LPS (1 ml de solução, 1 mg/ml, via i.p.), conforme esquema ilustrado na Figura 4a. Seguidas 4 horas após a última administração, todos os animais foram anestesiados e eutanasiados por exsanguinação.

Para o ensaio de quantificação de cortisona, como representado pela Figura 4b, os animais foram separados ao acaso em 2 grupos: RU38486 e

veículo, cada um deles subdividido em 4 subgrupos. Os animais do grupo RU38486 foram previamente tratados com 2 injeções de 400 µl (5 mg/ml) desse antagonista, com 18h de intervalo entre as administrações, via i.p., enquanto que os animais do grupo veículo foram tratados com 2 injeções de uma mistura de solução salina 0,9%, carboximetilcelulose, etanol e Tween 20, com 18h de intervalo entre as administrações, via i.p. . A seguir, os animais de ambos os grupos foram tratados com solução de mCPP (1 mg/kg via oral) ou com 1 ml de solução salina 0,9%, via i.p., e, após 1 hora, desafiados ou não com estímulo inflamatório LPS (1 ml de solução, 1 mg/ml, via i.p.).

A-)

CONTROLE	BASAL	
	LPS	
mCPP	BASAL	
	LPS	

B-)

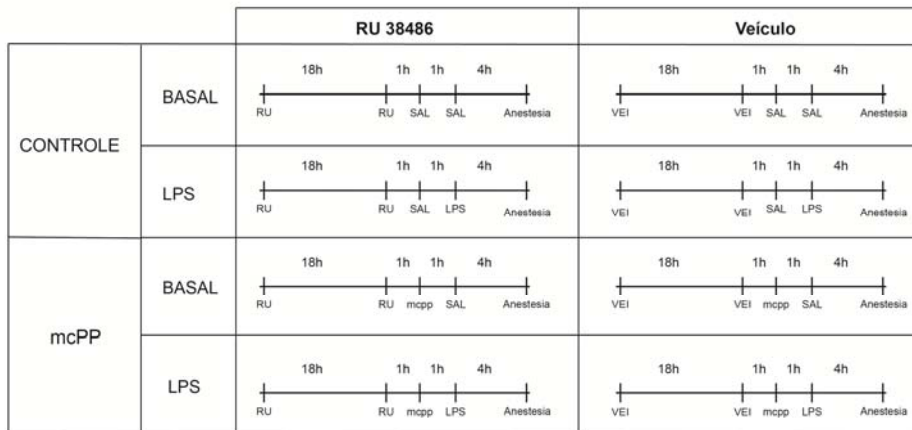


Figura 4. Esquema de tratamento empregado nos ensaios *in vivo* (A) Esquema de tratamento empregado nos ensaios de quantificação de células nucleadas na medula óssea, de leucócitos circulantes e de leucócitos no exsudato peritoneal; (B) Esquema de tratamento empregado no ensaio de quantificação de cortisona sérica.

4.3.2. Determinação do número de leucócitos no sangue circulante

Após a anestesia dos animais, cerca de 1,5 ml de sangue heparinizados foi obtido do plexo orbital, com auxílio de pipeta Pasteur de vidro. A quantificação total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se solução de Turk, e a quantificação diferencial, em esfregaços corados pelo método May-Grümwald-Giemsa.

4.3.3. Determinação do número de leucócitos no exsudato peritoneal

Após a anestesia e coleta de sangue do plexo orbital, os animais foram exsanguinados pela secção da artéria carótida e 10 ml de solução de PBS foram injetados na cavidade peritoneal. Após suave massagem, essa cavidade foi aberta cirurgicamente e o exsudato peritoneal foi coletado com auxílio de pipeta Pasteur e transferido para tubos Falcon. A seguir, a suspensão de células foi centrifugada (10 minutos, à 600G e 4°C) e os sobrenadantes, removidos

cuidadosamente e armazenados à -80°C . Os pellets formados no fundo dos tubos foram ressuspensos em 1 ml de PBS. A quantificação total dos leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se solução de Turk, e a quantificação diferencial, em esfregaços corados pelo método May-Grümwald-Giemsa.

4.3.4. Determinação do número de células nucleadas na medula óssea

Após a eutanásia, os fêmures direitos dos animais foram retirados, lavados em PBS e limpos com gaze. A seguir, com auxílio de uma agulha, as cavidades femorais foram perfundidas com 10ml de PBS; amostras do tecido medular foram coletadas em tubo Falcon, centrifugadas (10 minutos, à 600G e 4°C) e os sobrenadantes, armazenados à -80°C . Os pellets formados no fundo dos tubos foram ressuspensos em 1 mL de PBS. A quantificação total dos leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se solução de Türk, e a quantificação diferencial, em esfregaços corados pelo método May-Grümwald-Giemsa.

4.3.5. Medida da atividade tecidual de mieloperoxidase (MPO) em tecido pulmonar, hepático e do baço

Após a eutanásia, o fígado, baço e pulmão dos animais foram removidos, com auxílio de material cirúrgico, e imediatamente armazenados em freezer (-80°C), para posterior medida da atividade tecidual de mieloperoxidase.

A migração de neutrófilos circulantes para os tecidos pulmonar, hepático e do baço, foi estimada pela quantificação da atividade de MPO tecidual, cuja medida baseia-se na velocidade de oxidação do substrato o-dianisidina na

presença de peróxido de hidrogênio, evidenciado pela alteração de absorvância medida a 460 nm (Bradley et al., 1982). As amostras dos tecidos foram pesadas, adicionadas de solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB; 0,5%) em tampão fosfato de potássio pH 6 na proporção de 1 mL de tampão para cada 50 mg de tecido. A seguir, as amostras foram homogeneizadas em homogeneizador de tecido, agitadas em ultrassom por 30 segundos, centrifugadas, aquecidas em banho-maria a 60 °C durante duas horas para inibição da enzima catalase e novamente centrifugadas (2 minutos, 10.000G). Em microplaca, 10 µl dos sobrenadantes foram acrescentados a 200 µl de solução contendo 16,7 mg/mL de o-dianisidina e 0,0005% de H₂O₂ em tampão fosfato 5 mM. A monitorização da velocidade de formação do produto de oxidação da o-dianisidina foi realizada registrando-se o aumento da absorvância da mistura a 460 nm, por meio de leituras coletadas em intervalos de 10 segundos, durante 10 minutos. A atividade de MPO foi calculada a partir da velocidade máxima da reação por segundo e o resultado foi expresso em UMPO/mg de tecido. Uma unidade de MPO foi definida como a quantidade de H₂O₂ (em µmol) degradada por minuto.

4.3.6. Quantificação da concentração de cortisona sérica

Os animais foram anestesiados para a coleta de 5,0 ml de sangue da artéria aorta abdominal, em tubos Falcon. A seguir, as amostras de sangue foram centrifugadas (10 minutos, 600G e 4°C) e o sobrenadante (soro) armazenado em freezer (-80°C).

A concentração sérica de cortisona circulante foi quantificada utilizando-se kit comercial (Cayman[®]) e seguindo-se as especificações e metodologia fornecidas pelo fabricante.

4.4. Ensaios *in vitro*

4.4.1. Obtenção de neutrófilos migrados para o exsudato peritoneal

Os animais foram anestesiados e 10 ml de solução de glicogênio de ostra 1% (em PBS estéril) foram injetados no peritônio de cada animal, induzindo um processo inflamatório e extravasamento de neutrófilos para o local inoculado. Após 4 horas, os animais foram novamente anestesiados e exsanguinados pela secção da artéria carótida. A pele do abdome foi cortada e injetou-se 10 ml de PBS estéril na cavidade peritoneal. O local foi suavemente massageado, a cavidade peritoneal foi aberta cirurgicamente e, com auxílio da pipeta Pasteur, coletou-se o exsudato produzido no local, armazenando as amostras em tubo Falcon. A seguir, a suspensão de células foi centrifugada (600G, 4°C, 10 – 15 minutos), os sobrenadantes descartados e os pellets ressuspensos em 1 ml de solução de Hanks estéril acrescida de 0,1% de BSA, ou em 1 ml de meio R10, e quantificados em câmara de Neubauer.

4.4.2. Obtenção de células endoteliais

As células endoteliais foram obtidas a partir do músculo cremáster de ratos, e o preparo da cultura celular foi realizado conforme previamente descrito por Chen *et al.* (1995) e modificado por Lotufo *et al.* (2001).

Após a eutanásia e assepsia dos animais, o músculo cremáster foi removido com auxílio de material cirúrgico autoclavado, lavado em PBS estéril e cortado em pequenos quadrados (2x2 mm), em fluxo laminar. Em seguida, foram adicionados dois desses pequenos cortes a cada poço de uma placa de cultura (24 poços). Cuidadosamente, foram adicionados 600 µl de meio de cultura estéril (DMEM contendo 20% de soro fetal bovino e 40 mg/l de gentamicina). A placa foi incubada por 48 horas em estufa de CO₂ (5%), em atmosfera úmida, e, após esse

período os fragmentos de tecido foram removidos e acrescentou-se 200 µl do mesmo meio de cultura anteriormente empregado. A placa foi novamente incubada, sendo realizada a troca do meio de cultura a cada dois dias, até que as células se encontrassem confluentes. Quando houve confluência, foi realizado repique e as células foram transferidas para uma placa de 96 poços. Dois dias após o repique, as células encontravam-se confluentes e ideais para serem empregadas no ensaio de aderência neutrófilo-endotélio (item 4.4.4.).

4.4.3. Quimiotaxia de neutrófilos – Câmara de Boyden

Para avaliar os efeitos da mCPP sobre a quimiotaxia de neutrófilos coletados da cavidade peritoneal de ratos Wistar, foi empregado o modelo de câmara de Boyden, conforme previamente descrito por Boyden (1962) e modificado por Zigmond & Hirsch (1973).

Alíquotas da suspensão celular contendo $2,5 \times 10^6$ neutrófilos (coletados do exsudato peritoneal) previamente tratados com as concentrações de 10 µM, 100 µM e 1000 µM de mCPP (Hwang *et al.*, 2008) foram acondicionados ao compartimento superior da câmara, sendo separadas do compartimento inferior por membranas de policarbonato com poros de 8 µM (Millipore[®], Billerica, USA). A migração neutrofílica foi estimulada preenchendo-se o compartimento inferior da câmara com o agente quimiotático fMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine), 10^{-8} M. A seguir, a câmara foi incubada, a 37°C, por 2 horas e, após esse período, os filtros foram removidos, corados e mantidos em *overnight* no xilol. A distância percorrida pelas células neutrofílicas pelo filtro foi quantificada por microscopia ótica (GOUWY *et al.*, 2009; MANTOBA *et al.*, 2010).

4.4.4. Ensaio de Aderência neutrófilo-endotélio

As células endoteliais confluentes, obtidas conforme descrito no item 4.4.2., foram ativadas com 100 µl de LPS (5 µg/ml) e incubadas à 37°C por quatro horas.

Paralelamente, em tubos de citometria foram acrescentados volumes de exsudato peritoneal correspondentes a $2,0 \times 10^6$ neutrófilos/tubo. As células neutrofílicas foram tratadas com mCPP nas concentrações de 10 µM, 100 µM e 1000 µM, e incubadas durante 1 hora, à 37°C. Após esse período, foram lavadas com 1 ml de solução balanceada de Hanks, para que a mCPP não exercesse efeito direto sobre o endotélio mas apenas sobre os neutrófilos, e centrifugadas (por 10 minutos, à 600G e temperatura ambiente).

A execução desses procedimentos sucedeu de maneira que ambos pudessem ser finalizados simultaneamente. Após esse período, acrescentou-se $2,0 \times 10^5$ neutrófilos/poço da placa contendo a cultura de células endoteliais e incubou-se à 37°C. Após 30 minutos, a placa foi lavada com solução de Hanks, foram adicionados 100 µl/poço de Triton-X 1% e incubou-se à temperatura ambiente, por 15 minutos. Após esse período, foram acrescentados 100 µl/poço de cromógeno e incubou-se por mais 30 minutos à temperatura ambiente. Por fim, foram adicionados 50 µl/poço de H₂SO₄, com o intuito de interromper a reação. A absorbância foi lida em 450 nm, no espectrofotômetro, e foi realizado o cálculo da quantidade de neutrófilos aderidos ao tecido endotelial.

4.4.5. Quantificação das moléculas de adesão

O efeito da mCPP sobre a expressão das moléculas de adesão L-selectina, β2-integrina e PECAM-1 foi quantificado por citometria de fluxo.

Um total de $1,0 \times 10^6$ neutrófilos foram adicionados em tubos de citometria e lavados com 200 μl de solução balanceada de Hanks. Os tubos foram centrifugados (600G, 10 minutos, 4°C), os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* contendo neutrófilos foram ressuspensos em 100 μl de solução de Hanks, contendo ou não mCPP, nas concentrações de 10 μM , 100 μM e 1000 μM . Assim, as células foram incubadas durante 1 hora na presença ou ausência dos tratamentos com o fármaco. Após esse período, as células foram lavadas e centrifugadas nas mesmas condições anteriores, e então incubadas na presença ou ausência de fMLP (100 μL ; 10^{-6}M) à 37°C . Uma hora depois, as células foram novamente lavadas e centrifugadas, e posteriormente incubadas com 100 μL de anticorpos monoclonais anti-L-selectina, anti- β_2 -integrina ou anti-PECAM-1, anti-L-selectina (CD62L), anti- β_2 -integrina (CD18) ou anti-PECAM-1 (CD31) na diluição de 1:100, durante 20 minutos e à 4°C , na ausência de luz. Em seguida, as amostras foram acrescidas de paraformaldeído 2% e mantidas em geladeira (4°C) até o momento da leitura, para fixação das células avaliadas.

4.4.6. Quantificação de mediadores inflamatórios

Um total de $1,0 \times 10^6$ células neutrofilicas foram transferidas para cada poço de uma placa de cultura de 96 poços, pré-tratados com mCPP nas concentrações de 10 μM , 100 μM , 1000 μM , em ausência ou presença de LPS (2,5%) e o volume final ajustado para 300 μl com meio de cultura R10 (meio RPMI 1640 + 10% SFB). A placa foi incubada durante 18 horas em estufa de CO_2 (5%), em atmosfera úmida. Após esse período, os sobrenadantes foram recolhidos e mantidos à -20°C para a quantificação dos seguintes mediadores inflamatórios: TNF- α , IL-10, IL-1 β e NO.

A quantificação da concentração de citocinas foi realizada por ELISA, utilizando-se kits comerciais e em acordo com a metodologia fornecida pelo fabricante. Os protocolos dos ensaios podem ser observados no site da BDBioscience (www.bdbioscience.com) e da R&D System (<http://www.mdsystem.com>).

A quantificação da concentração de NO foi determinada a partir das concentrações de NO_2^- presentes no sobrenadante das culturas celulares, empregando-se a reação de Griess. Em resumo, 100 μl dos sobrenadantes das culturas celulares foram adicionados a 100 μl do reagente de Griess, preparado no momento do uso. Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, a absorbância de cada amostra foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 550 nm. A concentração de NO_2^- das amostras foi determinada a partir de uma curva padrão de NaNO_2 .

4.5. Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média \pm e.p.m. e analisados estatisticamente pelo Teste “t” de student ou pela Análise de Variância com comparações múltiplas (ANOVA), seguido do teste de Tukey-Kramer, quando necessário.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Efeitos da exposição *in vivo* à mCPP

5.1.1. Mobilização de células nucleadas da medula óssea e de leucócitos no sangue circulante

Como representado na Figura 5, a quantificação de células nucleadas na medula óssea e do número total de leucócitos circulantes, seja de células mononucleares (MN) como polimorfonucleares (PMN), não foi alterada frente ao tratamento com a mCPP, tanto na presença quanto na ausência de estímulo inflamatório com LPS.

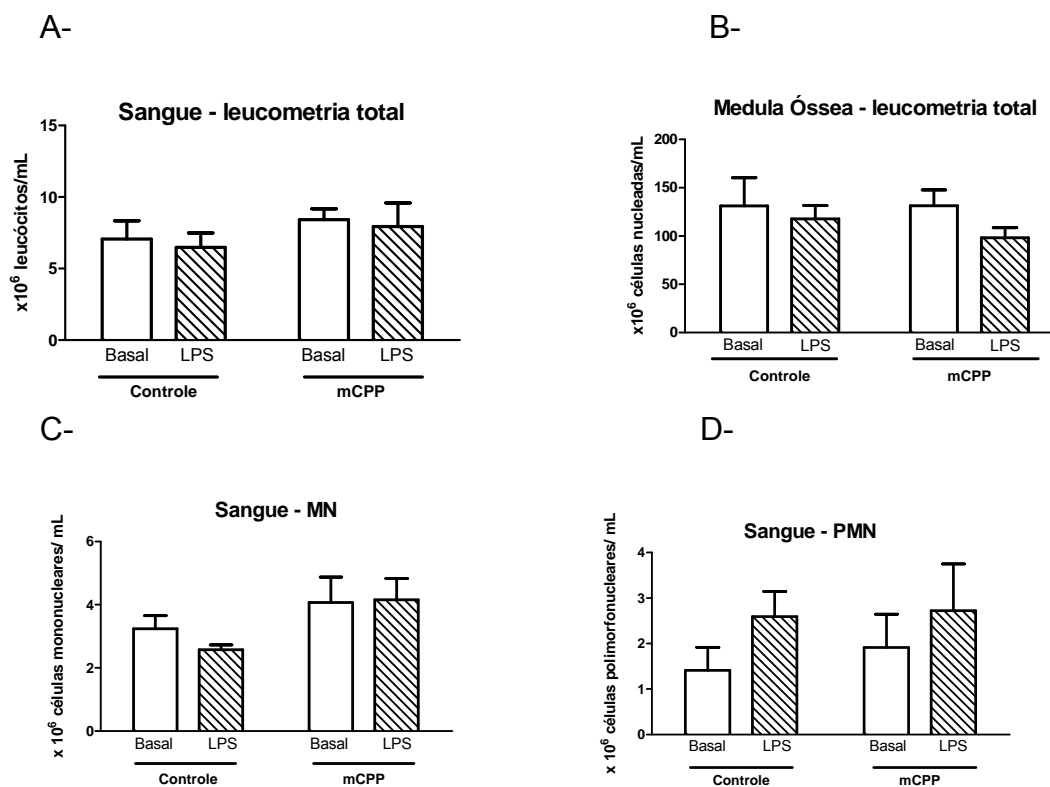


Figura 5. Efeitos da mCPP sobre a mobilização de células nucleadas da medula óssea e de leucócitos circulantes em ratos Wistar machos. Os animais foram expostos de forma aguda ao fármaco (1 mg/kg, via oral) ou solução salina NaCl 0,9% (grupo controle), em presença ou ausência de estímulo inflamatório (LPS, i.p.). A coleta do lavado femoral e do sangue circulante, através do plexo orbital, procedeu após 5 horas do tratamento com a mCPP, e 4 horas após o estímulo com LPS. Os resultados expressam: (A) a média de células nucleadas da medula óssea de 14 - 15 animais por grupo \pm e.p.m; (B) a média de leucócitos totais circulantes de 9 - 10 animais por grupo \pm e.p.m; (C) a média de leucócitos mononucleares circulantes de 9 - 10 animais por grupo \pm e.p.m.; (D) a média de leucócitos polimorfonucleares circulantes de 9 - 10 animais por grupo \pm e.p.m.

5.1.2. Mobilização de leucócitos no exsudato peritoneal

Os resultados apresentados na figura abaixo (Figura 6a) mostram que, em condições basais, a mCPP não alterou o número de leucócitos no exsudato peritoneal. No entanto, quando associado ao processo de peritonite induzido por LPS, o tratamento com a mCPP inibiu o influxo leucocitário para o foco da inflamação. Ainda, esse resultado foi acompanhado por uma diminuição no número de células polimorfonucleares, mas não de mononucleares e refletiram a diminuição do influxo de neutrófilos para o local (Figura 6c).

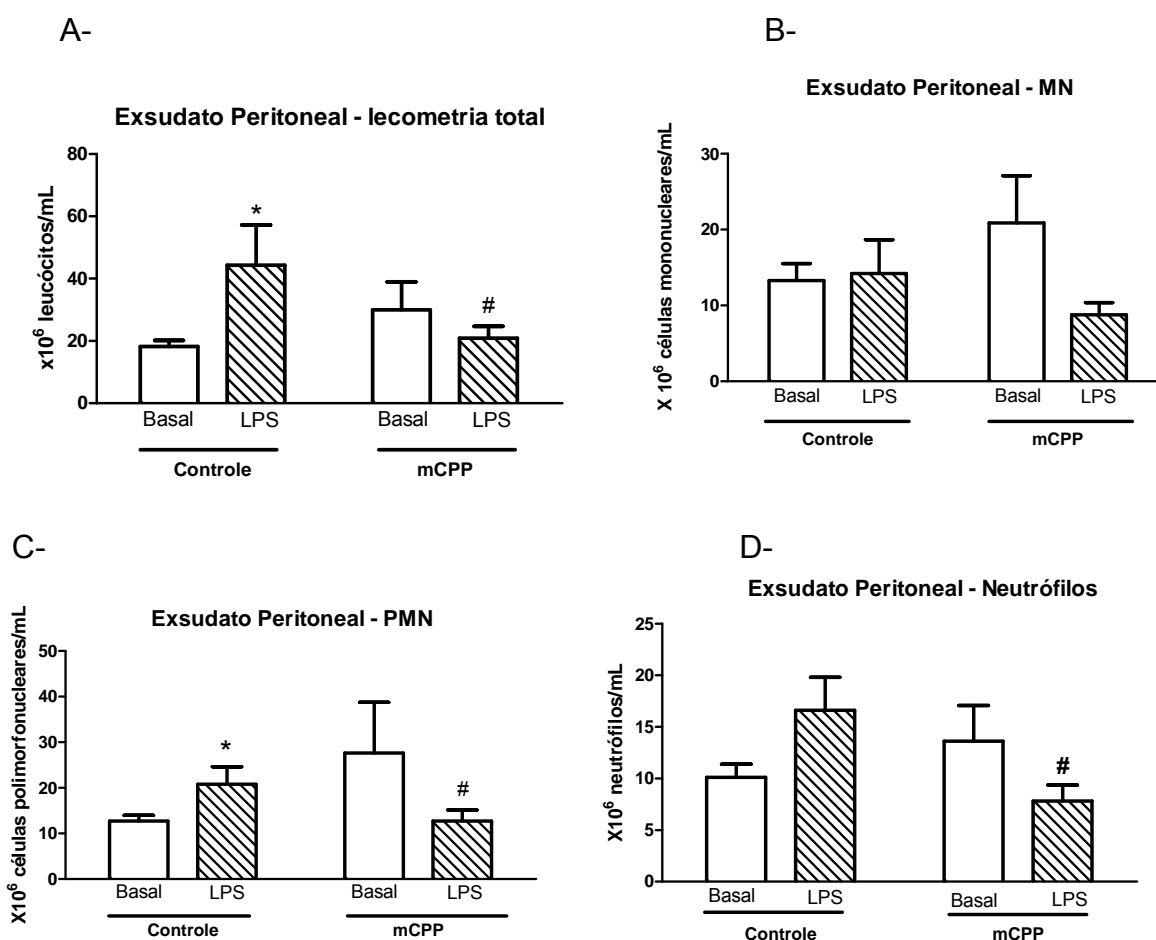


Figura 6. Efeitos da mCPP sobre o influxo de leucócitos no exsudato peritoneal de ratos Wistar machos. Os animais foram expostos de forma aguda ao fármaco (1 mg/kg, via oral) ou solução salina NaCl 0,9% (grupo controle), em presença ou ausência de estímulo inflamatório (LPS, i.p.). A coleta do exsudato peritoneal procedeu após 5 horas do tratamento com a mCPP, e 4 horas após o estímulo com LPS. Os resultados expressam: (A) a média de leucócitos totais de 17 animais por grupo \pm e.p.m (* $p < 0,05$ vs. controle basal; # $p < 0,05$ vs. controle LPS); (B) a média de leucócitos mononucleares de 17 animais por grupo \pm e.p.m; (C) a média de leucócitos polimorfonucleares de 17 animais por grupo \pm e.p.m (* $p < 0,05$ vs. controle basal; # $p < 0,05$ vs. controle LPS); (D) a média de neutrófilos de 17 animais por grupo \pm e.p.m (# $p < 0,05$ vs. controle LPS).

5.1.3. Atividade tecidual de mieloperoxidase (MPO) em tecido pulmonar, hepático e do baço

A quantificação da atividade da MPO em possíveis órgãos-alvo de migração de leucócitos e *clearance* de células neutrofílicas, demonstrou intenso influxo neutrofílico nos pulmões frente ao estímulo com LPS para o grupo de animais tratados com a mCPP, o mesmo sendo observado nas condições basais (Figura 7A); entretanto, não alterou significativamente a atividade desta enzima no baço (Figura 7B), ou no fígado (Figura 7C), tanto em condições basais quanto na vigência de inflamação.

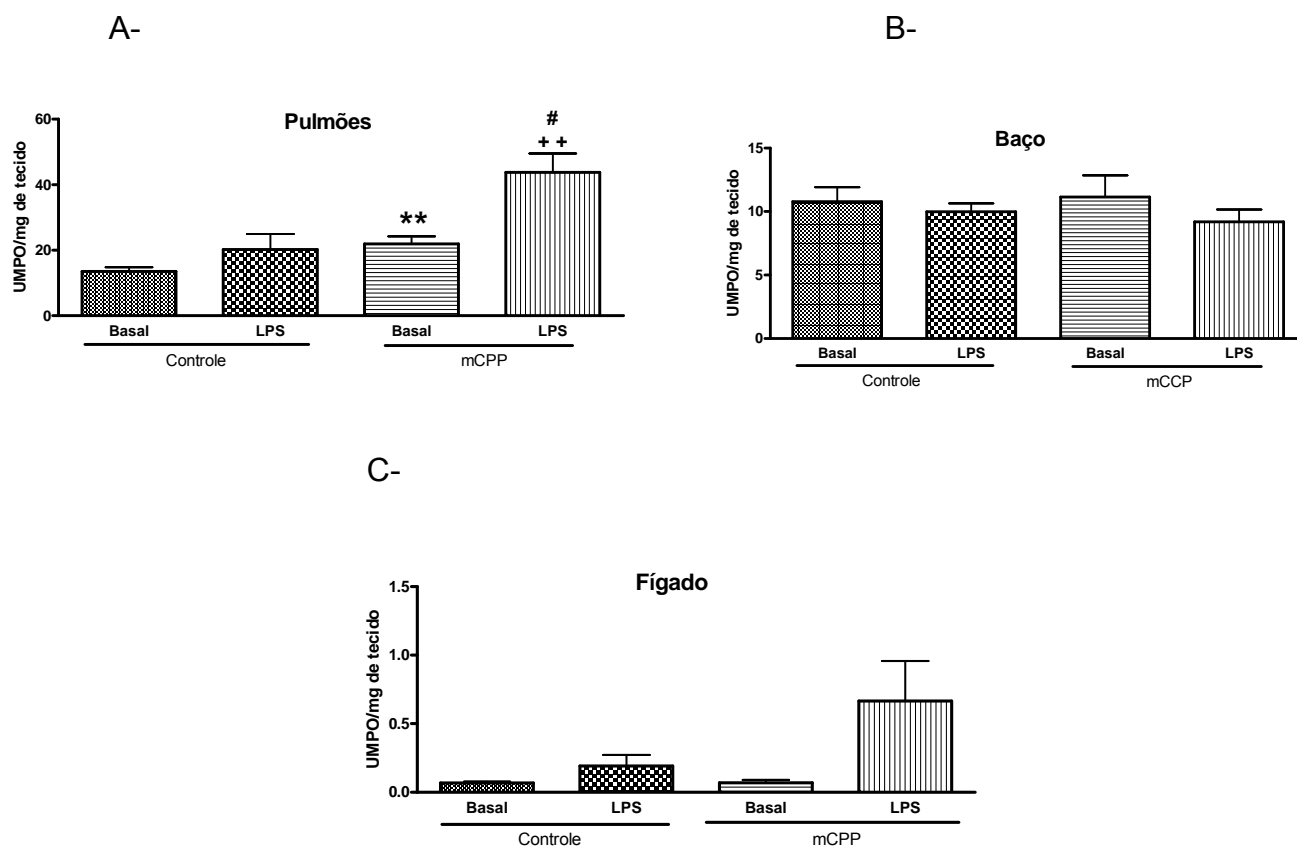


Figura 7. Efeitos da mCPP sobre a atividade da mieloperoxidase em fígado, baço e pulmões de ratos Wistar machos. Os animais foram expostos de forma aguda ao fármaco (1 mg/kg, via oral) ou solução salina NaCl 0,9% (grupo controle), em presença ou ausência de estímulo inflamatório (LPS, i.p.). A coleta dos órgãos procedeu após 5 horas do tratamento com a mCPP, e 4 horas após o estímulo com LPS.

Os resultados expressam a média de 3-8 animais por grupo \pm e.p.m (** $p < 0,01$ vs. controle basal; + $p < 0,01$ vs. mCPP basal; # $p < 0,05$ vs. controle LPS).

5.1.4. Quantificação de cortisona circulante

A mCPP não alterou a concentração de cortisona no soro dos animais tratados com o fármaco, em presença ou ausência de estímulo com LPS, tanto em animais cujos receptores de glicocorticoides foram previamente antagonizados (RU38486; Figura 8A) quanto naqueles cujos receptores foram tratados com veículo (Figura 8B).

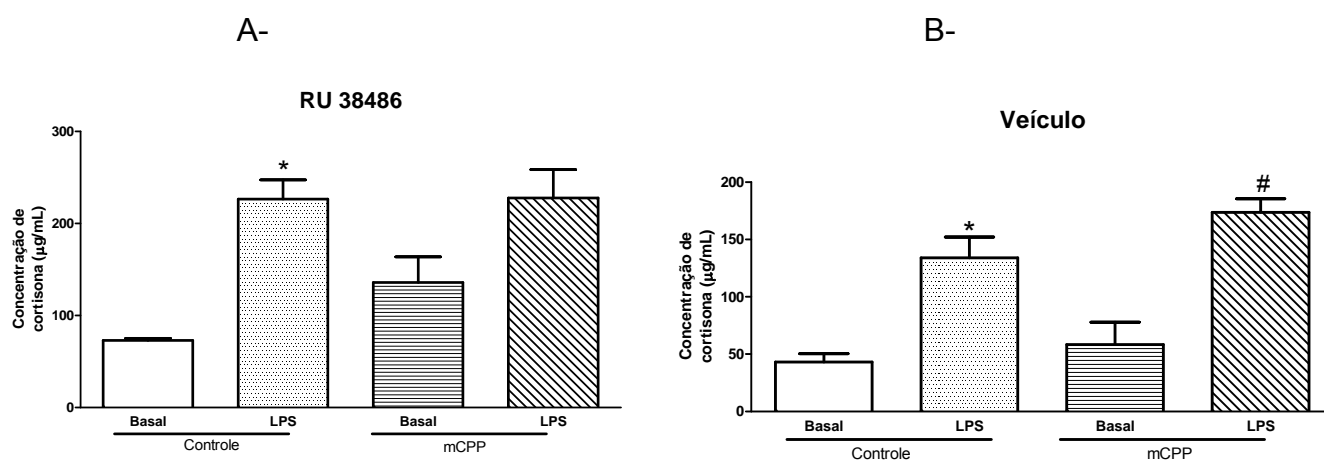


Figura 8. Efeitos da mCPP sobre a concentração de cortisona circulante. Os animais foram expostos de forma aguda ao fármaco (1 mg/kg, via oral) ou solução salina NaCl 0,9% (grupo controle), em presença ou ausência de estímulo inflamatório (LPS, i.p.), e tratados ou não com antagonista de receptores de glicocorticoides (RU38486). A coleta do sangue procedeu após 5 horas do tratamento com a mCPP, as amostras foram centrifugadas, o soro foi separado e mantido à -80°C. Posteriormente, a concentração de glicocorticoides foi realizada através de kit de ELISA, de acordo com especificações do fabricante. Os resultados expressam a média \pm e.p.m. da quantificação da concentração de cortisona em amostras de soro obtidas de 3 animais em cada grupo (* $p < 0,05$ vs. controle basal; # $p < 0,05$ vs. mCPP+LPS).

5.2. Efeitos da exposição in vitro à mCPP

5.2.1. Quimiotaxia de neutrófilos

A Figura 9 mostra que o tratamento com mCPP *per se* aumentou a migração dos neutrófilos através da membrana de policarbonato nas concentrações de 10µM e 100µM. Adicionalmente, nestas mesmas concentrações na presença de fMLP, houve aumento da migração dos neutrófilos. Na maior

concentração utilizada, de 1000 μ M, em condições basais, o fármaco não alterou a migração neutrofílica. Por outro lado, após estímulo com fMLP, os neutrófilos não responderam ao estímulo quimioatraente.

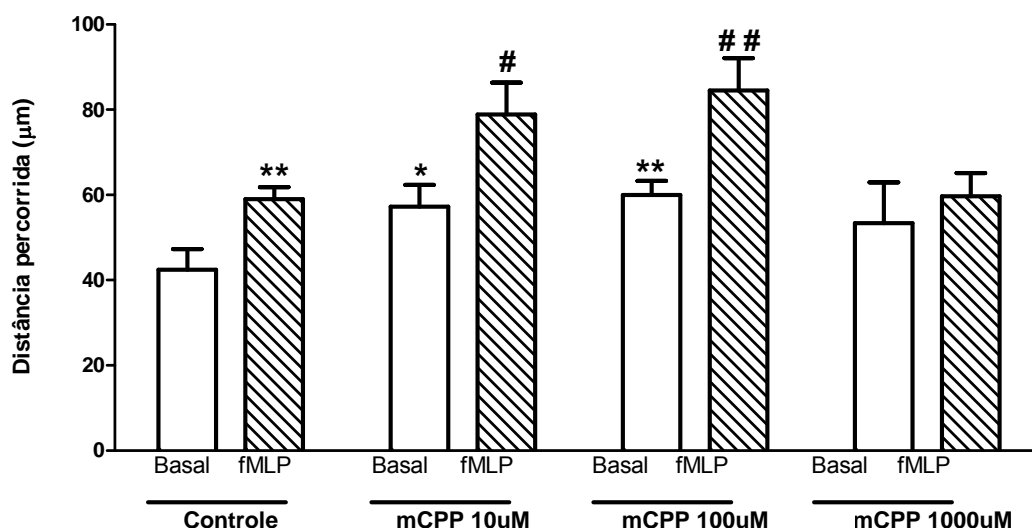


Figura 9. Efeitos da mCPP sobre a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*. Neutrófilos foram coletados da cavidade peritoneal de ratos Wistar machos 4 horas após a injeção de 10 ml de solução de glicogênio de ostra 1%. A quimiotaxia de neutrófilos foi realizada em Câmara de Boyden frente a fMLP (10^{-8} M). Os neutrófilos ($2,5 \times 10^6$) foram incubados na presença de mCPP em diferentes concentrações (10, 100 e 1000 μ M) e o sistema foi mantido a 37 °C por um período de 2 horas. A distância percorrida pelos neutrófilos no interior dos filtros presentes na Câmara de Boyden foi quantificada por microscopia ótica. Os resultados expressam a média \pm e.p.m. das distâncias percorridas por células neutrofílicas obtidas de 9 animais em cada grupo (*p < 0,05 vs. controle basal; **p < 0,01 vs. controle basal; #p < 0,05 vs. controle basal; ##p < 0,01 vs. controle basal).

5.2.2. Aderência neutrófilo-endotélio

Os resultados mostram que, apesar de a mCPP não alterar a porcentagem de adesão neutrófilo-endotélio em condições basais, em vigência do estímulo inflamatório com LPS (Figura 10), a mCPP aumenta a porcentagem de células neutrofílicas aderidas ao endotélio nas três concentrações empregadas (10, 100 ou 1000 μ M), em relação ao respectivo controle estimulado.

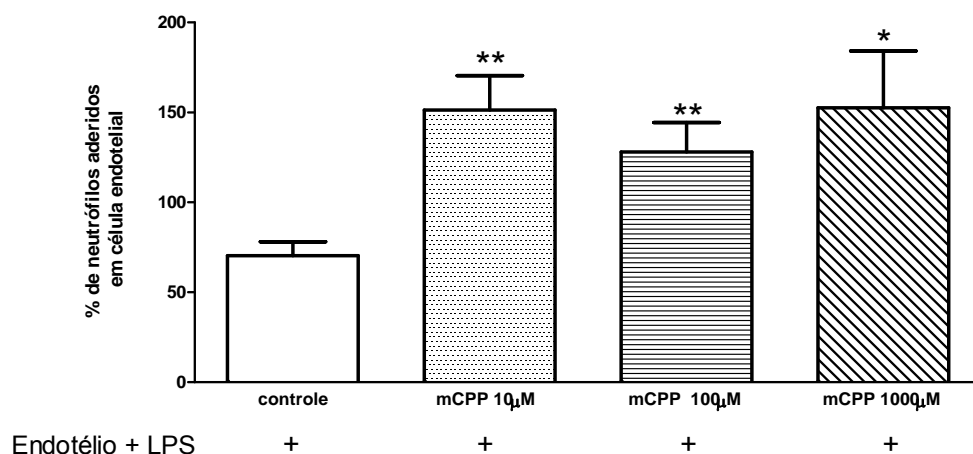


Figura 10. Efeitos da mCPP sobre a aderência de neutrófilos em cultura primária de células endoteliais, ambos coletados de ratos Wistar machos, aplicando-se LPS como estímulo inflamatório. Os neutrófilos foram previamente tratados com diferentes concentrações de mCPP (10, 100 e 1000μM) e acrescentados ao endotélio, previamente estimulado ou não com LPS. Posteriormente, foi realizada leitura em espectrofotômetro, em absorvância de 450 nm, e, baseado nos valores de absorvância obtidos, foram calculadas as quantidades e porcentagens de neutrófilos aderidos ao endotélio. Os resultados expressam a média \pm e.p.m. de neutrófilos aderidos ao endotélio, neutrófilos estes obtidos de 9 animais em cada grupo (* $p < 0,05$ vs. respectivo controle estimulado; ** $p < 0,01$ vs. respectivo controle estimulado).

5.2.3. Expressão de moléculas de adesão em neutrófilos

A quantificação da expressão de L-selectina, $\beta 2$ -integrina e PECAM-1, por citometria de fluxo, demonstrou que a mCPP foi efetiva em todas as concentrações empregadas (10, 100 ou 1000μM) no que se refere às alterações da expressão destas moléculas de adesão (Figura 11).

Em contrações basais, a mCPP, nas concentrações de 10 e 100μM, diminuiu a expressão ou aumentou a clivagem de L-selectina na superfície dos neutrófilos, em relação ao respectivo controle. Na presença do estímulo com fMLP *in vitro*, as doses de 100 e 1000μM é que exerceram efeito sobre a L-selectina da superfície dos neutrófilos, aumentando sua clivagem ou diminuindo sua expressão (Figura 11A).

A mCPP, *per se*, aumentou a expressão de $\beta 2$ -integrina quando empregada nas concentrações de 100 e 1000μM, em relação ao respectivo controle basal. Na vigência do estímulo com fMLP *in vitro*, exerceu efeito

significativo sobre esta molécula quando nas concentrações de 10 e 1000 μ M em relação ao respectivo controle estimulado. (Figura 11B).

Em condições basais, a mCPP não modificou a expressão de PECAM-1 na superfície dos neutrófilos em nenhuma das três concentrações empregadas. Entretanto, em vigência de estímulo com fMLP *in vitro*, a mCPP diminuiu a expressão da PECAM-1 quando empregada na concentração de 100 μ M e a aumentou quando empregada na concentração de 1000 μ M (Figura 11C).

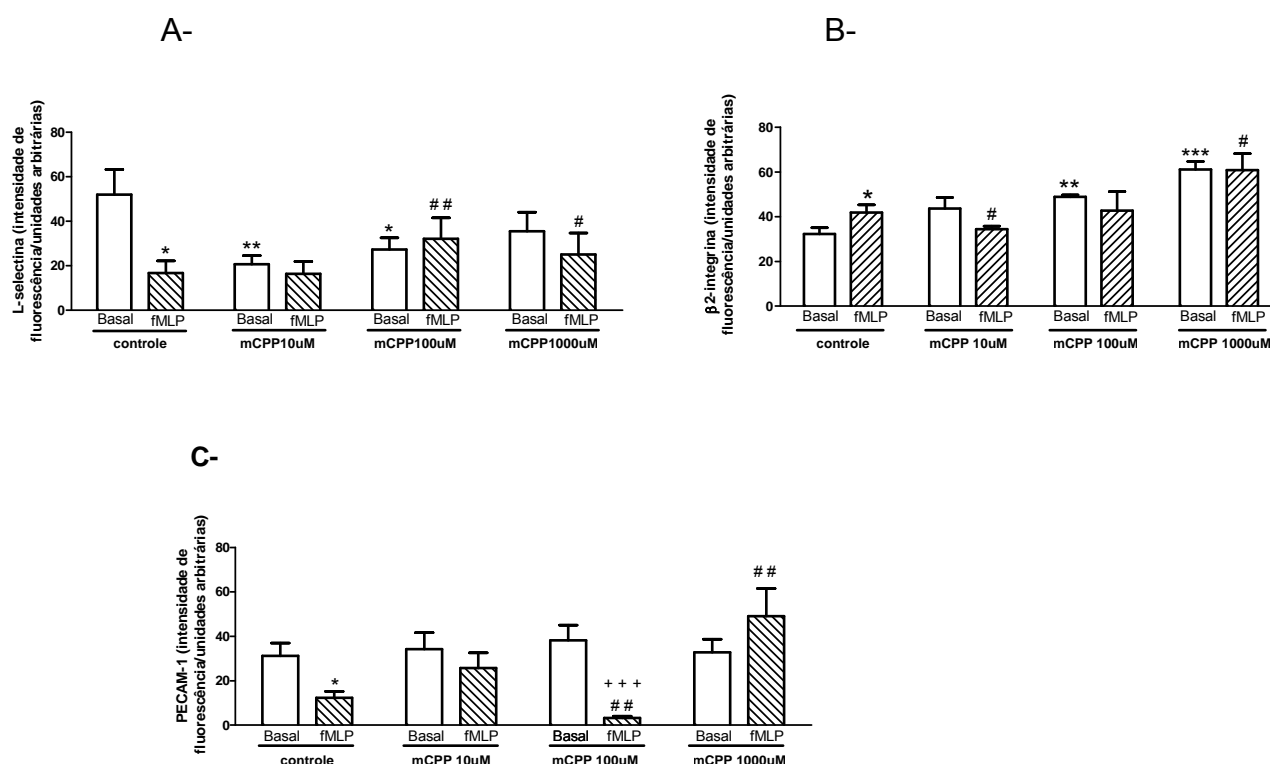


Figura 11. Efeitos da mCPP, *in vitro*, sobre a expressão de (A) L-selectina, (B) β 2-integrina e (C) PECAM-1, em neutrófilos coletados da cavidade peritoneal de ratos Wistar machos 4 horas após a injeção de 10 ml de solução de glicogênio de ostra 1%. Os neutrófilos ($1,0 \times 10^6$) foram previamente tratados com diferentes concentrações de mCPP (10, 100 e 1000 μ M) e incubados na presença ou ausência do estímulo inflamatório (fMLP, 10^{-6} M, 37°C, 1 hora). Posteriormente, as células foram incubadas com 100 μ L de anticorpo anti-L-selectina, anti- β 2-integrina ou anti-PECAM-1, na diluição de 1:100, durante 20 minutos e à 4°C, na ausência de luz. Em seguida, fixadas com paraformaldeído 2% e mantidas em geladeira até o momento de leitura em citometria de fluxo. Os resultados expressam a média \pm e.p.m. das quantificações de expressão de: (A) L-selectina de 9 - 14 animais em cada grupo (*p < 0,05 vs. controle basal; **p < 0,01 vs. controle basal; #p < 0,05 vs. controle fMLP; ##p < 0,01 vs. controle fMLP); (B) β 2-integrina de 8 - 14 animais em cada grupo (*p < 0,05 vs. controle basal; **p < 0,01 vs. controle basal; ***p < 0,001 vs. controle basal; #p < 0,05 vs. controle fMLP); (C) PECAM-1 de 8 - 13 animais em cada grupo (*p < 0,05 vs. controle basal; ##p < 0,01 vs. controle fMLP; +++p < 0,001 vs. [mCPP 100 μ M basal]).

5.2.4. Concentração de mediadores inflamatórios em sobrenadante de cultura de neutrófilos

A mCPP *per se*, nas três concentrações empregadas (10, 100 e 1000 μ M), bem como frente ao estímulo inflamatório com LPS, alteraram as concentrações dos mediadores inflamatórios avaliados (Figura 12).

A mCPP, em condições basais, diminuiu a concentração de NO no sobrenadante da cultura de neutrófilos apenas quando aplicada na concentração de 1000 μ M; em vigência do estímulo inflamatório (LPS), o fármaco diminuiu a concentração de NO, em todas as concentrações nas quais foi aplicado (10, 100 e 1000 μ M).

Em condições basais, a mCPP exerceu efeito sobre a concentração de TNF α , aumentando-a, apenas quando na concentração de 10 μ M. Na vigência de estímulo inflamatório, a mCPP aplicada à 1000 μ M diminuiu a concentração de TNF- α no sobrenadante da cultura de neutrófilos.

A quantificação da concentração de IL-10 no sobrenadante da cultura de neutrófilos demonstrou que, tanto em condições basais quanto na vigência de estímulo inflamatório, a concentração desta citocina diminuiu frente ao tratamento mCPP à 1000 μ M. Nas demais concentrações, em ambas as condições, o fármaco não alterou este parâmetro.

A mCPP *per se* aumentou a concentração de IL-1 β em sobrenadante de cultura de neutrófilos, quando empregada nas concentrações de 100 e 1000 μ M. Frente ao estímulo com LPS, a mCPP demonstrou-se efetiva no aumento da concentração desta citocina quando empregadas nas concentrações de 10, 100 e 1000 μ M.

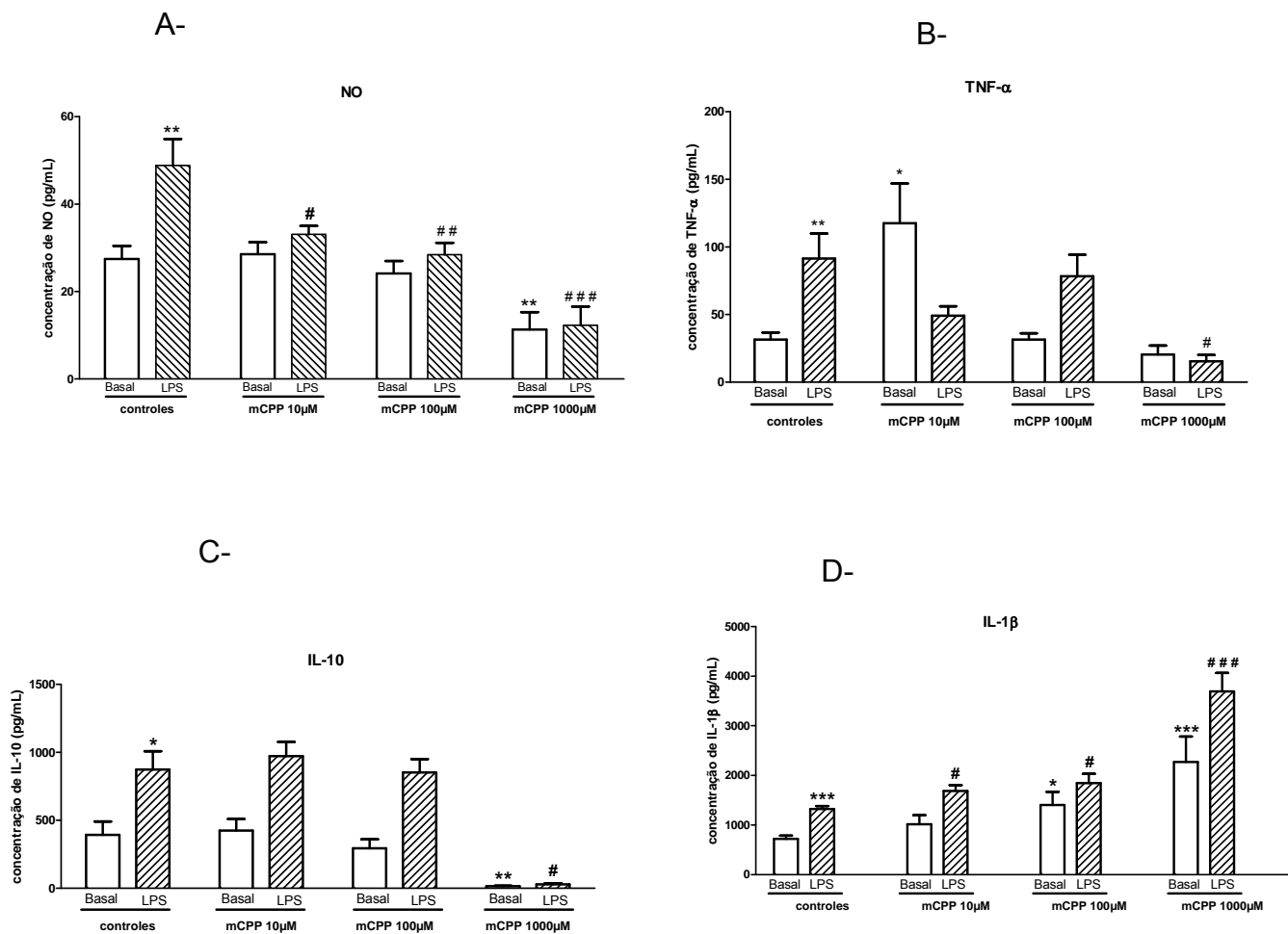


Figura 12. Efeitos da mCPP *in vitro* sobre produção de (A) NO, (B) TNF- α , (C) IL-10 e (D) IL-1 β por neutrófilos coletados da cavidade peritoneal de ratos Wistar machos 4 horas após a injeção de 10 ml de solução de glicogênio de ostra 1%. Os neutrófilos ($1,0 \times 10^6$) foram previamente tratados com diferentes concentrações de mCPP (10, 100 e 1000 μ M) e incubados na presença ou ausência de LPS a 37°C (5% CO₂) por um período de 18 horas). As concentrações de TNF- α , IL-10 e IL-1 β foram quantificadas por reação ELISA, de acordo com manual fornecido pelo fabricante enquanto que a de NO foi realizada por reação de Griess. Os resultados expressam a média \pm e.p.m. das concentrações de NO, TNF- α , IL-10 e IL-1 β no sobrenadante da cultura de neutrófilos de 8 animais por grupo (*p < 0,05 vs. controle basal; **p < 0,01 vs. controle basal; ***p < 0,001 vs. controle basal; #p < 0,05 vs. controle LPS; ##p < 0,01 vs. controle LPS; ###p < 0,001 vs. controle LPS).

Discussão

6. DISCUSSÃO

A apreensão de comprimidos vendidos como sendo *ecstasy*, mas que na realidade contém apenas mCPP ou uma associação de mCPP com outros derivados piperazínicos ou com MDMA, vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, tanto na Europa como no Brasil (BOSSONG, 2009; MALDANER, 2008). No entanto, os potenciais riscos dessa exposição à saúde não são conhecidos.

Atualmente, é de consenso na literatura que fármacos que atuam no SNC, como é o caso das drogas de abuso, influenciam o sistema imune primariamente, via sistema nervoso autônomo (SNA) e/ou pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), como também, por uma ação direta sobre as células imune.

Tomando em consideração o MDMA, por exemplo, recentemente, FERRAZ DE PAULA *et al.*, 2009, mostraram um aumento no *turnover* hipotalâmico de noradrenalina e corticosterona sérica após a administração de uma dose de 10 mg/kg em camundongos, além de uma redução da atividade de neutrófilos (*burst* oxidativo e fagocitose) e de uma alteração da distribuição de leucócitos na medula, no baço e no sangue. Como a atividade dos neutrófilos não foi observada *in vitro*, os autores sugeriram que a redução dessa atividade *in vivo* bem como a distribuição dos leucócitos seria induzida indiretamente pela ativação de neurônios noradrenérgicos ou pelo eixo HPA. Dessa forma, a exposição à MDMA pode ser considerada como a de um “estressor químico” sobre o sistema imune (CONNOR, 2004).

Quanto à mCPP, por ser um agonista não seletivo dos receptores 5-HT, tem servido como um composto de referência modelo em estudos neuroquímicos envolvendo receptores de serotonina. Nesse sentido, pesquisas mostraram que a

estimulação de receptores centrais e periféricos 5-HT_{2C} em ratos pode, respectivamente, ativar neurônios gabaérgicos (não-dopaminérgicos) na *substantia nigra* e na área tegmental ventral (DI GIOVANNI *et al.*, 2001) bem como acarretar um aumento da acetilcolina no hipocampo (ZHELYAZKOVA *et al.*, 1999).

No entanto, quanto ao potencial específico da mCPP em modular o sistema imune, a literatura é bastante escassa. Há estudos indicando que a serotonina e vários agonistas sintéticos de receptores 5-HT ativam o eixo HPA. CALOGERO *et al.*, 1990, exploraram qual seria esse mecanismo, examinando os efeitos estimulatórios da serotonina e agonistas de receptores 5-HT, incluindo a mCPP, sobre a secreção de corticosterona e no aumento de ACTH no plasma, em ratos, através de mecanismo, primariamente, dependente do CRH.

A literatura tem mostrado que receptores de 5-HT e transportadores de 5-HT estão distribuídos amplamente nas células imunes. Como a mCPP é um agonista de receptores 5-HT, muito provavelmente atua diretamente nos imunócitos. No entanto, quase não há relato sobre esses efeitos.

Em um estudo conduzido em cultura de sangue total humano estimulado por fitohemaglutinina e LPS, KUBERA *et al.*, 2005, a mCPP foi empregada como um agonista de receptor 5-HT_{2B/2C}, bem como a 5-HT, para investigar o envolvimento desses componentes na produção de IL-6 e TNF α por macrófagos e linfócitos, e encontrou-se que a mCPP aumenta significativamente a produção dessas citocinas por estes tipos celulares.

Nesse sentido, o objeto desse trabalho foi investigar os efeitos da mCPP sobre a resposta imune, especificamente sobre a resposta imune inata. Para tanto, foram realizados ensaios *in vivo* e *in vitro* com o intuito de investigar os

mecanismos envolvidos nos efeitos da mCPP sobre a mobilização leucocitária e, mais especificamente, sobre a migração neutrofílica.

Trabalhos encontrados na literatura (DE VRY, 2000; GIJSMAN, 2004; RAJKUMAR et al., 2009) aplicando a mCPP como protótipo de agonista dos receptores 5-HT empregam ratos Wistar machos como modelo experimental, fundamentando a utilização dessa mesma espécie animal no presente trabalho. Adicionalmente, já foram descritas na literatura ações comportamentais e alterações fisiopatológicas nos organismos de ratos submetidos ao tratamento com a mCPP (GIJSMAN *et al.*, 2004; STAACK&MAURER, 2003), bem como correspondências entre os metabólitos da mCPP encontrados em ratos com os encontrados em humanos (STAACK *et al.*, 2002; MAYOL *et al.*, 1998).

A via de administração por gavagem (v.o.) justifica-se pela simulação da utilização da mCPP como droga de uso recreativo, sendo mais comumente encontrado sob a forma de comprimidos, os quais são utilizados por seus usuários sob via oral. Ou seja, a via de administração selecionada foi uma tentativa de avaliar de maneira mais próxima os efeitos da mCPP sobre o sistema imunológico de supostos “usuários recreativos” desse fármaco.

STAACK e MAURER, 2003, desenvolveram um método empregando análise toxicológica sistemática para detectar mCPP e seus metabólitos em urina de rato, administrando uma dose de 1 mg/kg de mCPP. Segundo os autores, a administração da dose de 1 mg/kg em ratos corresponde à uma quantidade média de fármaco administrado em humanos, quando empregado como droga recreativa por seus usuários. Adicionalmente, 1 mg/kg é bastante próxima da faixa de doses de mCPP, via oral, normalmente empregadas nas pesquisas e trabalhos de psiquiatria (0,25 a 0,75 mg/kg), os quais fornecem grande parte das informações utilizadas neste trabalho, sobre efeitos do fármaco (TANCER&JOHANSON, 2001;

GIJSMAN *et al.*, 2004; BOSSONG *et al.*, 2005). Por essas razões, elegemos a dose de 1 mg/kg de mCPP para os tratamentos *in vivo* aqui realizados.

Neste trabalho, os dados obtidos nos experimentos *in vivo* demonstraram diminuição da leucometria total no exsudato peritoneal de ratos Wistar machos que receberam a mCPP por via oral, na vigência de estímulo inflamatório com LPS (i.p.). Esta diminuição do número de leucócitos no foco da inflamação refletiu a diminuição de células polimorfonucleares para o local, especificamente neutrófilos. Ademais, uma vez que este mesmo tratamento não deflagrou alterações na quantificação de leucócitos no compartimento circulante e nem na quantificação de células nucleadas na medula óssea, partimos para a investigação do paradeiro das células neutrofilicas. Para tanto, quantificamos a atividade da MPO nos tecidos hepático, pulmonar e do baço. Os órgãos escolhidos, além de corresponderem à locais de *clearance* de leucócitos polimorfonucleares (principalmente fígado e baço) (YAMASHIRO *et al.*, 2001; BRATTON, *et al.*, 2011; KOVACH&STANDIFORD, 2012), são órgãos-alvo de injúria tecidual em choques sépticos induzidos por endotoxina (LPS), primordialmente no que se refere aos pulmões (ANDONEGUI *et al.*, 2003; TSCHERNIG *et al.*, 2008; KOVACH&STANDIFORD, 2012). Para os grupos tratados com a mCPP, frente ao estímulo com LPS, os resultados da quantificação de MPO demonstraram influxo intenso de neutrófilos para o tecido pulmonar, o que explica a ausência dessas células na cavidade peritoneal.

WELBOURN&YOUNG, 1992, demonstraram consistentemente, em modelos de sepse em roedores e em pacientes sépticos, que, independentemente de qual seja o órgão de origem da sepse, os pulmões são comumente o primeiro órgão comprometido. Consequentemente, a falência dos pulmões se mantém como a causa mais comum de óbito relacionado à sepse. A

chave deste evento que, ao menos em parte, explica esta patologia é o rápido acúmulo de neutrófilos no lúmen dos capilares pulmonares – e, de fato, a depleção de neutrófilos em modelos animais preserva os pulmões durante uma endotoxemia (SHERIDAN *et al.*, 1997). ANDONEGUI *et al.*, 2002, demonstraram que nas primeiras 4 horas após a administração sistêmica de LPS, a maior parte dos neutrófilos encontram-se, preferencialmente, sequestrados dentro dos pulmões. No entanto, os mecanismos não estavam claramente estabelecidos. Sabe-se que TLR4 (toll-like receptors 4) em neutrófilos e/ ou em endotélio seria a motriz para o recrutamento excessivo de neutrófilos nos pulmões e seu caminho a partir do compartimento periférico, uma vez que este é o principal receptor ao qual o Lipopolissacarídeo liga-se para desencadear seus efeitos no organismo. Seguindo este raciocínio, ANDONEGUI *et al.*, 2003, demonstraram que o endotélio é muito responsivo ao estímulo com LPS, apresentando elevados níveis de TLR4 e aumento da expressão de P-selectina, sugerindo que o próprio endotélio pulmonar possa corresponder à célula ativa que recruta neutrófilos para o pulmão endotoxêmico. No mesmo trabalho, através da inoculação de LPS intraperitoneal em murinos, foi bem demonstrado que dentro das primeiras quatro horas após a inoculação com LPS, as células endoteliais, via TLR4, foram responsáveis pelo recrutamento intenso de neutrófilos. Assim, as células endoteliais atuaram como a primeira linha de defesa contra agentes microbianos, participando ativamente de respostas da imunidade inata ao LPS via TLR4.

Dessa forma, uma das hipóteses sugeridas é que a mCPP altere mecanismos intracelulares das células endoteliais da microcirculação pulmonar, como a expressão de receptores de membrana como TLR4 por exemplo – ou, ainda, modulação da expressão de moléculas de adesão, modulação da expressão de mediadores inflamatórios –, levando ao aumento do recrutamento

de neutrófilos para os pulmões conforme foi evidenciado pelo ensaio da quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase. Ainda, para confirmar este resultado, sugere-se que seja realizada análise histológica dos tecidos pulmonares.

Nossos dados são, ainda, insuficientes para apontar qual seria o mecanismo exato através do qual estes fenômenos ocorram. Neste ponto, inferimos, baseando-se na literatura, que possivelmente interferências da mCPP no eixo HPA, a partir de sua função agonista de receptores serotoninérgicos estejam intimamente envolvidos nos processos observados em nossos resultados.

Como já descrito anteriormente, diversas substâncias com ação central desencadeiam efeitos sobre o sistema imunológico. Assim, uma hipótese levantada foi a interferência da mCPP no eixo hipófise-pituitária-adrenal (HPA) como fator desencadeador dos resultados observados nos roedores tratados com o fármaco e apresentando, portanto, atividade neuroimunomoduladora. O eixo HPA desempenha papel central na regulação da sinalização através dos receptores de glicocorticoides, os quais são expressos praticamente em todas as células (RHEN&CIDLOWSKI, 2005), inclusive nas células do sistema imune. Em resumo, sinais neurais, endócrinos e quimiotáticos convergem para o nível do núcleo paraventricular do hipotálamo controlando a secreção do hormônio liberador de corticotropina (CRH) no sistema porta-hipofisário (WEBSTER *et al.*, 2002; RIVEST, 2001). O CRH estimula liberação de corticotropina (na pituitária), a qual induz síntese de cortisol no córtex da adrenal. Cerca de 90% do cortisol secretado liga-se aos ligantes de corticosteroides das globulinas do sangue (BREUNER&ORCHINIK, 2001). Cortisol livre é a forma biologicamente ativa do hormônio, sendo convertido à cortisona pela enzima 2,11 β -hidroxiesteróide

desidrogenase, conversão esta que é revertida pela 1,11 β -hidroxiesteróide desidrogenase (YANG&ZHANG, 2004). O receptor de glicocorticoides é membro de uma família de proteínas que são receptores de hormônios esteroides, e trata-se de um receptor presente na superfície de diversos tipos celulares – inclusive, nas células do sistema imunológico, como neutrófilos – e que apresenta elevada afinidade pelo cortisol. Dentro da célula, o complexo cortisol–receptor de glicocorticóides, através de três vias principais, interfere nos mecanismos intracelulares, acarretando consequências nas atividades celulares (RHEN&CIDLOWSKI, 2005).

Ademais, conforme descrito na literatura, a 5-HT neuronal esta envolvida na mediação e regulação de respostas em todos nos níveis do eixo HPA, incluindo regulação de receptores, expressão gênica e liberação de hormônios. Esta interferência da 5-HT com o eixo HPA ocorre via interação com outros neurotransmissores ou através de receptores serotoninérgicos presentes em tecidos centrais. Mais especificamente, o receptor 5-HT_{2C} – do qual a mCPP é agonista – está indiscutivelmente envolvido na estimulação da secreção de ACTH a partir da glândula pituitária e, desta forma, no aumento de cortisol (KING *et al.*, 1989; CALOGERO *et al.*, 1990; JORGENSEN *et al.*, 1999; JORGENSEN, 2007). Estes achados corroboram com a hipótese de que os efeitos da mCPP observados em nossos estudos possivelmente seriam, dentre outras, expressões periféricas de alterações centrais no eixo HPA.

Para tanto, o esquema de tratamento empregado nos ensaios *in vivo* anteriormente foram repetidos sob as mesmas condições, porém os animais foram previamente tratados com antagonista dos receptores de glicocorticoides (RU38486). A quantificação de cortisona sérica não demonstrou diferenças significativas entre os animais que tiveram seus receptores de glicocorticoides

antagonizados e os animais cujos mesmos receptores foram mantidos em condições normais. Ou seja, não foram demonstradas alterações causadas pela mCPP, associada à inibição de receptores de glicocorticoides, no que se refere à quantificação de cortisona circulante.

Entretanto, conforme demonstrado na literatura (FONE *et al.*, 1998; TERAO *et al.*, 2000), a concentração de cortisol decresce de maneira dose-dependente a partir das 2 horas após a administração da mCPP a ratos do sexo masculino. É importante ressaltar que a coleta das amostras para realização deste ensaio ocorreu 5 horas após o tratamento com o fármaco, uma vez que procuramos realizar essa mensuração no intervalo de tempo correspondente àquele em que observamos o influxo de neutrófilos aumentado para os pulmões em animais tratados com a mCPP, na vigência do estímulo inflamatório com LPS (item 4.3.1., Figura 4). Dessa forma, não é possível excluir a hipótese de participação do eixo HPA nas respostas observadas e, sim, inferir que no momento em que coletamos o material e a resposta descrita foi observada, não se identificou evidência suficiente para prosseguirmos as investigações dentro desta linha.

Como próxima etapa, uma vez que nos resultados obtidos *in vivo* frente ao tratamento com a mCPP, foi demonstrado que as alterações observadas na quantificação de leucócitos da cavidade peritoneal refletiram preponderantemente alterações ocasionadas na quantificação de neutrófilos, partimos para a investigação *in vitro* dos mecanismos neutrofílicos envolvidos neste processo. Para a avaliação, *in vitro*, dos processos celulares neutrofílicos envolvidos das respostas inflamatórias, empregamos a mCPP em concentrações de 10 μ M, 100 μ M e 1000 μ M (HWANG *et al.*, 2008).

Avaliamos os efeitos das três concentrações do fármaco propostas, sobre a migração neutrofílica, empregando-se fMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-

Phenylalanine) como fator quimiotático. Nos grupos tratados com contrações de 10 e 100 μM da mCPP, em presença e em ausência do fator quimiotático, houve aumento da migração de neutrófilos através do filtro de policarbonato. Tal resultado sugere uma ação direta da mCPP *per se* sobre os processos envolvidos na migração celular de neutrófilos, bem como a mesma ação direta na vigência de um estímulo indutor da quimiotaxia. Esta sugestão foi confirmada pela quantificação da expressão de moléculas de adesão expressas normalmente na superfície do neutrófilo (L-selectina, β 2-integrina e PECAM-1) já bem descritas na literatura como fatores primordialmente envolvidos na migração neutrofilica através do tecido endotelial (NEWMAN, 1997; REAVES *et al.*, 2004; PETRI&BIXEL, 2006; VESTWEBER, 2007; MCDONALD&KUBES, 2011; WILLIAMS *et al.*, 2011). Ainda, complementando os achados da migração neutrofilica, avaliamos os efeitos diretos da mCPP sobre a aderência dos neutrófilos ao endotélio. Assim, foi demonstrado que a mCPP aumentou a aderência de neutrófilos ao endotélio, na vigência de estímulo inflamatório com LPS à este, em todas as concentrações nas quais foi empregada, corroborando com nossa sugestão anterior de que o fármaco tenha efeitos diretos sobre mecanismos celulares que alteram a expressão de moléculas de adesão na superfície da célula, quando na vigência de um estímulo inflamatório.

Dentro da microcirculação do tecido inflamado, o recrutamento leucocitário é iniciado quando o endotélio ativado expressa selectinas (E- e P-selectina) sobre sua superfície luminal, permitindo que os leucócitos expressem L-selectina em sua superfície, a qual se ligará às selectinas do endotélio, começando então o leucócito a rolar ao longo da parede endotelial, processo conhecido como *rolling*. Os leucócitos em *rolling* encontram substâncias quimioatraentes na superfície do endotélio ativado, o que ativa receptores ligados à proteína G no leucócito,

gerando sinalização intracelular nestas células o que ativa integrinas leucocitárias (preponderantemente β 2-integrinas). Estas se ligam com elevada afinidade às integrinas do endotélio (VCAM, ICAM, α 4 e também β 2), resultando em firme adesão do leucócito ao endotélio. A partir de então, sinais intracelulares, via citocinas, somados a sinais externos transmitidos pela ligação entre as integrinas, fortalecem o processo de adesão, os leucócitos achatam-se e rastejam ativamente pela superfície do endotélio à procura do local mais adequado para que ocorra a migração transendotelial, para dentro do tecido inflamado (MCDONALD&KUBES, 2011). A interação e o acoplamento entre integrinas endoteliais e leucocitárias resultam na ativação de PECAM-1 na superfície de ambos os tipos celulares. Dentre outras funções, a ligação homóloga entre moléculas PECAM-1 leucocitárias e endoteliais estabiliza o contato intercelular, estabilizando, assim, a interação leucócito-endotélio e desempenhando importante papel na cascata de aderência e transmigração que culmina no extravasamento de leucócitos durante o processo inflamatório (NEWMAN, 1997; PRIVRATSKY, 210). Ademais, PECAM-1 expressa na superfície do leucócito promove a migração direcional, mediada por quimiocinas, para o sítio inflamatório (WU *et al.*, 2005).

Nossos resultados mostraram que, em condições basais, o tratamento com a concentração de 10 μ M atuou de maneira significativa apenas sobre a quantificação da expressão de L-selectina, diminuindo sua expressão ou aumentando a clivagem da molécula. Na concentração de 100 μ M, houve diminuição da expressão de L-selectina ou aumento de sua clivagem e também houve aumento da expressão de β 2-integrina. Na concentração mais elevada empregada, observou-se apenas alteração significativa para a β 2-integrina, a qual teve sua expressão aumentada. A dinâmica de modificações na expressão das

moléculas de adesão na superfície do neutrófilo indica ativação do processo de migração desta célula, sugerindo, em conjunto com os resultados de quimiotaxia, uma ação *in vitro* pro - inflamatória da mCPP *per se*.

Em vigência do estímulo inflamatório com fMLP, a concentração de 10 μM diminuiu significativamente a expressão de $\beta 2$ -integrina, enquanto não demonstrou nenhum efeito sobre as outras duas moléculas. Na concentração intermediária (100), a expressão de L-selectina foi significativamente aumentada e a expressão de PECAM-1 apresentou-se diminuída de maneira relevante, não sendo observadas alterações sobre a expressão de $\beta 2$ -integrinas. Ainda na condição estimulada, a mCPP em concentração de 1000 μM diminuiu a expressão de L-selectina, enquanto aumentou as expressões de $\beta 2$ -integrinas e PECAM-1.

As alterações – tanto aumento quanto diminuição - demonstradas na expressão das moléculas de adesão na superfície dos neutrófilos expostos *in vitro* às três diferentes concentrações do fármaco (10, 100 e 1000 μM) sugerem que a mCPP exerce efeitos diretos sobre mecanismos neutrofílicos envolvidos nos processos de aderência e migração desde tipo celular. Os resultados obtidos nos ensaios de aderência e quimiotaxia corroboram com este apontamento, uma vez que demonstraram, respectivamente, alterações relevantes na porcentagem de neutrófilos aderidos ao endotélio bem como na diferença de distância percorrida pelos neutrófilos através dos filtros de policarbonato.

Como já bem estabelecido na literatura, as citocinas são proteínas sintetizadas e secretadas por diversas células do sistema imune, e que apresentam papel bastante relevante nas respostas imune inata e adquirida. Dessa forma, constituem um importante componente da comunicação entre o

sistema imune e os tecidos periféricos. (ABBAS, MURPHY e SHER, 1996).

No presente trabalho, a quantificação da expressão de mediadores inflamatórios (NO, TNF- α , IL-1 β e IL-10) no sobrenadante da cultura de neutrófilos também demonstrou o potencial imunomodulatório da mCPP, uma vez que o fármaco exerceu efeitos sobre a produção dos referidos mediadores. Em condições basais, a concentração de 10 μ M aumentou apenas a concentração de TNF- α , com 100 μ M do fármaco observou-se apenas aumento de IL-1 β , enquanto que a concentração de 1000 μ M diminuiu concentrações de NO e de IL-10 paralelamente ao aumento de IL-1 β . Na vigência de estímulo inflamatório com LPS na cultura dos neutrófilos, as concentrações de 10 e 100 μ M de mCPP diminuíram a quantificação de NO e aumentaram de IL-1 β enquanto que a concentração mais elevada de mCPP (1000 μ M) causou alterações nas concentrações de todas as citocinas quantificadas na cultura – diminuiu concentração de NO, TNF- α e IL-10, e aumentou a concentração de IL-1 β .

As alterações na produção de citocinas específicas estão intimamente relacionadas à expressão das moléculas de adesão na superfície celular dos neutrófilos e, portanto, à quimiotaxia e migração leucocitária através do endotélio em direção ao foco de inflamação e à adesão do neutrófilo ao endotélio. A produção de citocinas inflamatórias, principalmente TNF- α e IL-1 β , induz a produção de quimiocinas, pertencentes a uma grande família de citocinas estruturalmente homólogas que estimulam o movimento dos leucócitos e a migração destes do sangue para o tecido. Em contraste, a IL-10 desempenha papel inibitório nas respostas da imunidade inata, frente ao processo inflamatório; assim, a IL-10 atua contendo a reação imunológica inata, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- α e IL-1 β) e, conseqüentemente,

reduzindo a produção de quimiocinas e os mecanismos envolvidos na migração leucocitária através do endotélio (ABBAS, 5th ed). Diferentemente das citocinas, a interação do NO não se restringe a receptores únicos definidos, podendo reagir com outras moléculas inorgânicas, estruturas de DNA, grupos prostéticos ou proteínas (MARSHALL *et al.*, 2000). Considerando que muitos dos alvos do NO são, por si mesmos, moléculas reguladoras, fica evidente a atuação heterogênea do NO e seus efeitos diversos (BOGDAN, 2001); dessa forma, o papel do NO no processo inflamatório é controverso, apresentando tanto características pró- quanto anti-inflamatórias, dependendo do tipo celular que o produz e do estímulo para esta produção, diferentes vias de sinalização são envolvidas para promover ou inibir a expressão de iNOS.

Vale observar que, paralelamente aos aumentos significativos mostrados na porcentagem de neutrófilos aderidos ao endotélio, frente às três concentrações de mCPP empregadas, em vigência de estímulo inflamatório, houve diminuição das concentrações de NO de maneira dose-dependente em relação ao aumento das concentrações de mCPP empregadas na cultura de neutrófilos. Este achado corrobora com as descrições da literatura sobre a inibição causada pelo NO nos processos de adesão do leucócito ao endotélio.

Assim, os resultados obtidos nos ensaios realizados *in vitro* correlacionam-se e, em conjunto, demonstram que a mCPP atua diretamente sobre o neutrófilo, alterando mecanismos celulares que desempenham papel importante no processo de migração deste tipo celular, em vigência ou ausência de estímulo inflamatório. Ainda, o conjunto de resultados apresentados no trabalho, em ambos os modelos, sugere que o fármaco afeta o tráfego de neutrófilos, especialmente em vigência de uma sepse, desempenhando ação aparentemente pró-inflamatória. Entretanto, vale ressaltar que são necessários estudos mais

aprofundados a partir dos resultados apresentados neste trabalho, que verifiquem o comportamento de mecanismos intracelulares envolvidos nos processos até aqui avaliados para que se façam possíveis explicações mais sólidas acerca da mecanística dos resultados até então obtidos.

Ainda não existem trabalhos na literatura que comprovem a existência de receptores serotoninérgicos em neutrófilos. No entanto, alguns trabalhos já mostraram a relevância destes receptores para a modulação direta da serotonina, no local de inflamação, em outros tipos celulares do sistema imune. Como apontado anteriormente, estudos conduzidos por Kubera e colaboradores (KUBERA *et al.*, 2005) demonstraram a influência da 5-HT na regulação da produção de citocinas (IL-6 e TNF- α) por macrófagos e linfócitos. Outro trabalho realizado pelo mesmo grupo (KUBERA *et al.*, 2000) demonstrou que a 5-HT exerceu efeitos modulatório sobre a produção de citocinas (IFN- γ e IL-10) mensuradas em amostras de sangue total. Mediante tais observações de efeitos imunomodulatório da 5-HT produzida e liberada periféricamente, e em não havendo evidências da ausência de receptores serotoninérgicos em células neutrofilicas, parece-nos possível inferir que um dos mecanismos que inicialmente explique os efeitos observados neste trabalho sobre os neutrófilos (principalmente sob condições inflamatórias) esteja correlacionado à presença de receptores desta natureza neste tipo celular e, conseqüentemente, à uma ação direta de 5-HT periférica sobre os mecanismos celulares dos neutrófilos.

Os resultados obtidos, em conjunto, sugerem que a mCPP exerça atividade pró-inflamatória no que se refere à atuação dos neutrófilos nos processos envolvidos, bem como sugerem que o fármaco seja capaz de amplificar a resposta inflamatória em modelo animal de rato, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Até o

momento, não é possível apontar o mecanismo através do qual a mCPP desempenha suas ações sobre os parâmetros do sistema imune inato avaliados neste trabalho. Como destacado anteriormente, há necessidade de mais estudos que continuem a aprofundar-se neste tema para melhor compreensão dos mecanismos e processos envolvidos nas respostas observadas neste trabalho.

Finalizando, vale ressaltar que este trabalho buscou responder a questões ainda não abordadas na literatura ou em trabalhos anteriores no que se refere às ações da mCPP sobre as respostas do sistema imune inato e sobre os processos envolvidos na mobilização leucocitária. Dado a relevância da mCPP no contexto da utilização crescente de drogas recreativas, acreditamos ser importante a realização de trabalhos como este, bem como sua continuação e aprofundamento no que diz respeito às investigações acerca das ações desta substância sobre o organismo. Além disso, uma vez que a mCPP enquanto droga recreativa é amplamente utilizada associada à outras drogas de abuso, como cocaína, álcool, anfetaminas em geral e, principalmente, com o MDMA, sugerimos que avaliações cuidadosas acerca destas associações e seus possíveis impactos na saúde dos usuários sejam realizadas e que este tema venha a ser ainda mais desenvolvido em estudos e trabalhos futuros.

Conclusão

7. CONCLUSÕES

Concluimos que a mCPP *per se*, bem como em vigência de um estímulo inflamatório, exerceu efeitos diretos sobre os neutrófilos, mais especificamente sobre os mecanismos celulares envolvidos na mobilização e transmigração neutrofílica, *in vitro*. *In vivo*, a mCPP amplificou o direcionamento do influxo de neutrófilos para os pulmões em presença de estímulo inflamatório no organismo.

Em resumo, concluimos que a mCPP desempenha papel pró-inflamatório em ambos os modelos, tanto em relação ao fluxo leucocitário *in vivo* quanto no que se refere à atividade celular de neutrófilos *in vitro*.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; MURPHY, M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v.383, n.6603, p.787-793, 1996.

ABBAS, A. K. *Cellular and Molecular Immunology*. 5.ed.

ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian. *Biologia molecular da célula*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

ALVES-FILHO, J. C.; BENJAMIM, C.; TAVARES-MURTA, B. M.; CUNHA, F. Q. Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. **Mem Inst Oswald Cruz**, v.100, p.223-226, 2005.

ANDONEGUI, G.; BONDER, S.C.; GREEN, F.; MULLALY, S. C.; ZBYTNUIK, L.; RAHARJO, E.; KUBES, P. Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. **The Journal of Clinical Investigation**, v.111, n.7, p.1011-1020, 2003.

ANDONEGUI, G.; GOYERT, S. M.; KUBES, P. Lipopolysaccharide-induced leukocyte-endothelial cell interactions: a role for CD14 versus toll-like receptor 4 within microvessels. **Journal of Immunology**, v.169, p.2111-1119, 2002.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lista F2 da Portaria SVS/MS 344/98. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/270209.htm> Acessado em 9/05/2009.

BALDESSARINI, R.J. - Drug therapy of depression and anxiety disorders, In: Brunton, L.L.; Lazo, J.S.; Parker, K.L. (eds.) *The pharmacological basis of therapeutics – Goodman & Gilman's*. 11a. Ed. McGraw Hill, New York, p.429-459, 2006.

BENEDICT, C.R., MATHEW, B., REX, K.A, CARTWRIGHT JR., J., SORDAHL, L.A., Correlation of plasma serotonin changes with platelet aggregation in an in vivo dog model of spontaneous occlusive coronary thrombus formation. **Circulation Research**, v.58, p.58-67, 1986.

BENKELFAT, C.; MURPHY, D. L.; HILL, J. L., *et al.* Ethanol-like properties of the serotonergic partial agonist m-chlorophenylpiperazine in chronic alcohol patients. **Arch Gen Psychiatry**, v.48, p.383, 1991.

BERTILSSON, L.; DAHL, M. L.; DALEN, P. *et al.* Molecular genetics of CYP2D6: clinical relevance with focus on pschotropic drugs. **Br J Clin Pharmacol.**, v.53, p.111-112, 2002.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v.2, n.10, p.907-916, 2001.

BONE, R. C.; GRODZIN, C. J.; BALK, R. A. Sepsis: A New Hypothesis for Pathogenesis of the Disease Process. **American College of Chest Phusicians**, v.112, p.235-243, 1997.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from bone marrow to microbes. **Immunity**, v.33, n.5, p.657-670, 2010.

BOSSONG, M. G.; VAN DIJK, J. P.; NIESINK, R. J. M. Methylone and mcpp, two new drugs of abuse? **Addiction Biology**, v.10, p.321-323, 2005.

BOSSONG, M. G.; BRUNT, T. M.; VAN DIJK, J. P.; RIGTER, S. M.; HOEK, J.; GOLDSCHIMIDT, H. M. J.; NIESINK, R. J. M. mCPP: an undesired addition to the ecstasy markey. **Journal of Psychopharmacology**, p.1-7, 2009.

BRATTON, D. L.; HENSON P. M. Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. **Trends in Immunology**, v.32, p.350-356, 2011.

BREUNER, C. W.; ORCHINIK, M. Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. **Journal of Endocrinology**, v.175, p.99-112, 2002.

BROOCKS, A.; PIGOTT, T. A.; HILL, J. L., *et al.* Acute intravenous administration of ondansetron and mCPP, alone and in combination, in patients with obsessive-compulsive disorder (OCD): behavioral and biological results. **Psychiatry Res**, v.79, p.11-20, 1998.

BUYDENS-BRANCHEY, L.; BRANCHEY, M.; FERGESON, P. *et al.* The metachlorophenylpiperazine challenge test in cocaine addicts: hormonal and physiological responses. **Biol Psychiatry**, v.41, p.1071-1086, 1997.

CACCIA, S.; BALLABIO, M.; SAMANIN, R.; ZANINI, M. G.; GARATTINI, S. (-)-mChlorophenyl-piperazine, a central 5-hydroxytryptamine agonist, is a metabolite of trazodone. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.33, p.477-478, 1981.

CALOGERO et al Mechanisms of Serotonin Receptor Agonist-Induced Activation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal. **Endocrinology**, v.126, p.1888-1894, 1990.

CHING, S.; HE, L.; LAI, W.; QUAN, N. IL-1 type I receptor plays a key role in mediating the recruitment of leukocyte into the central nervous system. **Brain, Behaviour and Immunity**, v.19, n.2, p.127-137, 2005.

CONE, J. B. Inflammation. **The American Journal of Surgery**, v.182, 558-562, 2001.

CONNOR, T.J. Methylenedioxymethamphetamine (MDM, 'Ecstasy'): a stressor on the immune system. **Immunology**, v.111, p.357-367, 2004.

COWEN P. J.; SARGENT P. A.; WILLIAMS C.; GOODALL E. M.; ORLIKOV A. B. Hypophagic, endocrine and subjective responses to m-chlorophenylpiperazine in healthy men and women. **Hum Psychopharmacol**, v.10, p.385–391, 1995.

DE VRY, J; SCHREIBER, R. Effects of selected serotonin 5-HT₁ and 5-HT₂ receptor agonists of feeding behavior: possible mechanisms of action. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.24, p.341-353, 2000.

ELLENHORN, M. J.; SCHONWALD, S.; ORDOG, J., et. al. Ellenhorn's Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning. 8th ed. Baltimore, MD: Williams and Wilkins; 2006.

EUROPOL-EMCDDA. Joint Reported a new psychoactive substance: 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP). [European Monitoring Centre for Drugs Addiction web site]. March, 2007. Available at: <http://www.emcdda.europa.eu/?nnodeid=16775>.

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

FERRAZ DE PAULA, V. et al. Methylenedioxymethamphetamine(Ecstasy) Decreases Neutrophil Activity and Alters Leukocyte Distribution in Bone Marrow, Spleen and Blood. **Neuroimmunomodulation**, v.16, p.191-200, 2009.

FEUCHTL, A.; BAGLI, M.; STEPHAN, R., et. al. Pharmacokinetic meta-chlorophenylpiperazineafter intravenous and oral administration in healthy male volunteers: implication for the pharmacodynamic profile. **Psychopharmacology**, v.37, p.180-188, 2004.

FONE, K. C. F.; AUSTIN, R. H.; TOPHAM, I. A.; KENNETT, G. A.; PUNHANI, T. Effects of chronic m-CPP on locomotion, hypophagia, plasma corticosterone and 5-HT_{2C} receptor levels in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v.123, p.1707-1715, 1998.

FRIEDMAN, H.; NEWTON, C.; KLEIN, T. W. Microbial Infections, Immunomodulation, and Drugs of Abuse. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.2, p.209-219, 2003.

FURZE, R. C.; RANKIN, S. M. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. **Immunology**, v.125, p.281-288, 2008

GERMINE, M.; GODDARD A. W.; SHOLOMSKAS D. E., et al. Response to metachlorophenylpiperazine in panic disorder patients and healthy subjects: influence of reduction in intravenous dosage. **Psychiatry Res**, v.54, p.115–133, 1994.

GIBSON E. L.; BARNFIELD A. M. C.; CURZON G. Evidence that mCPP-induced anxiety in the plus-maze is mediated by postsynaptic 5-HT(2C) receptors but not by sympathomimetic effects. **Neuropharmacology**, v.33, p.3–4, 1994.

GIJSMAN, H. J.; VAN GERVEN, J. M.; TIELEMAN, M. C.; SCHOEMAKER, R. C.; PIETERS, M. S.; FERRARI, M. D.; COHEN, A. F.; VAN KEMPEN, G. M. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of oral and intravenous meta-chlorophenilpiperazine in healthy volunteers. **J Clin Psychopharmacol**, v.18, p.289-295, 1998.

GIJSMAN, H. J.; COHEN, A. F.; A VAN GERVEN, J. M. The application of the principles of clinical drugs development to pharmacological challenge test of the serotonergic system. **Journal of Psychopharmacology**, v.18, n.1, p.7-13, 2004.

GREER, John P.; FOERSTER, John; LUKENS, John N.. Wintrobe's clinical hematology. 11.ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2003.

GOBBI, M.; MOIA, M.; PIRONA, L.; CEGLIA, I.; REYES-PARADA, M.; SCORZA, C.; MINNINI T. p-Methylthioamphetamine and 1-(3-chlorophenyl)piperazine, two non-neurotoxic 5-HT releasers in vivo, differ from neurotoxic amphetamines derivatives in their mode of action at 5-HT nerve endings in vitro. **J. Neurochem.**, v.82, p.1435-1443, 2002.

GOERINGER, K. E.; RAYMOND, L.; LOGAN, B.K. Postmortem forensic toxicology of trazodone. **J. Forensic Sci.**, v.45, p.850-856, 2000.

HELLSTRAND, K; CZERKINSKY, C; RICKSTEN,A; JANSSON,B.; ASEA,A; KYLEFJORD,H; HERMODSSON,S. Role of Serotonin in the Regulation of Interferon- γ Production by Human Natural Killer Cells. **J INTERFERON RES**, v.13, p.33-38, 1993

HICKEY, M. J.; ISSEKUTZ, A. C.; REINHARDT, P. H.; FEDORAK, R. N.; KUBES, P. Endogenous Interleukin-10 Regulates Hemodynamic Parameters, Leukocyte-Endothelial Cell Interactions, and Microvascular Permeability During Endotoxemia. **Journal of the American Heart Association**, v.83, p.1124-1131, 1998.

JOHNSTONE, A. C., et. al. Benzylpiperazine: a drug of abuse? **Journal of Psychopharmacology**, v.21, n.8, p.888-894, 2007.

JORGENSEN, H.; KNIGGE, U.; KJAER, A.; WARBERG, J. Adrenocorticotrophic Hormone secretion in rats induced by stimulation with serotonergic compounds. **Journal of Neuroendocrinology**, v.11, p.283-290, 1999.

JORGENSEN, H. Studies on the neuroendocrine role of serotonin. **Danish Medical Bulletin**, v.54, n.4, p.266-288, 2007.

KAHN, R. S.; WETZLER, S. m-Chlorophenylpiperazine as a probe of serotonin function. **Biol. Psychiatry**, v.30, n.11, p.1139-1166, 1991.

KAHN R. S.; WETZER S.; ASNIS G. M.; KLING M. A.; SUCKOW R. F.; VAN PRAAG H. M. Effects of m-chlorophenylpiperazine in normal subjects: A dose-response study. **Psychopharmacology**, v.100, p.339 –344, 1990.

KING, B. H.; BRAZELL, C.; DOURISH, C. T.; MIDDLEMISS, D. N. MK-212 increases rat plasma ACTH concentration by activation of the 5-HT_{1C} receptor subtype. **Neurosci Lett**, v.105, p.174-176, 1989.

KLAASSEN T, PIAN KL, WESTENBERG HG, et al. Serotonin syndrome after challenge with the 5-HT agonist meta-chlorophenylpiperazine. **Psychiatry Res**, v.79, p.207–212, 1998.

KOVACH, M. A.; STANDIFORD, T.J. The function of neutrophil in sepsis. **Current World Literature – Pathogenesis and immune response**, v. 25, 2012

KOVALEVA, J.; DEVUYST, E.; DE PAEPE, P., et. al. Acute Chlorophenylpiperazine Overdose: A Case Report and Review of the Literature. **Ther Drug Monit.**, v.30, n.3, p.394-398, 2008.

KRYSTAL, J. H.; SEIBYL, J. P.; PRICE L. H.; et al. m-Chlorophenylpiperazine effects in neuroleptic-free schizophrenic patients. **Arch Gen Psychiatry**, v.50, p.624–635, 1993.

KUBERA, M., KENIS, G., BOSMANS, E., SCHARPE, S., MAES M. Effects of serotonin and serotonergic agonists and antagonists on the production of interferon-gamma and interleukin-10. **Neuropsychopharmacology**, v.23, p.89–98, 2000.

KUBERA, M., MAES, M.; KENIS, G., KIM, Y.K.; LASON, W. Effects of serotonin and serotonergic agonists and antagonists on the production of tumor necrosis factor a and interleukin-6. **Psychiatry Research**, v.134, p.251– 258, 2005.

MALDANER, A.O. Comprimidos contendo a mCPP, assim como também, outras piperazinas, foram apreendidos no Brasil. Brasília, Instituto Nacional de Criminalística/Polícia Federal, 2009 (Informação verbal).

MARSHALL, H. E.; MERCHANT, K.; STAMLER, J. S. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. **FASEB J**, v.14, p.1889-1900, 2001.

MARTÍNEZ, M. A.; BALLESTEROS, S.; SÁNCHEZ DE LA TORRE, C. et. al. Investigation of a fatality due to trazodone poisoning: case report and literature review. **J Anal Toxicol**, v.29, p.262-268, 2005.

MCCAN, U. D.; ELIGULASHVILI, V.; MERTL, M. Altered neuroendocrine and behavioral responses to m-chlorophenylpiperazine in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) users. **Psychopharmacology**, v.147, p.56-65, 1999.

MCDONALD, B.; KUBES, P. Cellular and molecular choreography of neutrophil recruitment to sites of sterile inflammation. **Journal of Molecular Medicine**, 2011.

MEDEIROS, R. I. Análise químico-forense da meta-clorofenil-piperazina: a entrada das “designer drug” no Brasil. **Nota técnica, Instituto de Criminalística Leonardo Rodrigues**, acesso em 15/05/2009.

MÖSSNER, R., LESCH, K.P. Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. **Brain Behavior and Immunity**, v.12, p.249–271, 1998.

NEWMAN, P. J. The Biology of PECAM-1. *Journal of Clinical Investigation*, v.99, n.1, p.3-8, 1997.

PETRI, B.; BIXEL, G. Molecular events during leukocyte diapedesis. *The FEBS Journal*, v.273, p.4399-4407, 2006.

PRITZKER, D.; KANUNGO, A.; KILICARSLAN T.; TYNDALE, R. F.; SELLERS, E. M. Designer drugs that are potent inhibitors of CYP2D6. **J. Clin. Psychopharmacol.**, v.22, n.3, p.330-332, 2002.

PRIVRATSKY, J. R.; NEWMAN, D. K.; NEWMAN, P. J. PECAM-1: Conflicts of interest in inflammation. **Life Science**, v.87, p.69-82, 2010.

RAJKUMAR, R. et al. 1-(m-Chlorophenyl)piperazine induces depressogenic-like behaviour in rodents by stimulating the neuronal 5-HT_{2A} receptors: Proposal of modified rodent antidepressant assay. **European Journal of Pharmacology**, v.608, p.32-41, 2009.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids – New Mechanisms for Old Drugs. **The New England Journal of Medicine**, v.353, n.16, p.1711-1723, 2005.

REAVES, T. A.; CHIN, A. C.; PARKOS, C. A. Neutrophil transepithelial migration: role of toll-like receptors in mucosal inflammation. **Mem Instit Oswaldo Cruz**, v.100, p.191,198, 2005.

RIVEST, S. How circulating cytokines trigger the neural circuits that control the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Psychoneuroendocrinology**, v.26, p.761-788, 2001.

ROTZINGER, S.; BOURIN, M.; AKIMOTO, Y.; COUTTS, R.T.; BAKER, G.B. – Metabolism of some “second”- and fourth-generation antidepressants: iprindole, viloxazine, bupropion, mianserin, maprotiline, trazodone, nefazodone, and venlafaxina. **Cell Mol Neurobiol**, v.19, p.427-442, 1999.

SHERIDAN, B. C.; MCINTYRE, R. C. J.; Moore E. E.; MELDRUM D. R.; AGRAFOJO, J.; FULLERTON D. A. Neutrophils mediate pulmonary vasomotor dysfunction in endotoxin-induced acute lung injury. **Journal of Trauma**, v.42, n.3, p.391-397, 1997.

STAACK, R. F.; MAURER, HH. Piprazine-derived designer drug 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP): GC-MS studies on its metabolism and its toxicological detection in urine including analytical differentiation from its precursor drugs trazodone and nefazodone. **J. Anal. Toxicol.**, v.27, p.560-568, 2003.

SILLIMAN, C. C.; KELHER, M. R.; GAMBONI-ROBERTSON, F.; HAMIEL, C.; ENGLAND, K. M.; DINARELLO, C. A.; WYMAN, T. H.; KHAN, S. Y.; MCLAUGHLIN, N. J. D.; BERCOVITZ, R. S.; BANERJEE, A. Tumor necrosis factor- α causes release of cytosolic interleukin-18 from human neutrophils. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.298, p.714-724, 2009.

STEFANINI, E.; FADDA, F.; MEDDA, L.; GESSA, G.L. Selective inhibition of serotonin uptake by trazodone, a new antidepressant agent. **Life Sci**, v.8, p.1459-1466, 1976.

TANCER, M. E.; JOHANSON, C. E. The subjective effects of MDMA and mCPP in moderate MDMA users. **Drug Alcohol Depend**, v.65, p.97-101, 2001.

TANCER, M. E.; JOHANSON, C. E. Reinforcing, subjective and physiological effects of MDMA in humans: an comparison with d-amphetamine and mCPP. **Drug Alcohol Depend**, v. 72, p.33-44, 2003.

TERAO, T.; NAKAMURA, J.; YOSHIMURA, R.; OHMORI, O.; TAKAHASHI, N.; KOJIMA, H.; SOEDA, S.; SHINKAI, T.; NAKANO, H.; OKUNO, T. Relationship between serum cholesterol levels and *meta*-chlorophenylpiperazine-induced cortisol responses in healthy men and women. **Psychiatry Research**, v.96, p.167-173, 2000.

THOMAS, D. R.; GAGER, T. L.; HOLLAND, V., *et al.* m-Chlorophenylpiperazine (mCPP) is an antagonist of the cloned human 5-HT_{2B} receptor. **Neuroreport**, v.7, p.1457-1460, 1996.

TSCHERNIG, T.; JANARDHAN, K. S.; PABST, R.; SINGH, B. Lipopolysaccharide induced inflammation in the perivascular space in lungs. **J. of Occupational Medicine and Toxicology**, v.3, n.17, 2008.

VESTWEBER, D. Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium, **Immunological Reviews**, v.218, p.178-196, 2007.

VON VIETINGHOFF, S.; LEY, K. Homeostatic Regulation of Blood Neutrophil Counts. **The Journal of Immunology**, v.181, p.5183-5188, 2010.

VORCE, S. P.; HOLLER, J. M.; LEVINE, B.; MARYLIN, R. P. Detection of 1-Benzylpiperazine and 1-(3-Trifluoromethyl)-piperazine in Urine Analysis Specimens Using CG-MS and LC-ESI-MS. **Journal of Analytical Toxicology**, v.32, p.444-450, 2008.

WEBSTER, J. I.; TONELLI, L.; STERNBERG, E. M. Neuroendocrine regulation of immunity. **Annual Review of Immunology**, v.20, p.125-163, 2002.

WELBOURN, C.R.; YOUNG, Y. Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. **Br. J. Surg**, v.79, p.998-1003, 1992.

WILLIAMS, M. R.; AZCUTIA, V.; NEWTON, G.; ALCAIDE, P.; LUSCINSKAS, F. W. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium, **Trends in Immunology**, p.1-9, 2001.

YAMASHIRO, S.; KAMOHARA, H.; WANG, J.; YANG, D.; GONG, H.; YOSHIMURA, T. Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. **J. Leukocyte Biology**, v.69, p.698-704, 2001.

YANG, S.; ZHANG, L. Glucocorticoids and vascular reactivity. **Curr. Vasc. Pharmacol**, v.2, p.1-12, 2004.

YOUNG, M.R.I., MATTHEWS, J. Serotonin regulation of T-cell subpopulations and of macrophage accessory function. **Immunology**, v.84, p.148-152, 1995.

Anexos



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética em Experimentação Animal



Ofício CEEA/FCF/55 /2009

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Efeitos do tratamento agudo de metaclorofenilpiperazina (mCPP) e da associação mCPP/metilenedioximetanfetamina (MDMA) sobre a mobilização de leucócitos e perfil de citocinas” (Protocolo nº 233), de responsabilidade da pesquisadora **Lara Lombardi** sob a orientação da Profa. Dra. 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 8 de junho 2009.

São Paulo, 13 de julho de 2009.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES

À Profa. Dra. Regina Lúcia de Moraes Moreau

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo

O Centro de Controle de Intoxicações (CCI), no intuito de colaborar com pesquisas envolvendo substâncias de uso abusivo e firmar novas parcerias com órgãos públicos, fez a doação de 100 mg (cem) do padrão analítico primário da substância meta-clorofenilpiperazina (mCPP), que será de suma importância para a realização do projeto intitulado de "Efeitos do tratamento agudo de meta-clorofenilpiperazina (mCPP) e da associação mCPP/ metilenedioximetanfetamina sobre a mobilização de leucócitos e perfil de citocinas."

Prof. Msc. Rafael Lanaro

Farmacêutico/CCI/FCM/UNICAMP

Lara Lombardi

Curriculum Lattes

Dados Pessoais

Nome Lara Lombardi
Filiação Moacyr de Oliveira Lombardi Jr. e Kátia Nunes da Costa Neves Lombardi
Nascimento 06/07/1986 - Itu/SP - Brasil
Carteira de Identidade 43.494.324-1 SSP - SP - 08/11/2000
CPF 35177490874

Endereço residencial Av. Jaguaré, 249, Bloco M/ Apto 78
Jaguaré, São Paulo
05346-000, SP – Brasil
Telefone: 11 8121 3281 / 11 4024 4306

Endereço profissional Universidade de São Paulo - USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bl 13B
05508-900 São Paulo - SP Brasil

Endereço eletrônico
e-mail para contato : lara.lombardi@usp.br
e-mail alternativo : laraunicamp@gmail.com

Formação Acadêmica/Titulação

2009 - Atual Mestrado – Toxicologia e Análises Toxicológicas
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Efeitos da meta-clorofenilpiperazina (mCPP) sobre os mecanismos da mobilização leucocitária: Estudos *in vivo* e *in vitro*
Orientador: Regina Lúcia de Moraes Moreau
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
(CAPES)

2004 - 2008 Graduação – Bacharelado em Farmácia.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
Título: Identificação da exposição pré-natal à cocaína em amostras de recém-nascidos através da espectroscopia de RMN.
Orientador: Roberto Rittner
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Formação complementar

2006 - 2006 I Semana Acadêmica de Farmácia (9 horas)
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil

2006 - 2006 Desenvolvimento de Fármacos (6 horas)
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil

2006 - 2006 Encapsulamento de Fármacos (6 horas)
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil

2006 - 2006 Fitoquímica e farmacologia de produtos farmacêuticos de origem natural (6 horas)
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil

- 2006 - 2006** IV Semana Acadêmica de Química (6 horas)
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
- 2007 - 2007** I Curso de Drogas de Abuso – Centro de Controle de Intoxicações (8 horas)
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
- 2008 - 2008** III Semana Acadêmica de Farmácia (9 horas)
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
- 2009 - 2009** Fórum de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (8 horas), Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2009 - 2009** Escola de Altos Estudos em Toxicologia – Universidade de São Paulo – FCF/USP/RP
Ribeirão Preto, SP, Brasil – 30/11/2009 a 11/12/2009.
- 2011 - 2011** IV Latin America Risk Assessment Workshop – SBTtox & IUTOX
Águas de São Pedro, SP, Brasil – 30/03/2011 a 11/04/2011

Atuação profissional

1. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

03/2006 – 07/2007 Vínculo: Iniciação Científica no Laboratório de Físico-Química Orgânica, Instituto de Química (IQ).

Bolsista CNPq; Projeto científico relacionado à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, Química Orgânica e Toxicologia. Execução de trabalhos em bancada e trabalhos com softwares relacionados à química orgânica.

2. Meril – A Merck Sharp & Dohme and Sanofi-Aventis Company

01/2008 – 12/2008 Vínculo: Estagiária

Atuação na área de Qualidade Assegurada, Controle e Validação de Estabilidade.

Desenvolvimento de atividades relacionadas à Estabilidade de produtos farmacêuticos, Validação e Qualificação de produtos, matérias-primas e métodos; desenvolvimento de projetos relacionados à área da Qualidade.

3. Biolab Sanus Farmacêutica Ltda.

10/2011 – Atual Vínculo: Analista Pleno – Depto. de Desenvolvimento Pré-Clinico e Prospecção – Área de PD&I

Atuação na área de Pesquisa e Desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos e dermocosméticos. Prospecção e análise de projetos para desenvolvimento de novos produtos. Avaliação técnica inicial e posterior acompanhamento e monitoria do

andamento dos projetos até o início das fases de teste clínico.

Áreas de atuação

1. Toxicologia
 2. Farmacologia
 3. Imunotoxicologia/ Imunofarmacologia
-

Idiomas

Inglês	Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem
Francês	Compreende Razoavelmente , Fala Pouco, Escreve Pouco, Lê Razoavelmente
Português	Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Artigo

S. Pedersoli, L. Lombardi, N. F. Höeher, R. Rittner. Assignments of ^1H and ^{13}C NMR spectral data for benzoylecgonine, a cocaine metabolite. *Spectroscopy Letters*, v. 41, p. 101-103, 2008.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. LOMBARDI, Lara; PEDERSOLI, Susimaire; HÖER, Nelci F.; RITTNER, Roberto. Assignments of ^1H and ^{13}C NMR spectral data for benzoylecgonine, a cocaine metabolite In: 11th Nuclear Magnetic Resonance Users Meeting, 2007, Angra dos Reis - RJ.
Resumos/11th Nuclear Magnetic Resonance Users Meeting. Angra dos Reis, RJ, 2007.

2. LOMBARDI, Lara; PEDERSOLI, Susimaire; HÖER, Nelci F.; RITTNER, Roberto. Identification of the exposition to cocaine through ^1H NMR spectroscopy In: 6th International Congress of Pharmaceutical Science, 2007, Ribeirão Preto - SP.
Resumo/6th International Congress of Pharmaceutical Science. Ribeirão Preto, SP, 2007.

3. LOMBARDI, Lara; PEDERSOLI, Susimaire; HÖER, Nelci F.; RITTNER, Roberto. Identificação da exposição pré-natal à cocaína em amostras de recém-nascidos através da espectroscopia de RMN. In: XV Congresso Interno de Iniciação Científica, 2007, Campinas – SP.
Resumo/ XV Congresso Interno de Iniciação Científica, Campinas, SP, 2007.

Apresentação de Trabalho

1. LOMBARDI, Lara; PEDERSOLI, Susimaire; HÖER, Nelci F.; RITTNER, Roberto. Assignments of ^1H and ^{13}C NMR spectral data for benzoylecgonine, a cocaine metabolite In: 11th Nuclear Magnetic Resonance Users Meeting, 2007, Angra dos Reis - RJ.

2. LOMBARDI, Lara; PEDERSOLI, Susimaire; HÖER, Nelci F.; RITTNER, Roberto. Identification of the exposition to cocaine through ^1H NMR spectroscopy In: 6th International Congress of Pharmaceutical Science, 2007, Ribeirão Preto - SP.

3. LOMBARDI, Lara; PEDERSOLI, Susimaire; HÖER, Nelci F.; RITTNER, Roberto. Identificação

da exposição pré-natal à cocaína em amostras de recém-nascidos através da espectroscopia de RMN. In: XV Congresso Interno de Iniciação Científica, 2008, Campinas – SP.

4. LOMBARDI, Lara; HEBEDA, Cristina B.; FARSKY, Sandra H. P.; MOREAU, Regina L. M. Effects of acute treatment with 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP) in the leukocyte traffic in rats. In: 42º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2010, Ribeirão Preto – SP.

5. LOMBARDI, Lara; HEBEDA, Cristina B.; FARSKY, Sandra H. P.; MOREAU, Regina L. M. Effects of acute treatment with 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP) in the leukocyte traffic in rats. In: XLV Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, 2010, São Paulo – SP.

6. LOMBARDI, Lara; HEBEDA, Cristina B.; FARSKY, Sandra H. P.; MOREAU, Regina L. M. Efeitos do tratamento com 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP) sobre a migração neutrofílica *in vitro*. In: XVII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2011, Ribeirão Preto – SP.

Produção Técnica

Demais produções técnicas

1. LOMBARDI, Lara

Identificação da exposição pré-natal à cocaína em amostras de recém-nascidos através da espectroscopia de RMN, 2007. (Relatório de pesquisa)

Eventos

Participação em eventos

1. **11th Nuclear Magnetic Resonance Users Meeting**
2. **6th International Congresso f Pharmaceutical Science**
3. **XV Congress Interno de Iniciação Científica PIBIC/CNPq**
4. **Escola de Altos Estudos em Toxicologia – Ribeirão Preto, SP, Br**
5. **42º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Ribeirão Preto – SP (18/10/10 – 21/10/10).**
6. **XLV Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, São Paulo – SP (18/10/10 – 21/10/10).**
7. **IV Latin America Risk Assessment Workshop**
8. **XVII Congresso Brasileiro de Toxicologia**