FREDERICO AZEVEDO DA COSTA PINTO

**Correlatos neurais e comportamentais da asma alérgica
experimental em camundongos**

São Paulo

2004

FREDERICO AZEVEDO DA COSTA PINTO

**Correlatos neurais e comportamentais da asma alérgica
experimental em camundongos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Patologia Experimental e Comparada da
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
da Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Benjamin Eurico Malucelli

Co-orientador:

Prof. Dr. Momtchilo Russo

São Paulo

2004

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1422 FMVZ	<p>Pinto, Frederico Azevedo da Costa</p> <p>Correlatos neurais e comportamentais da asma alérgica experimental em camundongos / Frederico Azevedo da Costa Pinto. - São Paulo : F. A. C. Pinto, 2004.</p> <p>133 f. : il.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2004.</p> <p>Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada.</p> <p>Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Benjamin Eurico Malucelli.</p> <p>Co-orientador: Prof. Dr. Momtchilo Russo.</p> <p>1. Neuroimunomodulação. 2. Comportamento animal. 3. Asma. 4. Mastócitos. 5. IgE. Título.</p>
----------------	--

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Ativação neuronal induzida por reação alérgica pulmonar", Protocolo nº376/2003, utilizando 200 camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Benjamin Eurico Malucelli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26/11/2003.

(We certify that the Research "Neuronal activation driven by an allergic response initiated in the airway tract" protocol number 376/2003, utilizing 200 mice, under the responsibility of Prof. Dr. Benjamin Eurico Malucelli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 11/26/2003, meeting.

São Paulo, 27 de novembro de 2003

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PINTO, Frederico Azevedo da Costa

Título: Correlatos neurais e comportamentais da asma alérgica experimental em camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Patologia Experimental e Comparada da
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
da Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

À Carol, por todo amor, compreensão e paciência, inestimáveis e intermináveis.

Aos meus pais e irmãos, por todo o apoio e confiança em todas as minhas decisões, por mais esdrúxulas e aparentemente irresponsáveis que possam ter parecido.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Benjamin Eurico Malucelli, Bijo, por todo apoio incondicional e irrestrito desde o início. Sua confiança nas minhas decisões (nem sempre as melhores) foi essencial para o rumo que minha vida tomou após minha chegada ao Departamento de Patologia. Os fins de tarde em sua companhia reafirmaram minha vontade de fazer ciência.

Ao Professor Luiz Carlos de Sá Rocha, Lú, pela grande amizade dentro e fora dos laboratórios. Em um momento em que a vida científica se volta fortemente para a competitividade e praticidade, ele colabora para a manutenção dos nossos pés no chão, mas com a cabeça ainda nas nuvens, onde acho que deve ficar.

Ao Professor João Palermo Neto, por me acolher em seu Grupo de Neuroimunomodulação, dando uma nova injeção de ânimo em minha vida e carreira.

Ao Professor Momtchilo Russo, Mom, por me apoiar em todas as situações em que precisei, e particularmente no meio do meu doutoramento. A confiança por ele depositada em mim foi condição imperativa para meu recomeço no laboratório. Na figura de sua técnica Eliane Gomes, colaborou nas dosagens de anticorpos e nos protocolos imunológicos.

Ao Professor Luiz Roberto Giorgetti de Britto, pela atenção e auxílio sempre ilimitados. Na figura de seu técnico Adilson Alves, colaborou de forma imprescindível na marcação e análise de atividade do sistema nervoso central.

Às Professoras Silvia Renata Gaido Cortopassi e Denise Tabacchi Fantoni pelo apoio no protocolo anestésico utilizado neste estudo.

Aos alunos, funcionários e docentes do Departamento de Patologia (VPT) da FMVZ-USP. Todos que vivenciaram o VPT em algum momento de sua vida sentem-se ligados a ele pelo resto dela. No meu caso, a atração já dura dez anos, e não me sinto propenso a interrompê-la. O auxílio oferecido por todas as pessoas, da secretaria ao biotério, passando

por todos os outros setores e laboratórios, torna a experiência de trabalhar lá um prazer adicional na vida científica de quem permanece na Universidade de São Paulo.

Ao Grupo de Neuroimunomodulação do VPT. Por ter experimentado outros ambientes científicos, pude perceber a grande vantagem de se trabalhar em um lugar em que a colaboração e o apoio mútuos ainda se sobrepõe à competitividade da vida científica.

A todos meus companheiros da turma de veterinários formados em 1996 (57^a). Apesar de rumos diferentes tomados por muitos, a amizade permanece, e torço para que seja eterna. Em especial, ao meu grande amigo Basso, com o qual compartilho não apenas a turma, mas o prazer pela discussão de ciência nos laboratórios e bares espalhados por aí, de onde certamente já saíram e saem muitas coisas malucas, e talvez até algumas aproveitáveis.

Aos meus amigos de discussões diversas Daniel Natô, Daniel Mucida, Alex, Thiago e Cris, Kojakson André Gordus e Patty, Vanessa, Eva, Monikinha, Dario, Dudu, Fábio, Ricardão e Gabi, Daniel, Elaine, Glaucie, Laércio Juca, Ricardo Jibóia, Gargamel e Lúcia, Mário e Vivi, Sadyzola e Celina, Fábio e Thaís, Renata e Edu, Jú, Mirinda, Marcinho, Daniel Via e Débora Knorr e vários outros que certamente esqueci, mas que fizeram e fazem, cada um da sua maneira particular, minha vida bem mais agradável e interessante.

Ao pessoal do Hospital de Equinos da FMVZ-USP. Voltar a freqüentar esse lugar tão pitoresco foi uma agradável surpresa na minha vida, a ponto de um não achar estranho passar a noite ajudando a trocar soro de um cavalo com dor de barriga. Só quem já fez isso percebe o valor das pessoas que optam por se dedicar tanto ao cuidado desses bichos.

Aos funcionários da Biblioteca da FMVZ-USP, sempre dispostos a ajudar de qualquer maneira possível na recuperação de informações e na organização daquela gerada em nossa faculdade. Sua atividade é essencial para o bom andamento da ciência.

À família da Carol, que recebi alegremente como um grande dote de casamento. Senti minha família crescendo de uma vez só, um fato reconfortante aos trinta anos de idade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (projetos 99/03778-3, 99/04228-7, 00/07127-6 e 01/13510-0).

“Stress is not everywhere. Every twinge of dysfunction in our bodies is not a manifestation of stress-related disease. It is true that the real world is full of bad things that we can finesse away by altering our outlook and psychological makeup, but it is also full of awful things that cannot be eliminated by a change in attitude, no matter how heroically, fervently, complexly, ritualistically we may wish. Once we are actually sick with the illnesses, the fantasy of which keeps us anxiously awake at two in the morning little about our psychological outlook is likely to help. [...] But amid this caution, there remains a whole realm of health and disease that is sensitive to the quality of our minds – our thoughts and emotions and behaviors. And sometimes whether we become sick with the diseases that frighten us at two in the morning will reflect this realm of mind. It is here that we must turn from the physicians and their ability to clean up the messes afterward, and recognize our own capacity to prevent some of these problems beforehand in the small steps with which we live our everyday lives.”

Robert M. Sapolsky

Why zebras don't get ulcers. 2. ed.

New York: W. H. Freeman and
Company, 2002. 434 p.

RESUMO

PINTO, F. A. C. **Correlatos neurais e comportamentais da asma alérgica experimental em camundongos.** [Neural and behavioral correlates of experimental allergic asthma in mice]. 2004. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Foram estudadas as áreas do sistema nervoso central de camundongos ativadas pela exposição de animais alérgicos ao antígeno (ovalbumina – OVA) bem como uma resposta adaptativa desencadeada a partir da nebulização de OVA em uma caixa de esQUIVA adaptada. Animais imunizados apresentam aumento de atividade do núcleo paraventricular do hipotálamo e do núcleo central da amígdala após um único desafio intranasal com OVA e evitam entrar no compartimento previamente associado a nebulização com OVA. A ativação das áreas descritas acima é compatível com a elaboração de uma resposta adaptativa (evitar o contato com o antígeno). Animais tornados tolerantes à OVA no dia da imunização primária não apresentam atividade dos núcleos citados nem desenvolvem aversão ao local do desafio, demonstrando que essas alterações são dependentes de anticorpos IgE anti-OVA. Camundongos da linhagem C3H/HeJ, que não desenvolvem inflamação alérgica pulmonar, apresentam as mesmas respostas observadas em camundongos BALB/c, sugerindo que o processo inflamatório não é relevante nesse modelo. O tratamento prévio com cromoglicato dissódico suprime a ativação no SNC e a indução de aversão associada ao desafio com OVA. Esses fatos sugerem em conjunto que a desgranulação de mastócitos mediada por IgE em vias aéreas ative o SNC e desencadeie as alterações comportamentais descritas.

Palavras-chave: Neuroimunomodulação. Comportamento animal. Asma. Mastócitos. IgE.

ABSTRACT

PINTO, F. A. C. **Neural and behavioral correlates of experimental allergic asthma in mice.** [Correlatos neurais e comportamentais da asma alérgica experimental em camundongos]. 2004. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Activation of the central nervous system (CNS) was evaluated following ovalbumin (OVA) challenge in a murine model of asthma, as well as an adaptive response triggered by OVA nebulization during an avoidance test. Immunized animals showed increased activity in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and central nucleus of the amygdala after a single intranasal OVA challenge. Furthermore, they avoid a compartment previously associated with the antigen. Activation of these brain areas is compatible with the display of adaptive responses (avoiding contact with the antigen). Induction of immunological tolerance along with primary immunization precludes both CNS activation and avoidance behavior, showing that these responses are IgE-mediated. Mice from the C3H/HeJ strain do not develop lung allergic inflammation but show a similar pattern of brain activity after OVA challenge and mount the same avoidance reaction seen in BALB/c mice, suggesting that an inflammatory infiltrate in the lung is not required in these responses. Prior treatment with disodium cromoglycate inhibits CNS activation and avoidance behavior. Collectively, these findings demonstrate a role of IgE-mediated mast cell degranulation in signaling an allergic response initiated in the airways to the mouse brain.

Key words: Neuroimmunomodulation. Animal behavior. Asthma. Mast cells. IgE.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
AHR	hiperreatividade de vias aéreas
BAL	lavado broncoalveolar
CeA	núcleo central da amígdala
COX	cicloxygenase
CRF	fator liberador de corticotrofina
CVO	circunventricular
ELISA	ensaio imunoadsorvente associado a enzima
HPA	hipotálamo-pituitária-adrenal
i.c.v.	intracerebroventricular
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
LPS	lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas
LT	leucotrienos
NA	noradrenalina
NKA	neurocinina
OPD	orto-fenilenodiamina
OVA	ovalbumina
PAF	fator de agregação plaquetária
PB	tampão de fosfatos
PBS	salina tamponada com fosfatos
PFA	paraformaldeído
PG	prostaglandina
PVN	núcleo paraventricular do hipotálamo
SI	sistema imunológico
SLE	lupus eritematoso sistêmico
SNA	sistema nervoso autônomo
SNC	sistema nervoso central
SP	substância P
TLR	receptor semelhante ao <i>toll</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	Neuroimunomodulação	15
2.2	Asma	34
3	OBJETIVO	51
3.1	Objetivos específicos	51
4	MATERIAL E MÉTODO	52
4.1	Animais	52
4.2	Imunização e desafio com OVA	52
4.3	Avaliação da atividade locomotora em campo aberto	53
4.4	Indução de tolerância oral a OVA	53
4.5	Tratamento com cromoglicato dissódico	54
4.6	Marcação imunoistoquímica de Fos	54
4.7	Teste de esquiva passiva	56
4.8	Determinação de IgG1 anti-OVA	57
4.9	Determinação de IgE anti-OVA	58
4.10	Avaliação da permeabilidade vascular pelo extravazamento de azul de Evans	58
4.11	Tratamento estatístico dos dados obtidos	59
5	RESULTADOS	60
5.1	Experimento 1	60
5.1.1	Animais imunizados apresentam anticorpos específicos anti-OVA	61
5.1.2	Camundongos alérgicos têm aumento de expressão de Fos no PVN e CeA	62
5.1.3	Locomoção não é alterada pelo desafio com OVA em animais imunizados	65
5.1.4	Animais imunizados evitam o compartimento escuro associado ao desafio com OVA	66
5.2	Experimento 2	67
5.2.1	Tolerância oral foi capaz de impedir a produção de anticorpos anti-OVA	68
5.2.2	Tolerância oral impediu a expressão de Fos no PVN e CeA induzida pela OVA	69
5.2.3	Animais tolerantes não evitam o compartimento escuro associado ao desafio com OVA	71

5.3	Experimento 3	72
5.3.1	Camundongos C3H/HeJ imunizados desenvolvem anticorpos anti-OVA	73
5.3.2	Camundongos C3H/HeJ imunizados apresentam aumento de atividade do PVN e CeA frente ao desafio com OVA, à semelhança daquele observado nos animais BALB/c	74
5.3.3	Animais C3H/HeJ evitam o compartimento escuro associado ao desafio com OVA	76
5.4	Experimento 4	77
5.4.1	Tolerância oral no dia 0 foi capaz de impedir a produção de anticorpos IgE, mas não IgG1 anti-OVA	78
5.4.2	Tolerância oral no dia 0 impediu o aumento de expressão de Fos no PVN e CeA induzido pela OVA, à semelhança da tolerância iniciada no dia -7	79
5.4.3	Animais submetidos à indução de tolerância com início no dia 0 não evitam o compartimento escuro que fora associado ao desafio com OVA	82
5.5	Experimento 5	83
5.5.1	Tratamento com cromoglicato não altera a produção de anticorpos anti-OVA	84
5.5.2	Cromoglicato inibiu a expressão de Fos no PVN e CeA induzida pela OVA	85
5.5.3	Animais tratados previamente com cromoglicato não evitam o compartimento escuro que fora associado ao desafio com OVA	88
5.5.4	Cromoglicato diminuiu o aumento de permeabilidade vascular induzido pelo desafio com OVA no pulmão de animais previamente imunizados	89
6	DISCUSSÃO	91
7	CONCLUSÕES	110
	REFERÊNCIAS	111
	APÊNDICE	132

1 INTRODUÇÃO

Descrições de influências mútuas entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema imunológico (SI) representam uma vasta, porém muitas vezes controversa literatura. Apenas nas últimas décadas, com a sistematização da pesquisa nessa área, chamada a partir de então de Neuroimunomodulação, o conhecimento nessa área tem avançado de forma organizada, gerando uma massa de dados que vem comprovando, gradativamente e de forma inequívoca, a importância dessa interação para o entendimento de processos fisiológicos e patológicos.

Dentre as doenças descritas, até de forma anedótica, como *psicossomáticas*, ou que possuem um importante componente emocional envolvido em seu curso, certamente a asma alérgica figura como uma das principais. Relatos de pacientes apresentando crises quando expostos à imagem daquilo a que são alérgicos, ou então de crises despertadas no meio de situações *estressantes* são comuns em humanos. Durante muito tempo a asma foi, inclusive, descrita como um processo puramente psicológico, relacionado a indivíduos neuróticos.

Recentemente, estudos bem estruturados têm demonstrado que tais relações entre estados emocionais alterados e asma alérgica existem de fato, e que tanto as crises podem ser despertadas por estímulos percebidos através do SNC, quanto reações alérgicas despertadas nas vias aéreas podem gerar alterações emocionais e comportamentais. Para a ocorrência de tal interação, uma via de sinalização entre a alergia em vias aéreas e o SNC deve obrigatoriamente existir.

Este trabalho enfoca, por meio da utilização de um modelo murino de asma alérgica, quais áreas do SNC são ativadas frente à exposição ao alérgeno, como tal exposição pode colaborar para a elaboração de uma resposta adaptativa, ou seja, que favoreça o organismo, assim como alguns dos componentes importantes para que essa resposta ocorra.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Neuroimunomodulação

Nas últimas décadas a interação entre o sistema imunológico (SI) e o sistema nervoso central (SNC) têm despertado o interesse de inúmeros grupos de pesquisa, o que resultou na criação de uma grande área conhecida, de modo mais amplo, como Neuroimunomodulação, a qual se presta a estudar os mecanismos por meio dos quais os sistemas citados podem trocar informações, resultando em influência mútua, com possíveis implicações fisiológicas e patológicas.

A compreensão dos mecanismos fisiológicos importantes na regulação dos sistemas imunológico e nervoso tem constituído o principal foco de atenção de grande parte da pesquisa biomédica durante muito tempo. Porém, muita da atenção despendida anteriormente para o entendimento destes processos de maneira fragmentada cedeu espaço para o estudo das complexas relações existentes entre eles, pois a percepção de que fazem parte de uma rede de controle muito mais ampla veio à tona.

A influência da atividade do sistema neuroendócrino sobre o sistema imunológico foi explicitada por Hans Selye em um artigo que se tornou um marco na história do estresse. Selye descreveu o desenvolvimento de uma síndrome decorrente da exposição a um conjunto muito diversificado de estímulos lesivos (ou nocivos) que incluiu exposição ao frio, injúria tecidual, excesso de exercícios, intoxicações e outros. Os achados característicos dessa síndrome eram hipertrofia de glândulas adrenais, úlceras gástricas e, curiosamente, atrofia de órgãos linfóides, incluindo timo, baço e linfonodos. Como tais achados eram independentes do agente empregado, Selye concluiu que representavam uma resposta orgânica à injúria,

denominando-os coletivamente de ‘síndrome de adaptação geral’, que posteriormente passou a ser chamada de estresse. Desse trabalho nascia dois conceitos fundamentais sobre o estresse: 1) a resposta aos estressores parecia adaptativa, representando uma tentativa do organismo de acomodar-se a uma nova situação, e 2) não importava o estímulo, a resposta era estereotipada (SELYE, 1936). Como essa síndrome pode ser gerada por estímulos físicos e psicológicos, e tem decorrências tanto comportamentais quanto endócrinas, incluindo influência sobre a atividade de órgãos linfóides, e conseqüentemente sobre o sistema imunológico, parece natural supor que o SNC e o SI interajam na preparação do organismo para acomodar mudanças impostas pelo estressor.

Nascia então um dos braços da neuroimunomodulação: o estudo dos efeitos da atividade do SNC e de quaisquer fatores que possam influenciá-la (estímulos ambientais, fármacos ou substâncias tóxicas, lesão ou estimulação direta de áreas do SNC, estressores dos mais variados), sobre diversos parâmetros da resposta imunológica em humanos ou animais de experimentação. Um dos marcos nesta área é a descrição realizada por Bartrop e colaboradores (BARTROP et al., 1977) de uma diminuição da atividade de células T derivada de um situação de estresse psicológico (o luto por perda de seu companheiro) com uma característica notável já na época em que foi descrita: de modo aparentemente independente do sistema endócrino, visto que os pacientes em luto não diferiam de seus controles quanto aos níveis circulantes de vários hormônios, incluindo-se glicocorticóides. Resultados recentes de nosso laboratório somam-se aos descritos acima: camundongos que conviveram com animais doentes (portadores da forma ascítica do tumor transplantável de Ehrlich) por 11 dias desenvolveram leucopenia e, apesar de apresentarem níveis normais de corticosterona, se mostraram mais propensos ao desenvolvimento do mesmo tumor experimental, ao fim do período de convívio com o companheiro doente (MORGULIS et al., 2004). Após este trabalho pioneiro, basicamente duas abordagens foram empregadas para

enfocar de modo direto a importância de algumas áreas do SNC no controle do sistema imunológico: a estimulação direta de áreas específicas do SNC pela implantação de eletrodos ou a lesão experimental de certos núcleos do SNC seguida do estudo da repercussão desta lesão sobre parâmetros de respostas imunológicas induzidas nesses animais.

O grupo de Vlajkovic utilizou a estimulação elétrica do hipotálamo lateral e área tegmental ventral em ratos como modelo, avaliando a seguir como esses animais reagiriam a imunização com hemácias de carneiro ou albumina bovina, e observaram uma estimulação da produção de anticorpos contra ambos (VLAJKOVIC et al., 1994). Mais tarde, o mesmo grupo demonstrou que eletrodos implantados em outra área, a substância cinzenta periaquedutal, notadamente importante no controle descendente da nocicepção e envolvida na geração de respostas aversivas, podem ter efeitos opostos de acordo com o nível de controle que os animais tinham sobre seus disparos: naquele grupo em que os animais podiam interromper a atividade dos eletrodos, a produção de anticorpos contra albumina bovina foi maior que em animais controles; nos animais sem a opção de interromper a descarga, a produção estava diminuída (VLAJKOVIC et al., 1994).

A abordagem oposta à estimulação elétrica também se mostrou extremamente interessante na compreensão da influência de núcleos do SNC sobre respostas imunológicas em curso: as lesões experimentais. Nesse sentido, a contribuição do grupo de Jankovic foi muito relevante, ao demonstrar que lesões do locus ceruleus, núcleo do tronco encefálico com a maior concentração de neurônios noradrenérgicos do SNC, levam a diminuição da produção de anticorpos contra albumina bovina, redução do número de células T CD4+ circulantes, atrofia do timo e supressão de hipersensibilidade tardia a albumina (JOVANOVA-NESIC; NIKOLIC; JANKOVIC, 1993; NIKOLIC; JOVANOVA-NESIC; JANKOVIC, 1993). Esses fatos, corroborados pelas descrições de inervação simpática de órgãos linfóides (FELTEN et al., 1985), pela influência dessa inervação sobre a maturação de

células T, e pela presença de receptores β -adrenérgicos em linfócitos – e com distribuição diferente entre subtipos dessas células, entre outros fenômenos (ELENKOV et al., 2000), reforçam a importância do sistema nervoso simpático sobre a evolução de respostas imunológicas.

Ainda, outro modo de abordar a influência do SNC sobre o SI foi o condicionamento de respostas imunológicas, utilizado com maestria pelos pesquisadores Robert Ader e Nicholas Cohen na década de 70. Descreveram o condicionamento de um efeito imunossupressor, cujo estímulo incondicionado, a ciclofosfamida (fármaco com atividade antimitótica em linfócitos) foi pareado a uma solução adocicada com sacarina (estímulo condicionado); a simples reapresentação do estímulo condicionado foi capaz de inibir a produção de anticorpos contra hemácias de carneiro (ADER; COHEN, 1975). Posteriormente, a relevância de tal condicionamento foi testada em um modelo murino de lupus eritematoso sistêmico (SLE), em que camundongos New Zealand híbridos, um cruzamento no qual todas as fêmeas nascidas desenvolvem SLE, foram submetidos ao mesmo tipo de condicionamento e tratados com o estímulo condicionado por várias semanas, o que resultou em uma latência muito maior para o início da proteinúria e de mortes decorrentes do SLE (ADER; COHEN, 1982). Relevante para o presente trabalho foi o relato do condicionamento da atividade de mastócitos sensibilizados com injeções repetidas de OVA em ratos (MACQUEEN et al., 1989). Os autores utilizaram o pareamento das injeções de OVA com estímulos audiovisuais e mediram então os níveis de uma protease específica de mastócitos após a reapresentação do estímulo condicionado, encontrando-os nos animais que receberam apenas o estímulo condicionado à semelhança daqueles observados em animais que haviam recebido novamente o antígeno; ambos estavam acima dos encontrados em animais que haviam recebido o antígeno e o estímulo audiovisual de forma não pareada, ou seja, não condicionados. Ainda, a reapresentação de um estímulo previamente condicionado

com a imunização com lisozima de ovos de galinha (HEL), em solução salina, foi capaz de induzir uma resposta imunológica secundária (avaliada pelos níveis de IgG anti-HEL) maior do que aquela vista em animais que não passaram pelo condicionamento, apesar de inferior aos animais que receberam o reforço com o antígeno ao invés do estímulo condicionado (ALVAREZ-BORDA et al., 1995), replicado posteriormente por outro grupo (MADDEN et al., 2001).

O grupo mexicano de Alvarez-Borda, Ramirez-Amaya e Bermudez-Rattoni (1999) foi ainda mais longe na compreensão dos mecanismos envolvidos na modulação da resposta humoral pelo condicionamento somando as duas abordagens já descritas. Utilizando estudos com lesões no SNC, descreveram que a destruição do córtex insular, região com conexões recíprocas com o núcleo do trato solitário (ITO, 1992) e com o sistema límbico, incluindo a amígdala (KRUSHEL; VAN DER KOOY, 1988), impede o desenvolvimento de aversão condicionada (GARCIA et al., 1985), assim como a supressão condicionada da hemaglutinação de hemácias de carneiro ou a produção de anticorpos contra ovalbumina (RAMIREZ-AMAYA et al., 1996) ou da estimulação condicionada da produção de anticorpos anti-HEL, em animais com lesões nas mesmas áreas, ou com destruição da amígdala (RAMIREZ-AMAYA; BERMUDEZ-RATTONI, 1999). É importante salientar que em nenhum dos casos descritos as lesões do SNC interferiram com a produção normal de anticorpos após as imunizações, e sim modularam as alterações condicionadas de tais respostas imunológicas.

As alterações no SNC, e suas conseqüentes influências sobre o comportamento animal, decorrentes de reações imunológicas perfazem a outra grande área de estudo da neuroimunomodulação. Esta se presta então a compreender de que maneira sinais provenientes do sistema imunológico sejam eles anticorpos, citocinas, mediadores lipídicos ou outros quaisquer, são transmitidos ao SNC e quais as conseqüências dessa sinalização,

incluindo tanto o substrato neural de tais mudanças (áreas influenciadas, sistemas de neurotransmissão utilizados e mecanismos moleculares dessa interação) quanto as decorrências fisiológicas e comportamentais advindas da relação entre o SNC e o SI.

Deste modo, logo após evidenciar que a imunização com diferentes antígenos causa alterações drásticas nos níveis circulantes de alguns hormônios, em particular um aumento de até três vezes no nível de corticosterona em ratos (BESEDOVSKY et al., 1975) Hugo Oscar Besedovsky e colaboradores descreveram uma correlação temporal estreita entre a produção de anticorpos e a atividade elétrica de neurônios individuais do hipotálamo ventromedial de ratos imunizados com diferentes antígenos (BESEDOVSKY et al., 1977). É importante ressaltar que a relação entre os fatos citados, produção de anticorpos e atividade elétrica hipotalâmica, não parecia simplesmente coincidência temporal, pois animais que individualmente não responderam à imunização também não apresentaram aumento de atividade nessa área. Esses resultados foram replicados posteriormente (SAPHIER et al., 1987) com algum acréscimo de conhecimento e reforço sobre a importância da resposta imunológica na modulação de atividade do SNC: os autores notaram diferenças temporais na ativação da área pré-óptica e do núcleo paraventricular do hipotálamo entre respostas primárias e secundárias aos mesmos antígenos. Alterações neuroquímicas que se seguiram às descrições eletrofisiológicas parecem confirmar as alterações de atividade do hipotálamo derivadas de uma resposta imunológica. Descrições do próprio grupo de Besedovsky relacionam diminuição do conteúdo de noradrenalina (NA) nos neurônios hipotalâmicos de animais imunizados que acompanhava o pico de produção de anticorpos, à semelhança da observação eletrofisiológica, e que podia ser reproduzido pela administração do meio de cultura de linfócitos ativados *in vitro* (BESEDOVSKY et al., 1983) reforçando a idéia de uma influência direta do SI sobre o SNC mediada por fatores solúveis secretados por células do sistema imunológico. Notaram ainda que, apesar de não tão marcante quanto no hipotálamo,

existia uma tendência de redução de NA no tronco encefálico também, o que pode ser relevante visto que nessa área existem núcleos como o do trato solitário, que recebe projeções viscerais e é responsável tanto por projeções ascendentes ao hipotálamo, quanto pela regulação de respostas autonômicas. Em seguida, maior detalhamento espacial sobre a alteração de níveis de NA após imunização de camundongos revelou uma queda de NA em particular no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) durante o pico de produção de anticorpos, sugerindo que esse núcleo esteja especialmente envolvido nos reflexos centrais decorrentes de uma resposta imunológica em andamento (CARLSON et al., 1987).

Dessa forma, postulava-se que moléculas produzidas no curso de uma resposta imunológica sinalizavam ao SNC por alguma via ainda desconhecida, mas que culminava com a ativação do hipotálamo (muito provavelmente o núcleo paraventricular) e que gerava uma alteração dos níveis circulantes de corticosterona. Rapidamente o conhecimento avançou nessa área a partir de descobertas cruciais. A descrição do fator liberador de corticotrofinas (CRF) (VALE et al., 1981), com importância marcante na regulação de mecanismos adaptativos hormonais e comportamentais, relacionados com frequência às respostas de estresse e ansiedade, esclareceu o papel do núcleo paraventricular do hipotálamo na ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), com conseqüente aumento na secreção de glicocorticóides observado em várias situações, e cujo papel imunomodulador importante já vinha sendo descrito (MUNCK; GUYRE; HOLBROOK, 1984). Somou-se a isso a descrição pelo grupo de Besedovsky da capacidade de uma molécula produzida por macrófagos ativados, identificada como IL-1, em ativar o eixo HPA de roedores com conseqüente aumento de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona (BESEDOVSKY et al., 1986) e de que essa estimulação ocorre por meio de neurônios que contém CRF, ativados pela IL-1 (BERKENBOSCH et al., 1987) levando a um aumento da concentração deste hormônio na circulação porta hipofisária (SAPOLSKY et al., 1987). Esses resultados criam

de forma elegante e inequívoca a primeira rede imunoneuroendócrina de retroalimentação que contribui para a manutenção da homeostasia: um produto de células imunológicas ativadas estimula o eixo HPA, levando a secreção de corticosterona, com conseqüente modulação da resposta inicial. A falta desse mecanismo extrínseco de imunorregulação, como demonstrado mais tarde, está relacionado à ocorrência ou piora de diversos processos patológicos (DUNN, 1995).

Partindo do princípio que há influência de mediadores originários do sistema imunológico sobre o SNC induzindo a ativação do eixo HPA, a resposta por eles desencadeada passa então a fazer parte do repertório de respostas adaptativas chamadas coletivamente de estresse, que classicamente estavam apenas relacionadas a estímulos físicos ou psicológicos. Como definido por Blalock (BLALOCK, 1984) o sistema imunológico pode funcionar como mais um sistema sensorial, só que difuso, dinâmico e em constante adaptação, capacitando o SNC a receber estímulos e mensagens que de outro modo não seriam percebidos pelas vias sensoriais clássicas.

A busca de substrato molecular que suportasse e justificasse a interação entre os sistemas neuroendócrino e imunológico foi, e continua sendo, foco de estudo de muitos grupos trabalhando em neuroimunomodulação, na tentativa de entender a ‘sintaxe’ da conversa entre esses sistemas (BLALOCK, 1994). Já é bem aceito que células do sistema imunológico possuem receptores para neurotransmissores como os β -adrenoceptores (MADDEN; SANDERS; FELTEN, 1995), assim como a capacidade de sintetizar alguns hormônios, entre eles o ACTH (BLALOCK; HARBOUR-MCMENAMIN; SMITH, 1985). Por outro lado, já se demonstrou que citocinas como a IL-1 podem ser sintetizadas dentro do SNC, com importante papel em funções ditas exclusivas do sistema nervoso, como modular emoções, comportamentos e memória (SCHNEIDER et al., 1998).

Os estudos sobre o efeito de citocinas e outras moléculas importantes na regulação de respostas imunológicas no SNC passaram a compreender duas facções ou enfoques diferentes e complementares: a tentativa de isolamento de moléculas e vias essenciais para a sinalização do SI para o SNC, e o estudo das alterações comportamentais no contexto em que se inserem, ou seja, como parte do repertório de comportamentos expressados pelos animais, pois ficava cada vez mais claro que as alterações de comportamento decorrentes da sinalização pelo sistema imunológico não se tratavam de depressão inespecífica, mas sim de um conjunto de adaptações comportamentais organizado dentro do contexto em que os animais estão inseridos, e não estranho a ele.

A primeira tentativa de estruturação conceitual acerca do comportamento de animais doentes veio de Benjamin Hart, que compilou informações de diversas espécies animais acometidos por uma ampla gama de processos patológicos diversos (HART, 1988). Ele agrupou alguns achados comuns a todas as espécies e processos estudados, que incluíam febre, letargia ou prostração, perda de apetite e diminuição do consumo de água, diminuição de locomoção em geral, mas com maior importância da queda de interesse exploratório, redução de autolimpeza (evidente em roedores) entre outros. A opinião de Hart era clara: o conjunto de alterações apresentadas por animais doentes, denominado de comportamento doentio, estava longe de ser uma depressão geral e sim correspondia a um conjunto organizado de modificações fisiológicas e comportamentais, ou seja, existe uma base biológica (e não patológica) para o comportamento de animais doentes. No mesmo trabalho são listadas possíveis vantagens (aparentemente paradoxais) de alterações comportamentais para o animal acometido, tais como diminuição do gasto fisiológico com a digestão de comida (anorexia), menor perda de calor e exposição a possíveis predadores (prostração) e geração de um ambiente menos favorável à proliferação de patógenos, que favorece a atividade de células imunológicas (febre) (HART, 1988). Mesmo se evitarmos uma análise

dos fenômenos descritos baseados na presunção de sua função, um fato torna-se claro: as alterações são adaptativas, e contribuem para uma recuperação mais rápida e para a sobrevivência do animal acometido. Dois exemplos clássicos e elegantes dessa afirmação são descritos a seguir. Lagartos, que obviamente não desenvolvem febre na acepção clássica do termo por serem pecilotermos, depois de inoculados com um patógeno bacteriano (*Aeromonas hydrophila*), procuram aumentar sua temperatura corpórea por meio da busca de locais mais aquecidos, fenômeno denominado de ‘febre comportamental’; se privados da chance de optar por esses locais quentes, apresentam níveis de mortalidade muito maiores que aqueles colocados a temperatura mais alta que a fisiológica (KLUGER; RINGLER; ANVER, 1975). Camundongos que receberam um agente infeccioso por via intraperitoneal (*Listeria monocytogenes*) e cuja anorexia foi contornada por alimentação forçada por gavagem sobreviveram, em média, metade do tempo que aqueles alimentados *ad libitum* e submetidos ao mesmo procedimento de passagem de sonda gástrica (MURRAY; MURRAY, 1979). Importante notar que todas as alterações descritas pela instalação de um processo infeccioso podem ser desencadeadas por administração de citocinas ou outros mediadores inflamatórios e imunológicos. Apesar de Hart se referir por diversas vezes ao comportamento de animais doentes, o termo ‘comportamento doentio’ foi cunhado apenas alguns anos mais tarde por Stephen Kent, trabalhando no grupo de Robert Dantzer (1992). No trabalho em que discorre sobre a compreensão dos mecanismos que geram as alterações comportamentais e possíveis interesses da indústria farmacêutica em tais mecanismos, pois permitiriam o desenvolvimento de terapias mais eficientes na reversão do estado doentio descrito, usa pela primeira vez o termo para se referir ao conjunto de alterações comportamentais que acompanham grande número de processos patológicos aparentemente sem ligação fisiopatológica; às observações de comportamentos modificados durante a doença eles adicionam alterações no padrão do sono e a perda aparente do interesse em atividades

cotidianas e positivas, tais como a busca por alimento, contato social, interesse sexual e outros, gerando um estado denominado de anedonia, caracterizado pela falta de busca do prazer somada a incapacidade aparente de percebê-lo ou apreciá-lo (KENT et al., 1992).

Nascida então da análise de processos infecciosos de várias origens, a história do comportamento doentio foi inicialmente marcada pelo estudo principalmente do efeito comportamental de produtos bacterianos – e dentre eles certamente o lipopolissacarídeo de parede de bactérias gram-negativas, ou LPS, foi e é o mais utilizado – e de citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF α com relevância bem descrita no processo inflamatório. Daquele ponto em diante outras situações patológicas como crescimento de neoplasias e doenças autoimunes foram incluídas na ampla gama dos processos que podem gerar alterações comportamentais, somando-se ao que já se havia descrito para os processos infecciosos.

A criação do arcabouço teórico do conceito de comportamento doentio foi precedida de uma enxurrada de estudos sobre os efeitos comportamentais de citocinas e do LPS. Esse conjunto de estudos abordava praticamente todos os componentes do comportamento doentio, gerando uma vasta, porém controversa literatura. A redução induzida por administração de LPS no consumo de alimentos (MCCARTHY; KLUGER; VANDER, 1984) se dava mediante a produção de IL-1 estimulada por esse (MCCARTHY; KLUGER; VANDER, 1985), fenômeno confirmado em várias espécies de animais de experimentação e mediante outros estímulos, como a infecção com vírus da influenza em camundongos (SWIERGIEL et al., 1997) e o crescimento de tumores (OPARA et al., 1995), ambos relacionados a níveis elevados de IL-1 (PLATA-SALAMAN, 1997; PLATA-SALAMAN; OOMURA; KAI, 1988). De maneira previsível, uma redução duradoura como essa descrita acima no consumo de alimentos leva à perda rápida de massa corpórea, recuperada após o restabelecimento do animal (BLUTHE; DANTZER; KELLEY, 1992; SWIERGIEL;

SMAGIN; DUNN, 1997). Experimentos utilizando a caixa multicompartimentos, descrita por Arnsten e Segal (1979) propiciaram um importante passo na compreensão da redução de dois parâmetros normalmente analisados em conjunto, a locomoção e o comportamento exploratório, induzida por LPS ou IL-1 (LARSON; DUNN, 2001). Nessa arena, doses de IL-1 que não alteram a locomoção já induziam uma redução no tempo de interação com estímulos novos (SPADARO; DUNN, 1990). Modelos que abordaram a anedonia foram também muito utilizados no estudo dos efeitos de LPS e citocinas sobre o comportamento. O consumo de soluções doces, tais como leite adocicado ou achocolatado, ou água com sacarina, normalmente considerado palatável por roedores, é extremamente reduzida quando da administração de LPS ou IL-1 (ANISMAN; MERALI, 1999; SWIERGIEL; SMAGIN; DUNN, 1997; YIRMIYA, 1996) mesmo em doses que não levam a queda do consumo de água, demonstrando a susceptibilidade de comportamentos motivados a indutores do comportamento doentio (YIRMIYA, 1996). Esse fato, aliás, vai ao encontro de uma abordagem motivacional do comportamento doentio, sustentando a importância da reorganização de prioridades frente a situações que exijam adaptações importantes.

A abordagem de Arnaud Aubert sobre o comportamento doentio sumarizou um ponto de vista corroborado por vários cientistas e mencionado aqui: as alterações de comportamento em animais doentes não são reflexo de uma depressão inespecífica e generalizada, e sim parte de uma estratégia maior com valor adaptativo (AUBERT, 1999). Deste modo, animais doentes não estão incapacitados de realizar tarefas ou de responder a estímulos ambientais, apenas não o fazem dada sua baixa prioridade em determinado momento; muda-se o contexto e talvez a resposta elaborada por um animal, mesmo doente, seja diferente. Dados experimentais suportando esse ponto de vista foram dados pelo próprio Aubert e colaboradores por meio da demonstração de que, se colocadas a uma temperatura amena (22°C), a supressão da construção de ninhos por fêmeas lactantes que receberam LPS é bem

mais drástica do que a 6°C, sugerindo que a esta temperatura, os cuidados com a prole recebem mais prioridade do que a 22°C (AUBERT; KELLEY; DANTZER, 1997). Ainda, demonstrou-se que a supressão da busca pelo leite adocicado, apesar de suprimida pela IL-1 em animais com acesso livre à comida, é muito menos afetada por esta citocina em camundongos passando por restrição calórica; desta forma, não parece haver incapacidade de buscar o alimento ofertado, apenas uma menor prioridade desta tarefa no animal alimentado normalmente (LARSON et al., 2002). Estes resultados parecem de acordo com a primeira descrição de alterações comportamentais específicas, e não advindas de depressão generalizada, induzidas por LPS em ratos (MILLER, 1964). Animais nessas condições, apesar de apresentarem diminuição da expressão de vários comportamentos, incluindo um comportamento ativo de pressionar uma barra para receber água ou comida, não apresentaram dificuldade em pressioná-la para interromper um estressor moderado (especificamente, fazer parar uma plataforma giratória sobre a qual eram colocados). Deste modo, o efeito de indutores do comportamento doentio, como citocinas, sobre o comportamento não necessariamente leva a redução de atividade geral, sendo influenciado pelo resultado da expressão (ou não) de comportamentos e sua consequência para o animal doente. Resultados recentes de nosso grupo parecem corroborar o caráter motivacional e adaptativo das alterações comportamentais em animais doentes. Daniel Cohn, estudando as alterações causadas pelo LPS em camundongos dominantes e submissos condicionados em duplas estáveis, descreveu um efeito maior dessa molécula em animais dominantes, com letargia e diminuição da busca pela interação social (que recebera solução salina) do que nos submissos, quando a situação era invertida, ou seja, o submisso recebia LPS e o dominante, solução salina (COHN, 2003). Assim, as obrigações sociais de um animal subordinado a outro dentro da dupla talvez impeça a expressão do comportamento doentio, refletindo uma maior prioridade para outras atividades nesse animal. Além disso, o modelo utilizado pelo

autor foi útil para evidenciar possíveis decorrências sociais do comportamento doentio: em algumas duplas, a administração de LPS para o animal dominante incorreu em uma desestabilização da hierarquia existente, levando a situações de conflito, nas quais o animal previamente submisso expressou comportamentos agressivos em relação ao dominante doente (incomum em duplas estáveis) chegando até embates físicos, com lesões nos camundongos previamente dominantes (COHN, 2003)¹.

Um dos campos da neuroimunomodulação com pouco consenso diz respeito às vias de sinalização do SI para o SNC. Adrian Dunn revisou e agrupou possíveis mecanismos dessa sinalização, dentre os quais se destacam: 1) a ação direta de mediadores nos locais onde a barreira hematoencefálica é mais permeável (como nos órgãos circunventriculares – CVOs – que recebem esse nome por se localizarem nas proximidades aos ventrículos cerebrais e cujo endotélio é fenestrado e sem junções oclusivas entre as células); 2) a ação de mediadores em aferências periféricas do SNC (como o nervo vago, sem sombra de dúvida o mais estudado quanto a capacidade de sinalização de respostas inflamatórias ou imunológicas para o SNC) e 3) a ação de mediadores em locais que funcionariam como interface entre o sistema imunológico e o SNC, sem a necessidade da transferência direta do mediador para dentro deste (por exemplo, citocinas se ligando a seus receptores no endotélio da microvasculatura cerebral, gerando mensageiros lipídicos que podem transitar através de barreiras, como os prostanóides) (DUNN, 2002; KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002).

No tocante a sinalização por via nervosa, muitos grupos abordaram a importância do nervo vago sobre a sinalização de LPS ou IL-1 para o SNC. Tal fato é justificado pela importância das aferências vagais na sinalização de LPS periférico para o SNC. Wan e colaboradores mostraram que animais com lesão vagal abaixo do diafragma não apresentam aumento de expressão de Fos no PVN em resposta ao LPS intraperitoneal (WAN et al.,

¹ Informação fornecida por Cohn em São Paulo, em 2003.

1994). Tais respostas podem ser devidas à presença de receptores para IL-1 nos neurônios sensitivos que formam o nervo vago, cuja ativação aumenta a atividade dessas células (EK et al., 1998); ainda, o íntimo contato entre macrófagos, células dendríticas e mastócitos e as ramificações do nervo vago fazem com que essas células, que respondem à estimulação com produção e secreção de um ampla gama de mediadores inflamatórios (incluindo citocinas, derivados do ácido araquidônico e aminas vasoativas), possam servir de ponte entre sinais locais (parácrinos), e o nervo vago (GOEHLER et al., 1999). Assim, vários experimentos buscaram o esclarecimento da importância do vago nessa via de sinalização por citocinas mediante sua eliminação cirúrgica. Tanto respostas comportamentais (BRET-DIBAT et al., 1995) quanto a febre derivada de IL-1 (WATKINS et al., 1995) se mostraram suprimidas (ao menos parcialmente) pela vagotomia subdiafragmática, que também se mostrou eficaz na prevenção da redução de NA hipotalâmica e na ativação do eixo HPA, medida pelos níveis séricos de corticosterona em ratos (FLESHNER et al., 1995). Em muitos casos, a resposta comportamental parece dissociada da endócrina, e as evidências para relevância da sinalização vagal em cada uma destas é controversa. A primeira parece mais sensível à vagotomia (KONSMAN; TRIDON; DANTZER, 2000), mas, por outro lado, em alguns casos, não parece ser relevante de modo algum (SCHWARTZ; PLATA-SALAMAN; LANGHANS, 1997).

Por outro lado, muitos efeitos centrais de mediadores inflamatórios são atribuídos a vias humorais de sinalização. Células presentes na interface entre o sangue e o SNC tais como macrófagos perivasculares e células endoteliais apresentam receptores para IL-1 e produzem, através principalmente da indução de ciclooxigenase (COX)-2 e prostaglandina E (PGE)-sintase (CAO; MATSUMURA; WATANABE, 1997; SCHILTZ; SAWCHENKO, 2002), induzem a liberação de prostaglandina (PG) E₂, o principal mediador lipídico envolvido tanto nas respostas de febre quanto na ativação do eixo HPA por citocinas

(RIVEST, 2001). Diversos parâmetros comportamentais, como a hipofagia, e orgânicos, como a febre, relacionados à administração de interleucinas ou LPS, podem ser controlados por tratamento prévio com inibidores da COX, tanto seletivos quanto tradicionais (SWIERGIEL; DUNN, 2002). A relevância da sinalização por PGE2 na ativação do eixo HPA e no controle da temperatura corporal podia ser prevista pela localização de seus receptores (EP3 e 4) em áreas do tronco encefálico (núcleos catecolaminérgicos) e do hipotálamo (PVN e área pré-óptica medial) (EK et al., 2000; OKA et al., 2000). Além disso, pode haver a produção de IL-1, induzida por LPS sistêmico, assim como por estimulação vagal (HOSOI; OKUMA; NOMURA, 2000), por macrófagos (microglia) dentro do SNC (KONSMAN; KELLEY; DANTZER, 1999; QUAN; WHITESIDE; HERKENHAM, 1998), o que explicaria a eficácia do tratamento com antagonista de receptores de IL-1 por via intracerebroventricular (i.c.v.) na prevenção de respostas comportamentais como anorexia e queda de interação social após um estímulo periférico com LPS. Apesar da possibilidade da IL-1 sintetizada nas proximidades dos CVOs e plexo coróide se propagar e alcançar alvos à distância por difusão (KONSMAN; TRIDON; DANTZER, 2000; VITKOVIC et al., 2000), hipóteses atuais incluem a ativação de vias neuronais que difundiriam o sinal gerado pela IL-1 para regiões distantes dentro do SNC. Por exemplo, a IL-1 produzida por macrófagos na área postrema (CVO localizado no tronco) pode agir em receptores neste local, ativando uma via neuronal que sinaliza ao núcleo parabraquial e, deste, para o central da amígdala. De modo semelhante, a PGE2 produzida como descrito acima estimula o PVN por meio de neurônios noradrenérgicos da área A1, culminando com a ativação do eixo HPA (DANTZER, 2001).

De maneira geral, parece que a dependência em mecanismos nervosos ou humorais na sinalização do SI para o SNC no comportamento doentio está relacionada a muitas variáveis, tais como via de administração da molécula estudada (processos localizados tendem a

depender mais de vias nervosas), parâmetro comportamental estudado (alterações endócrinas mais influenciadas por mecanismos humorais), além, obviamente, do mediador estudado e sua concentração (doses baixas não alcançam níveis séricos suficientes); porém, parece cada vez mais claro que se trata de um sistema com alta redundância, em que vários mecanismos podem gerar respostas semelhantes, e que várias respostas dependem de mais de um mecanismo de sinalização (DUNN, 2002; KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002).

Qualquer que seja a via de chegada de sinais derivados de respostas imunológicas ocorrendo na periferia, duas áreas são cruciais para a elaboração das respostas endócrinas e comportamentais características da resposta a estressores: o núcleo paraventricular do hipotálamo e o núcleo central da amígdala (MENZAGHI et al., 1993). Tomando esse fato em conjunto com a descrição de que as maiores concentrações de CRF no SNC ocorrem nestas duas áreas (GRAY, 1993), que ambas são ativadas após um estímulo estressor (HONKANIEMI et al., 1992), e que essa ativação inclui a produção de CRF (COOK, 2004), pode-se compreender o valor que o estudo dos efeitos do CRF sobre uma gama de parâmetros das respostas de estresse tem recebido nas últimas décadas (para revisões, veja DUNN; BERRIDGE, 1990; KOOB, 1999). A administração de CRF reproduz muitos parâmetros endócrinos e comportamentais observados em situações de estresse. Sua administração sistêmica ou intracerebroventricular (i.c.v.) induz ativação do eixo HPA (DUNN; BERRIDGE, 1987) e aumento de níveis de ansiedade em roedores (DUNN; FILE, 1987); a redução de atividade exploratória em camundongos estressados, por sua vez, pode ser prevenida com um antagonista de CRF (*alpha-helical* CRF₉₋₄₁, ou ahCRF) (BERRIDGE; DUNN, 1987) e a hipofagia característica do estresse pode ser reproduzida por CRF (MORLEY; LEVINE, 1982). De maneira semelhante, o ahCRF previne, ao menos parcialmente, a hipofagia induzida por estressores, pelo próprio CRF (KRAHN et al., 1986) ou ainda por IL-1 (UEHARA et al., 1989). A elevação de ACTH plasmático após a exposição

de ratos a éter pode ser prevenida por neutralização de CRF por anticorpos (RIVIER; VALE, 1982) ou por um de seus antagonistas, o ahCRF (RIVIER; VALE, 1984). A utilização de um antagonista de CRF, a antalarmina, em macacos rhesus machos separados de outros machos apenas por uma parede transparente de acrílico (uma situação de estresse social intenso) preveniu várias respostas autonômicas e endócrinas (aumento de NA, ACTH e cortisol plasmáticos e de CRF no líquido) assim como comportamentais (agressão e ansiedade) (HABIB et al., 2000). Grande parte dos estudos, no entanto, comprova a importância de um sistema formado pelo CRF e seus receptores, e não diretamente da necessidade da molécula CRF como agonista principal desse sistema – outros ligantes podem agir no lugar do CRF e serem bloqueados por seus antagonistas, em situações de estresse (WENINGER et al., 1999) – isso explicaria como, em algumas situações, a ausência do CRF não leva a alterações drásticas nas respostas comportamentais a IL-1 (DUNN; SWIERGIEL, 1999).

À semelhança do demonstrado por experimentos com condicionamento da resposta imunológica, evidenciando uma via eferente neuroimunológica, outros modelos de condicionamento reforçaram a importância do SI como aferência para o SNC, ou seja, um via sensorial difusa, como proposto por James Edwin Blalock (BLALOCK, 1984). Animais com uma doença autoimune sistêmica, o lupus eritematoso (SLE), quando expostos a um modelo de condicionamento em que uma solução palatável, leite achocolatado, é pareada com um fármaco que causa náuseas (ciclofosfamida), mas que melhora a sua doença por ser imunossupressor, não desenvolvem aversão a essa solução, como seus controles sadios (ADER; GROTA; COHEN, 1987). Além do mais, quando do oferecimento da mesma solução com ciclofosfamida diluída, passam a ingeri-la espontaneamente, em quantidade suficiente para prevenir a evolução do SLE (GROTA et al., 1990). De maneira semelhante, camundongos com alergia alimentar a OVA evitam consumi-la, mesmo que adocicada – uma solução que animais normais apreciam (CARA; CONDE; VAZ, 1994). Tais achados são

compatíveis com a noção de que o SI desregulado serviria como um estímulo para uma reorganização comportamental (optar pela ingestão de uma solução normalmente aversiva ou pela interrupção de uma solução palatável), funcionando como uma aferência para o SNC com importância adaptativa. Como proposto pelo fisiologista Michel Cabanac, talvez a percepção dos estímulos sensoriais como prazerosos ou desagradáveis dependa do que ele chamou do ‘estado interno do organismo’, sustentando que a modulação da percepção dos estímulos seja dada pela consequência que os mesmos teriam sobre a homeostase; como exemplo, pessoas alimentando-se à vontade relatam a ingestão de glicose como desagradável após um consumo de menor quantidade da mesma quando comparadas àquelas colocadas em regime de restrição calórica (CABANAC, 1971). De maneira comparável, a consequência da expressão de um comportamento sobre o estado do sistema imunológico pode funcionar como um modulador do próprio comportamento, sugerindo novamente o sistema imunológico como uma aferência do SNC.

Apesar de recente enquanto área organizada do conhecimento, a neuroimunomodulação acumulou um corpo de dados e conhecimento suficiente para justificar a idéia agora inequívoca que existem extensas relações entre o sistema imunológico e o neuroendócrino. Tais relações não devem ser desprezadas ou subestimadas em qualquer área da pesquisa biomédica, pois podem ser responsáveis por fenômenos ainda pouco compreendidos, ou considerados anedotas ou artefatos (COHEN, 2004; MAESTRONI, 2004).

2.2 Asma

A incidência de asma, entre outras doenças alérgicas, em ambientes urbanos de países desenvolvidos aumentou assustadoramente nas últimas décadas (UMETSU et al., 2002; WOOLCOCK; PEAT, 1997). Esse fato colabora para o interesse mundial na compreensão dos mecanismos envolvidos na geração deste processo e desencadeamento de crises em indivíduos asmáticos, se não apenas pela curiosidade científica, ao menos pela posição de destaque como problema emergente de saúde pública. As alergias já perfazem um percentual alto dentre os problemas de saúde que acometem os seres humanos e, destas, a asma desponta como um dos que mais gera queda de qualidade de vida e prejuízos socioeconômicos advindos de internações e baixa produtividade profissional. Apenas na década de 80, a prevalência de asma nos Estados Unidos da América (EUA) aumentou 42%, e, apesar dos avanços terapêuticos alcançados, notadamente eficazes no controle de crises em indivíduos asmáticos, a mortalidade advinda dessa doença aumentou 40% no mesmo período (UNITED STATES OF AMERICA. Centers for Disease Control, 2004). Dados brasileiros assemelham-se àqueles encontrados pelo Centro de Controle de Doenças dos EUA: a mortalidade advinda da asma dobrou no estado de São Paulo entre 1970 e 1996, com maior aumento em indivíduos jovens e provenientes de áreas urbanas, principalmente a capital (SALTO JUNIOR et al., 2002). Assim, uma melhor elucidação dos mecanismos responsáveis pela indução e manutenção da condição alérgica em asmáticos, assim como dos fatores responsáveis pelo desencadeamento de crises, merece e tem recebido grande atenção da comunidade científica.

Asma, uma palavra grega que significa ‘ofegante, com dificuldade de respirar’, foi utilizada por Hipócrates para se referir a episódios de chiados e falta de ar apresentados por alguns pacientes (GLEICH; KITA, 1997) e, durante muitos séculos, esta condição foi

relacionada a uma anormalidade intrínseca da musculatura traqueobrônquica. Apenas em 1860, em um tratado clássico sobre a asma, o fisiologista e médico Henry Hyde Salter (SALTER², 1860 apud HOLGATE, 2004), diferenciou a asma de outras causas de dificuldade respiratória pela peculiaridade de ser geralmente episódica, com períodos de remissão e com respiração normal entre as crises. Alguns anos depois, publicou relatos de várias características desta doença aceitas até hoje, tais como a geração de um ambiente pulmonar hiperresponsivo ao ar frio e exercício físico e a ocorrência de crises relacionadas a irritantes químicos, ar de certos ambientes, e até a alguns alimentos e bebidas (SALTER³, 1866 apud HOLGATE, 2004). Apesar destas descrições, de meados do século XIX, já classificaram a asma como um processo inflamatório crônico com alterações morfológicas teciduais, apenas em 1922, Huber e Koessler compilaram 15 casos fatais publicados sobre pacientes asmáticos, adicionando outros 6 casos atendidos por eles próprios ao estudo, e concluíram que, em casos fatais, a presença de entupimento de brônquios por muco, espessamento das paredes do trato respiratório, hipertrofia de musculatura lisa e infiltrado inflamatório eram característicos (HUBER; KOESSLER⁴, 1922 apud ELIAS et al., 1999).

A asma é atualmente definida como uma doença respiratória crônica, caracterizada por obstrução intermitente de vias aéreas, com uma importante fase inflamatória que leva a alterações estruturais e morfológicas das vias aéreas (chamadas conjuntamente de remodelamento), reatividade aumentada de vias aéreas a desafios variados (hiperreatividade) e alta produção de imunoglobulina E (IgE), tanto contra um antígeno específico, quanto de modo geral. Os mecanismos específicos responsáveis pelo desenvolvimento da asma são complexos e incluem predisposição individual e fatores ambientais, mas incorrem, de forma geral, em uma reação alérgica intrapulmonar, direcionada a um alérgeno em particular, com

² SALTER, H. **On asthma**: its pathology and treatment. London: John Churchill, 1860. 464p.

³ SALTER, H. An analysis of a hundred and fifty unpublished cases of asthma No 2. On the immediate excitants of the asthmatic paroxysm. **Lancet**, ii, p.259-60, 1866.

⁴ HUBER, H. L.; KOESSLER, K. K. The pathology of bronchial asthma. **Arch. Intern. Med.**, v.30, p.689-760, 1922.

polarização (MOSMANN; COFFMAN, 1989) da resposta imunológica envolvida para um padrão baseado em linfócitos T auxiliares do tipo 2 (Th2), caracterizada por produção e secreção de interleucinas (ILs) 4, 5 e 13, por linfócitos T CD4⁺ (SOUSA MUCIDA et al., 2003) frente a estímulos dos mais variados (KOBZIK, 1999). Em pacientes asmáticos, a doença normalmente progride em duas fases relacionadas, porém distintas: uma resposta imediata, mediada por IgE e mastócitos, e uma fase tardia, na qual linfócitos Th2 e eosinófilos, células locais (como a musculatura lisa e o epitélio respiratório), e mediadores inflamatórios, como citocinas e derivados do ácido araquidônico (AA), participam de um ambiente inflamatório que contribui de forma importante para a evolução e manutenção deste processo (MADDOX; SCHWARTZ, 2002).

Apesar de foco de intenso estudo por várias décadas e do vasto conhecimento acumulado acerca dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento, remissão e retorno dessa doença, grandes questões ainda permanecem sem resposta no que diz respeito aos mecanismos imunológicos envolvidos na origem das alergias e de que maneira estas podem sofrer influência de outros sistemas orgânicos, tal como o sistema nervoso central (RIETVELD; EVERAERD; CREER, 2000). Assim, parte do esforço da comunidade científica parece ter sido direcionado, somando-se à tentativa de manipulação farmacológica das decorrências da doença, para a compreensão dos mecanismos imunológicos básicos que possam explicá-la, com grande importância a médio e longo prazos (VARGAFTIG, 1997). Mesmo com o aumento da ocorrência e severidade da asma em praticamente todo o mundo (porém com clara predominância em países desenvolvidos) e conseqüente investimento em pesquisa e desenvolvimento de estratégias terapêuticas visando atenuar o sofrimento dos pacientes acometidos por esta doença, poucas opções reais de resolução do problema foram propostas, sendo todo o enfoque clínico ainda sobre o controle farmacológico das crises e diminuição de sua severidade (SPINA; PAGE, 2002).

Muito se avançou na compreensão dos fenômenos imunológicos envolvidos no desenvolvimento da asma, tanto dos mecanismos efetores responsáveis pela perda temporária de função relacionada à fase imediata da reação alérgica desencadeada durante uma crise, quanto daqueles ligados à lesão tecidual e conseqüente remodelamento, característicos de sua fase tardia. Grande parte dos avanços recentes na compreensão da patogenia da asma foi advindo da utilização de diversos modelos animais baseados na tentativa de reproduzir em camundongos uma inflamação alérgica pulmonar semelhante à asma humana (GLEICH; KITA, 1997). Assim como na doença humana, camundongos desenvolvem, após exposição por via inalatória de antígeno específico com o qual foram previamente sensibilizados, uma fase imediata dependente da desgranulação de mastócitos mediada por imunoglobulina E (IgE) ligada a receptores de alta afinidade – FcεRI – presentes na membrana dessas células, e, posteriormente, infiltrado celular com predominância de eosinófilos e linfócitos T, com importância tanto na lesão tecidual característica da fase tardia da asma (GALLI, 1997) como no desenvolvimento da hiperreatividade de vias aéreas (WILLS-KARP, 1997) e produção excessiva de muco (LUNDGREN; SHELHAMER, 1990).

Possibilitada pelo desenvolvimento de modelos murinos adequados, a compreensão da regulação da resposta alérgica característica da asma tem avançado, no que diz respeito à participação e preponderância de alguns tipos celulares e citocinas deles derivadas (RUSSO et al., 2001). A descrição da asma como um processo imunológico polarizado para o padrão Th2 (ROBINSON et al., 1992) pressupõe uma importante participação de ILs características deste padrão, tais como IL-4, IL-5 e IL-13 em sua fisiopatologia. Apesar de ainda não haver consenso definitivo sobre a relevância individual de cada citocina na asma, vários grupos de pesquisadores demonstraram de forma muito elegante, utilizando para tanto não apenas anticorpos neutralizantes para cada citocina em questão, mas gerando camundongos incapazes de sintetizá-las (nocautes) ou que as expressam em excesso (transgênicos), as

influências destas moléculas sobre vários aspectos da asma, incluindo a presença de infiltrado inflamatório, o desenvolvimento de hiperreatividade de vias aéreas, a secreção de muco, a eosinofilia e o remodelamento tecidual.

A IL-4 é importante para a polarização de linfócitos CD4⁺ para o padrão Th2 de secreção de citocinas (ABEHSIRA-AMAR et al., 1992; KOPF et al., 1993), fato que, indiretamente, influencia todos os outros parâmetros característicos da fase tardia da resposta alérgica pulmonar advinda da asma. Assim, a ausência inicial de IL-4 inibe a troca de isotipo de células B para a produção de IgE (FINKELMAN et al., 1988), desenvolvimento de hiperreatividade de vias aéreas (AHR) (CORY et al., 1996; RENZ et al., 1996), o recrutamento de células T (COHN et al., 1997) e eosinófilos (BRUSSELLE et al., 1994) para o pulmão. A IL-4 parece ainda ser capaz de estimular diretamente a hipersecreção de muco (TEMANN et al., 1997) para o trato respiratório.

A IL-5 é crucial na geração de uma das características mais marcantes da inflamação alérgica pulmonar: grande número de eosinófilos no lavado broncoalveolar (BAL) e no infiltrado peribroncovascular na fase tardia da asma (DE MONCHY et al., 1985); animais transgênicos que expressam IL-5 de modo constitutivo apresentam números enormes de eosinófilos quando comparados com animais normais, com evidente aumento de seus precursores na medula óssea, sugerindo que essa molécula seja suficiente para estimular a eosinofilia encontrada na asma (DENT et al., 1990) e levando a alterações pulmonares características desta doença (LEE et al., 1997). Somando-se a isso, anticorpos anti-IL-5 inibem o acúmulo pulmonar de eosinófilos em animais alérgicos (EGAN et al., 1995), fato corroborado pela ausência de eosinofilia, AHR e lesão pulmonar resultantes da reação alérgica em animais deficientes de IL-5 (FOSTER et al., 1996). No entanto, o grau de influência direta da IL-5 sobre os diversos parâmetros da asma, em oposição à sua influência

indireta por meio da modulação da eosinofilia (bem estabelecida experimentalmente) é difícil de ser estabelecido de forma inequívoca.

IL-13 possui, ao menos em humanos, posição de destaque na produção de IgE (IZUHARA; SHIRAKAWA, 1999; PUNNONEN; YSSEL; DE VRIES, 1997) e secreção de muco (COHN et al., 1999), e apresenta similaridade com a IL-4, podendo compartilhar seus receptores (através de uma cadeia de seu receptor heterodimérico – IL-4R α), possivelmente utilizando vias de transdução de sinais e ativação de transcrição em comum (MATTHEWS; CALLARD, 1988), levando a semelhanças em termos de atividade biológica com a IL-4. Administrações seguidas de IL-13 em camundongos podem gerar alterações características da asma, como a AHR, e o bloqueio de sua ação por meio da administração prévia de um receptor solúvel (sIL-13R α 2-Fc) impediu o aumento de produção de muco e a AHR em animais imunizados e desafiados com o antígeno (WILLS-KARP et al., 1998). Ainda, o próprio epitélio brônquico pode modular de maneira importante a evolução da inflamação alérgica naquele tecido, visto que produz, entre outros mediadores, eotaxina (LILLY et al., 1997) importante quimiocina para o recrutamento de eosinófilos para sítios inflamatórios, sendo ainda produzida por uma variedade de outras células, tais como endoteliais, monócitos e linfócitos T (JANEWAY; TRAVERS; WALPORT, 1999).

Apesar da aparente, e até certo ponto óbvia, conexão entre as fases imediata e tardia do processo alérgico que acomete indivíduos asmáticos, camundongos deficientes de mastócitos (W/W^v, que não têm o c-kit, receptor para um fator de crescimento importante para mastócitos, o *stem-cell factor* – SCF) apresentam uma inflamação alérgica pulmonar, avaliada pela presença de eosinófilos do lavado broncoalveolar (BAL) e pelo infiltrado inflamatório peribroncoalveolar, comparável àquela dos animais controles, com número normal de mastócitos (BRUSSELLE et al., 1994). Por outro lado, animais da mesma linhagem, apesar de aumento normal de IL-5 no BAL após imunizados e desafiados com

OVA, não apresentaram aumento de AHR quando testados com acetilcolina (NAGAI; YAMAGUCHI; TANAKA, 1996). Ainda, em contrapartida, utilizando animais deficientes da cadeia alfa do FcεRI (presente constitutivamente na membrana de mastócitos de camundongos), observaram que apenas os animais controles desenvolviam AHR a metacolina, após vários desafios com OVA (MAYR et al., 2002). Os diversos tipos celulares, assim como os mediadores envolvidos nas diferentes fases da asma, apesar de interagirem para aumentar a complexidade de regulação deste processo, parecem apresentar uma preponderância cinética por uma delas, imediata ou tardia. Deve-se ainda ressaltar que a variabilidade da importância relativa dos mastócitos na fase tardia da asma em particular (MAYR; ZUBERI; LIU, 2003), incluindo vários dos parâmetros escolhidos do fenômeno estudado (WILLIAMS; GALLI, 2000) sofre grande influência do modelo experimental escolhido.

O acúmulo de células inflamatórias no ambiente pulmonar iniciado no começo da fase tardia e que perdura por muitas horas ou dias, depende ainda da interação entre dois outros fatores: a presença de fatores quimiotáticos locais, que incluem os mediadores citados anteriormente (citocinas e derivados do AA, como leucotrienos) adicionados também de uma classe particular de citocinas com especial função de quimiotaxia e quimiocinese, as quimiocinas (de citocinas *químioatrativas*), e a expressão de moléculas de adesão, que regulam de forma direta a atração e diapedese dos principais tipos celulares da inflamação alérgica pulmonar, o linfócito T CD4⁺ e o eosinófilo, para o foco da reação. Dentre as quimiocinas específicas para eosinófilos, as eotaxinas, em especial a eotaxina-2, parece exercer papel fundamental tanto na indução de eosinofilia (PALFRAMAN et al., 1998) quanto no acúmulo tecidual de eosinófilos dependente de IL-4 durante a asma, e está aumentada em camundongos superexpressando essa citocina (ZIMMERMANN et al., 2000). Sua falta, de maneira previsível, dificulta o acúmulo tecidual destas células (MATTHEWS et

al., 1998; ROTHENBERG et al., 1997). O fato de as eotaxinas pertencerem à família CC de quimiocinas (com dois resíduos adjacentes de cisteína) exercerem sua função principalmente mediante sua ligação a receptores CCR3 presente em eosinófilos, explica também o efeito de outros componentes desta família, como a RANTES e as proteínas quimioatrativas de macrófagos (MCPs) 3 e 4 sobre sua atração para o ambiente inflamatório pulmonar (LAMPINEN et al., 2004). Além disso, com a exceção das eotaxinas, células CD4⁺ Th2, que também apresentam CCR3 (que, em conjunto com CCR4 e CCR8 parecem ser típicos de células T CD4⁺ Th2), parecem responder bem à estimulação pelas mesmas quimiocinas citadas (incluindo RANTES e MCPs, principalmente MCP-1, que também parece ser característica de respostas Th2) (OLIVEIRA; LUKACS, 2003), o que demonstra uma convergência de sinais para os dois principais tipos celulares da fase tardia da asma (WARD; BACON; WESTWICK, 1998).

A regulação do recrutamento celular para o foco da lesão parece sofrer forte influência de pares de moléculas responsáveis pela adesão firme destas com o endotélio vascular, cada um composto de uma integrina (em células imunes) e sua contrapartida, da superfamília imunoglobulina (expressa de forma constitutiva ou induzida em células endoteliais) (JANEWAY; TRAVERS; WALPORT, 1999). No caso específico de eosinófilos e células T, os pares mais importantes parecem ser compostos pela integrina VLA (*very late activation antigens*) – 4 ligando-se com a alguma ICAM (*intracellular adhesion molecule*) ou a LFA (*lymphocyte-function-associated antigen*) – 1 ligando-se à VCAM (*vascular cell-adhesion molecule*) – 1 (NAKAJIMA et al., 1994). Porém, esta é uma simplificação óbvia da modulação do recrutamento de eosinófilos e linfócitos durante a asma alérgica, pois além de a adesão inicial destas células com o endotélio vascular depender de selectinas, várias outras combinações de integrinas com superfamília imunoglobulinas podem ser relevantes, e até a

participação de componentes extracelulares do tecido conectivo pode influenciar a diapedese das células em questão (YING et al., 1999).

As alterações morfológicas que acompanham a cronificação da asma recebem, em conjunto, a denominação de remodelamento de vias aéreas, e quase sempre incluem um espessamento geral da parede das vias aéreas (KOBZIK, 1999), gerado por uma combinação de um ou mais dos seguintes fatores: fibrose subepitelial, metaplasia de células produtoras de muco, indução e hiperplasia de miofibroblastos, hiperplasia e hipertrofia de musculatura lisa e do epitélio, colaborando em conjunto para o aumento de resistência de vias aéreas, assim como para sua obstrução (ELIAS et al., 1999). Apesar de não haver consenso sobre os fatores determinantes do remodelamento de vias aéreas na asma, um possível candidato com relevância é o TGF β , dada sua importância clássica em processos cicatriciais e fibróticos de modo geral (CUTRONEO, 2003), sua presença em grandes quantidades em BAL de indivíduos asmáticos (VIGNOLA et al., 1997), sua produção por eosinófilos (MINSHALL et al., 1997; OHNO et al., 1996), além de uma correlação positiva entre sua expressão e um espessamento fibrótico de vias aéreas (MINSHALL et al., 1997).

A modulação da hiperreatividade brônquica aparece, então, como outra área de grande interesse científico e que ainda contém discrepâncias quanto aos mecanismos nela envolvidos. Do ponto de vista neurofisiológico, a regulação básica do tônus da musculatura lisa da árvore brônquica é feita pelo sistema nervoso autônomo (SNA), com um balanço entre a contração causada por ação direta de acetilcolina em receptores muscarínicos M2 (somada ainda a estimulação de produção de muco) e relaxamento derivado da ação noradrenérgica em receptores β -adrenérgicos, principalmente β_2 (com redução associada de produção de muco), de onde vem o emprego terapêutico de agonistas desses receptores na redução do broncoespasmo e da obstrução de vias aéreas em episódios de crise asmática (FELDMAN; MCCRIMMON, 1999). Além há uma importante participação de um componente não-

adrenérgico não-colinérgico (NANC) que tem despertado grande interesse científico nas últimas décadas; dentre as inúmeras moléculas utilizadas pelo sistema NANC, talvez o maior foco de atenção tenha sido sobre dois grandes grupos: as taquicininas (como a substância P e as neurocininas – NKs – A e B), por sua importância em reflexos axonais (STRETTON; BELVISI; BARNES, 1990), induzindo broncoconstrição, aumento da permeabilidade vascular (levando a edema) e da produção de muco (causando obstrução), e o óxido nítrico, tanto por ter sido o primeiro neurotransmissor gasoso descrito (PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987), quanto por seu efeito broncodilatador direto sobre a musculatura lisa do trato respiratório (BELVISI et al., 1995). Porém em situações de hiperreatividade brônquica, diversos mecanismos são propostos para sua modulação, desde puramente farmacológicos, como, por exemplo, a ação de grande quantidade de histamina liberada durante a desgranulação de mastócitos em receptores H1 na musculatura lisa, prostaglandinas liberadas durante a inflamação aguda (como por exemplo a PGD2, com potente efeito broncoconstritor), outros derivados do AA, como leucotrienos (LTC4, LTD4 e LTE4), e o PAF (que indiretamente causa liberação de mais histamina e outros mediadores de grânulos de mastócitos), até outros mais complexos, como aqueles dependentes de reflexos nervosos, tanto centrais, quanto axonais, incluindo uma importante participação de fibras sensitivas do tipo C (KOBZIK, 1999).

Guy Joos e colaboradores revisaram o papel de reflexos axonais em nervos sensoriais que contém SP e outros neuropeptídeos (como a NKA) na modulação de mudanças em vias aéreas durante a asma (JOOS; GERMONPRE; PAUWELS, 2000). Descreveram, por exemplo, aumento de SP no lavado bronco-alveolar ou no esputo de indivíduos asmáticos, após estimulação pela inalação de aeroalérgenos. A participação de taquicininas na inflamação alérgica pulmonar torna-se ainda mais complicada a partir da descrição de que virtualmente quaisquer células do sistema imunológico (eosinófilos, neutrófilos, macrófagos,

células dendríticas, linfócitos) podem produzi-las. Os efeitos mediados por taquicinas relevantes ao estudo da inflamação alérgica pulmonar se estendem além dos dependentes de receptores NK-2 (envolvidos principalmente ação direta na contração de musculatura lisa levando a broncoconstrição); sua ação em NK-1 (receptor preferencial para SP) também colabora para vários dos sinais clássicos deste processo, tais como edema, por aumento de permeabilidade vascular, aumento de secreção de muco e quimiotaxia de vários leucócitos. A interação entre mastócitos e terminais sensitivos aqui se faz importante, pois estas células apresentam receptores NK-1, cuja ativação pode levar à sua desgranulação e subsequente liberação de aminas pré-formadas e citocinas, formando uma rede curta de retroalimentação positiva, com importantes decorrências tanto para a atividade do mastócito quanto do nervo sensitivo cujo terminal livre foi estimulado. De maneira geral, as divergências relatadas entre estudos provavelmente advém do modelo experimental utilizado, do modo de desafio para teste de reatividade de vias aéreas, se os resultados foram obtidos *in vitro* ou *in vivo*, e se a argumentação pressupõe apenas efeitos diretos sobre o tecido pulmonar ou se inclui reflexos nervosos (JOOS, 2003).

O interesse na interação entre mastócitos e fibras sensitivas do tipo C foi impulsionado por várias descrições inequívocas de seu contato íntimo *in vivo* e de sua importância em respostas imunológicas. Heine e Förster confirmaram histologicamente o contato íntimo entre mastócitos e fibras nervosas descrito anteriormente (JABONERO⁵, 1959 apud HEINE; FORSTER, 1975, p. 936) sugerindo um substrato anatômico para sua interação *in vivo*, com papel crucial de retroalimentação ao sistema neuroendócrino (HEINE; FORSTER, 1975). Tais achados foram posteriormente confirmados em análise ultraestrutural, mostrando justaposição entre membranas plasmáticas de mastócitos e neurônios (NEWSON et al., 1983). Na mesma época, Lundberg e Saria demonstraram a

⁵ JABONERO, V. Die plexiforme Synapse auf Distanz und die Bedeutung der sogenannten interkalären Zellen. *Acta neuroveg.* 19, 276-303, 1959.

importância das fibras sensíveis à capsaicina na supressão da sensibilidade de vias aéreas a irritantes físicos ou químicos (LUNDBERG; SARIA, 1983). McDonald descreveu a importância de tal interação entre nervos e vários tipos celulares presentes em vias aéreas para o fenômeno da inflamação neurogênica (MCDONALD, 1987). A estimulação elétrica bilateral do nervo vago de cães alérgicos a um antígeno de *Ascaris suum* levou ao aumento da diferença de concentração plasmática de histamina gerada pela circulação pulmonar, em animais com bloqueio β -adrenérgico por propanolol (LEFF et al., 1986). A seguir, uma relação funcional entre mastócitos e terminais nervosos de vias aéreas foi evidenciada por Bienenstock: a atividade elétrica medida em fragmentos de traquéia de ratos imunizados com OVA e estimulados com o antígeno é bloqueada com um estabilizador de mastócitos e reduzida pela metade por pré-tratamento com capsaicina *in vivo* (BIENENSTOCK et al., 1988) implicando fibras sensitivas do tipo C nessa interação. Ainda, a estimulação elétrica do nervo vago causou aumento da proporção de mastócitos desgranulados na traquéia e brônquios de ratos, efeito esse prevenido por tratamento com capsaicina ou vagotomia acima do gânglio nodoso, mostrando tratar-se de um reflexo central (KIERNAN, 1990). Quase meia década após descobrir o fator de crescimento de nervos (NGF), o primeiro de muitos fatores de crescimento, e demonstrar sua importância no desenvolvimento e manutenção de neurônios tanto centrais quanto periféricos (LEVI-MONTALCINI, 1952), o grupo de Rita Levi-Montalcini apresentou forte evidência da importância da interação mastócito-fibras nervosas: mastócitos peritoneais de ratos produzem e secretam NGF, cuja atividade biológica foi demonstrada pela estimulação do crescimento de neuritos em culturas de células provenientes do gânglio da raiz dorsal e de neurônios simpáticos de embriões de galinha. Assim, mastócitos em diferentes tecidos podem influenciar não apenas a atividade de fibras nervosas, mas também seu desenvolvimento e manutenção nos tecidos (LEON et al., 1994).

Um grande corpo de evidências sustenta então a importância da interação funcional de mastócitos e fibras nervosas.

Alterações emocionais e níveis aumentados de ansiedade são comumente associados com a ocorrência de crises de asma (LAWRENCE, 2002; LEHRER; ISENBERG; HOCHRON, 1993). A descrição mais antiga de uma alteração comportamental relacionada a uma resposta alérgica foi a do chamado ‘efeito rosa’, caracterizado por broncoconstrição em pacientes asmáticos quando do contato com uma rosa artificial (MACKENZIE, 1886); tais indivíduos obviamente evitavam o contato com a rosa falsa visando a manutenção de sua saúde. Este fato representa um comportamento adaptativo, gerado a partir da associação entre a fonte do antígeno (a rosa, no caso de pacientes alérgicos a ela) e sua imagem. Além disso, o estudo citado demonstrava que a sintomatologia característica da fase imediata de uma resposta alérgica poderia ser gerada na ausência do antígeno, com forte influência de um estado emocional ou de uma resposta condicionada. Assim, é compreensível a descrição de William Osler em seu tratado médico, considerado obra de referência na comunidade médica de língua inglesa por mais de 30 anos, de se tratar de uma doença puramente psicogênica, acometendo indivíduos neuróticos (OSLER⁶, 1892 apud WRIGHT; RODRIGUEZ; COHEN, 1998, p. 1074). Tal ponto de vista perdurou até que se acumulasse conhecimento suficiente sobre a origem alérgica da asma e seu componente inflamatório.

Muitos problemas relacionados à objetividade dos estudos que tentam conectar episódios de broncoconstrição e recorrência de internações em indivíduos asmáticos são comumente citados na literatura: utilização de auto-avaliação, em que o paciente se descreve emocionalmente, alterações simples de padrão respiratório (gerados por ansiedade) que podem indiretamente levar à percepção subjetiva de menor fluxo de ar inalado, descrição espontânea de fatos desagradáveis que precederam os episódios e internação, entre outros.

⁶ OSLER, W. **The principles and practice of medicine**. Edinburgh: Y. J. Pentland, 1892. 1181 p.

Desta maneira, o estabelecimento de relação causal direta entre alterações emocionais e piora clínica ainda está por ser realizado de modo inequívoco. O desconforto gerado pela ocorrência de um processo patológico crônico poderia, por exemplo, ser incriminado como responsável por induzir ansiedade em pacientes sofrendo de asma recorrente e duradoura (DAHLEN; JANSON, 2002; RIETVELD; EVERAERD; CREER, 2000), dificultando o estabelecimento de causa e consequência na interação entre alterações emocionais, estresse e crises de asma. Seja qual for a ordem, ficava claro que existe uma comunicação entre o SI e o SNC importante na modulação do comportamento de pacientes asmáticos, com relevância na ocorrência de novas crises, bem como na evolução clínica de processos já em andamento.

Parte da subjetividade inerente a alguns estudos clínicos pode ser minimizada por meio da utilização de modelos animais de reação alérgica pulmonar. Neste caso, muitas das variáveis, que normalmente não podem ser controladas utilizando-se pacientes humanos, são padronizadas. Ainda, utilizando-se modelos comportamentais bem estabelecidos pode-se inferir experimentalmente sobre níveis de ansiedade. A análise do comportamento de roedores no labirinto em cruz elevado (LCE), por exemplo, permite a avaliação dos níveis de ansiedade gerados por estressores dos mais diversos e, se usado em conjunto com avaliação clínica e laboratorial, analisar efeitos do estresse sobre a evolução clínica da condição patológica em questão. Além do mais, a avaliação direta de atividade do SNC pode ser feita com menor variação derivada de idade ou sexo diferentes.

Duas abordagens provenientes de nosso laboratório que permitiram compreender melhor a relação do SI com o SNC durante a asma alérgica são descritas a seguir.

Foi descrito por nosso grupo que ratos imunizados com OVA, após o pareamento de um estímulo condicionado (toque de uma campainha) ao desafio com o antígeno, exibem um repertório comportamental compatível àquele exibido durante uma reação anafilática quando expostos apenas ao estímulo condicionado, mesmo na ausência do antígeno. Este estudo

sustenta experimentalmente a possível existência de um componente condicionado na sintomatologia característica associada a respostas alérgicas. Apesar de os autores não terem analisado parâmetros histológicos ou imunológicos para evidenciar a ocorrência de uma resposta alérgica na ausência do antígeno, foi mostrado anteriormente que a secreção de mediadores por mastócitos pode ser condicionada em animais imunizados, utilizando-se estímulos audiovisuais (MACQUEEN et al., 1989).

Utilizando um modelo de reação alérgica pulmonar em ratos, Portela e colaboradores (PORTELA et al., 2002) demonstraram o aumento de edema e infiltrado mononuclear (mas não de polimorfonucleares) em animais estressados agudamente por meio de choque inescapável; ainda, a utilização de um ansiolítico benzodiazepínico amplamente utilizado em humanos, o diazepam, foi capaz de prevenir o aumento de edema e infiltrado mononuclear induzidos pelo estressor. Neste caso, o estresse foi capaz de modular positivamente a inflamação pulmonar. Resultados semelhantes foram descritos por Joachim e colaboradores, em que camundongos sensibilizados a OVA por imunização intraperitoneal e desafiados por nebulização com OVA apresentaram aumento do número de leucócitos de modo geral, e de eosinófilos em particular, quando estressados previamente por exposição a ruídos ultrassônicos (JOACHIM et al., 2003) comparados a animais não estressados; ainda, fragmentos de traquéia dos mesmos animais apresentavam *in vitro* maior hiperreatividade a estimulação elétrica.

A influência do estressor sobre a asma parece, como em várias outras situações, depender de sua intensidade e duração. Forsythe e colaboradores relatam que, utilizando um modelo murino de asma baseado na imunização e desafios com OVA, que o estresse decorrente da contenção em tubos plásticos de 50 mililitros causou alterações dependentes de sua duração: 3 dias de contenção causaram queda na contagem total de leucócitos no BAL, assim como de eosinófilos; quando mantido por 7 dias, incorreu em aumento de células (tanto

totais quanto eosinófilos) no BAL. Em nenhum caso houve alteração de AHR medida em pletismógrafo. Os efeitos do estressor por 3 dias foram reversíveis por tratamento com RU486, um antagonista de receptores de glicocorticóides, antes da contenção; porém, tal tratamento foi ineficiente quando o estressor perdurou por 7 dias (FORSYTHE et al., 2004).

Evidentemente, quando se aborda as interações entre alterações comportamentais, estados emocionais, função do sistema nervoso e evolução de doenças em humanos, não se poder deixar de citar a importância do aprendizado e condicionamento entre sintomas conhecidos e a recorrência dos processos ou fenômenos analisados; a percepção de que determinadas alterações fisiopatológicas ou comportamentais antecipam a ocorrência de crises asmáticas pode, por si só, induzir a ocorrência delas, ou levar à piora do quadro, por simples auto-sugestão. Apenas uma análise minuciosa clínica e laboratorial pode detectar e quantificar o real componente emocional na evolução destes processos.

Apesar da já descrita subjetividade advinda de estudos clínicos nos quais se utiliza escala arbitrária para avaliação de ansiedade e depressão, muitas vezes aplicada pelos próprios pacientes, deve-se ressaltar a importância de correlações apontadas por estes entre a chance de recorrência de crises asmáticas e repetidas internações posteriores em pacientes que demonstraram maiores índices de ansiedade ou depressão em uma primeira abordagem. Sugere-se que entre 20 e 35% dos pacientes asmáticos apresentam algum grau de exacerbação dos sintomas em períodos relatados como ‘estressantes’ (ISENBERG; LEHRER; HOCHRON, 1992). De modo semelhante, a ocorrência de ansiedade ou depressão em um período posterior a primeira internação por crise asmática parece estar relacionada à recorrência dos sintomas e nova internação (53% dos pacientes que passaram por episódios de ansiedade ou depressão foram novamente atendidos após um mês ou menos da primeira internação, contra apenas 19% do grupo que não apresentava das alterações emocionais) sugerindo certo grau de correlação entre a ocorrência destas alterações comportamentais e a

recorrência de crises agudas de obstrução pulmonar advindas de asma ou de doenças pulmonares obstrutivas crônicas (DAHLEN; JANSON, 2002). Mais uma vez, não se pode afirmar se a sintomatologia comportamental é induzida pela ocorrência da reação alérgica, se ela o desencadeia, ou se ambas as coisas ocorrem em paralelo.

Em pacientes jovens acometidos por asma, dois estudos apontam para uma relação estreita entre estresse e a evolução da doença. Análise retrospectiva da co-ocorrência de ansiedade e asma em crianças apontou uma correlação positiva entre níveis de ansiedade e dificuldade no controle farmacológico das crises em pacientes internados (FRITZ; OVERHOLSER, 1989). Além disso, em estudo experimental com alunos universitários desafiados com alérgenos específicos predeterminados em cada caso, em períodos de baixo (meio do semestre letivo) ou alto nível de estresse (semana de provas finais), observou-se em ambos os períodos, como esperado, que entre 6 e 24 horas após o desafio antigênico houve acúmulo de linfócitos e eosinófilos no esputo; porém, no período de alto nível de estresse, o aumento de células totais, assim como do percentual de linfócitos e eosinófilos no esputo foi maior que aquele visto no período de baixo estresse, mesmo sem diferença significativa entre a média de níveis de cortisol entre os dois períodos (LIU et al., 2002). É importante notar que no mesmo trabalho, a capacidade de células provenientes do esputo em produzir IL-5 quando estimuladas por fitohemaglutinina *in vitro* estava aumentada aproximadamente quatro vezes nas células colhidas no período de alto estresse quando comparada com células dos mesmos pacientes, no período de baixo estresse.

Portanto, a existência de tais estudos em humanos, com resultados algumas vezes discordantes e contraditórios (JANSON et al., 1994; STEHR; KLEIN; MURATA, 1991) relacionando a ocorrência de fatos com alto conteúdo emocional na vida de pacientes (como perda de um parente, divórcio, problemas financeiros, entre outros) e alterações na evolução da asma ou desencadeamento de crises, não podem ser desprezados.

3 OBJETIVO

Avaliar reflexos no sistema nervoso central de uma reação alérgica iniciada nas vias aéreas. Ainda, buscamos entender o modo como tal desafio pode modular o comportamento animal, com enfoque especial sobre um comportamento adaptativo: evitar um contexto ambiental previamente associado à apresentação do alérgeno por via aerógena.

3.1 Objetivos específicos

Avaliar, por meio da expressão da proteína Fos em neurônios, a ativação dos núcleos paraventricular do hipotálamo (PVN) e central da amígdala (CeA) após instilação intranasal de ovalbumina (OVA) em camundongos previamente imunizados com este antígeno.

Investigar, utilizando um modelo adaptado de esquiva passiva no qual a nebulização do antígeno funciona como estímulo aversivo, o desenvolvimento de aversão por parte dos camundongos alérgicos ao local onde receberam o desafio alergênico.

Compreender, por meio da indução de tolerância oral a OVA em dias distintos, qual a participação dos anticorpos anafiláticos IgE e IgG1 anti-OVA nestes fenômenos.

Estudar, utilizando animais que não apresentam um infiltrado inflamatório pulmonar importante na fase tardia da hipersensibilidade imediata, a importância dessa resposta inflamatória sobre os fenômenos descritos acima.

Analisar, mediante a utilização de um inibidor da desgranulação de mastócitos, o papel destas células, presentes nas vias aéreas de camundongos, na sinalização entre a resposta imunológica ocorrendo no pulmão e o sistema nervoso central (SNC), avaliada pela ativação dos núcleos descritos acima, bem como pelo comportamento de esquiva.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

Camundongos isogênicos BALB/c ou C3H/HeJ machos, com 6 a 8 semanas de idade, foram obtidos de nossa criação, no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. Os animais foram acondicionados em salas com temperatura controlada (22 a 26°C) e com ciclo claro-escuro de 12 horas, com luzes acendendo às 7 horas. Os animais tiveram sempre acesso livre a água e ração comercial. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as determinações do Comitê de Bioética desta instituição (parecer de aprovação em anexo).

4.2 Imunização e desafio com OVA

Os camundongos foram imunizados e desafiados de acordo com um dos protocolos descritos a seguir. O primeiro esquema de imunização, doravante chamado de Protocolo A, consistiu de uma única administração de OVA intraperitoneal (4 µg ovalbumina grau V – Sigma, St. Louis, Missouri – e 1.6 mg de hidróxido de alumínio – alum, suspensos em PBS para um volume total de 0.4 ml i.p.) no dia 0 e desafios seqüenciais nos dias 12, 13 e 14 por meio de duas nebulizações diárias de 30 minutos cada, intervaladas por 30 minutos, com OVA 2,5% em salina, nas caixas-residência. O segundo protocolo de imunização (protocolo B) consistiu de duas imunizações intervaladas por uma semana (dias 0 e 7) com a mesma preparação de OVA em alum descrita acima, seguida de um único desafio no dia 14 por meio

de instilação intranasal de 10 microgramas de OVA em 50 microlitros de solução salina, após anestesia superficial com halotano inalado.

4.3 Avaliação da atividade locomotora em campo aberto

A atividade locomotora dos animais foi analisada em uma arena padrão de campo aberto, similar àquela utilizada por Palermo Neto et al. (2001). Resumidamente, a arena de campo aberto consiste em uma superfície plana, redonda, de madeira, com 45 centímetros de diâmetro, e paredes de 20 centímetros de altura, pintada na cor grafite escuro. Cada animal era colocado no centro da arena e observado por 5 minutos, durante os quais a ambulação total – distância percorrida – foi computada utilizando-se um sistema de rastreamento auxiliado por computador (Ethovision® for Windows, version 3.0, Noldus, The Netherlands).

4.4 Indução de tolerância oral a OVA

A indução de tolerância oral foi realizada de acordo com o protocolo descrito por (RUSSO et al., 1998). Foi oferecida (como única fonte de líquido) aos animais uma solução de ovalbumina grau II (SIGMA®, St Louis) a 1 % em água potável durante toda uma semana (7 dias consecutivos). A solução era preparada diariamente e trocada pela manhã. Dois protocolos diferentes foram empregados visando à indução de tolerância: os animais consumiram a solução na semana anterior à imunização primária (ou seja, entre os dias -7 e 0), doravante denominada de ‘tolerantes dia -7’, ou então receberam tal solução a partir da imunização primária (durante a semana entre os dias 0 e 7), denominados ‘tolerantes dia 0’. Os protocolos descritos acima foram escolhidos terem sido descritos como capazes de influenciar de modo diferencial a produção dos anticorpos IgE e IgG1. Enquanto que o

oferecimento de OVA por via oral durante a semana anterior à imunização primária suprime ambas as classes de anticorpos, o consumo de OVA com início concomitante à imunização primária inibe preferencialmente a produção de IgE, com menor efeito sobre a IgG1 (RUSSO et al., 2001)

4.5 Tratamento com cromoglicato dissódico

O tratamento com cromoglicato dissódico (SIGMA®) seguiu um protocolo adaptado de Cieslewicz e colaboradores, com adaptações (informação verbal¹). Os animais foram expostos a sessões diárias de nebulização de uma solução de cromoglicato em solução salina (20 mg/ml) durante 10 minutos, por 4 dias consecutivos. Nos animais submetidos ao protocolo A (com uma única imunização e desafios sequenciais), a nebulização com cromoglicato ocorreu sempre uma hora antes do primeiro desafio diário com ovalbumina (dias 12, 13 e 14) e uma hora antes da exposição à sessão de treino do modelo de esquiva passiva (dia 15). Naqueles animais imunizados de acordo com o protocolo B (duas imunizações e um desafio), a nebulização com cromoglicato ocorreu nos três dias anteriores ao desafio único com OVA (dias 11, 12 e 13) e no mesmo dia desse, uma hora antes da instilação intranasal com ovalbumina.

4.6 Marcação imunoistoquímica de Fos

A avaliação da atividade do SNC foi avaliada por meio da marcação imunoistoquímica da proteína Fos (DRAGUNOW; FAULL, 1989) utilizando sempre animais imunizados segundo o protocolo B, com a finalidade de minimizarmos os efeitos da manipulação necessária às

¹ Informação fornecida por Tavares de Lima em São Paulo, em 2004.

várias nebulizações do protocolo A, que poderiam incorrer em efeito condicionado sobre a atividade de áreas do SNC. Assim, após a segunda imunização os animais foram gradualmente habituados ao procedimento anestésico necessário para a instilação intranasal do antígeno (ou salina): diariamente cada animal era removido de sua caixa, transferido para uma outra caixa idêntica e envolto por um béquer transparente de 500 mililitros, durante um minuto. Deste modo, no dia do desafio com OVA instilada, o procedimento de remoção da caixa-moradia e anestesia com halotano não representava mais uma novidade para o animal. A marcação imunoistoquímica de Fos foi realizada em amostras de encéfalo coletadas 90 minutos após o desafio intranasal com OVA. Resumidamente, imediatamente antes do sacrifício os camundongos eram anestesiados profundamente com uma mistura de xilazina e quetamina e perfundidos por via intracardiaca com 25 ml de PBS 0,1 M, e subseqüentemente, com 100 ml de paraformaldeído (PFA) 4% diluído em tampão fosfato (PB). Seus encéfalos eram removidos e pós-fixados por não menos que 5 horas na mesma solução (PFA em PB), seguido de crioproteção em sacarose 30% por 12 horas. Seções coronais de 30 µm foram cortadas por congelação e coletadas em PB. A reação imunoistoquímica foi realizada com amostras em flutuação, em tubos de 1,5 ml, sempre à temperatura ambiente. Todas as lavagens eram realizadas em PB 0,1 M. As amostras eram incubadas por 12 horas com o anticorpo primário anti-Fos (Ab-5, Calbiochem, San Diego, California) diluído 1:1000 em PB com 5% de soro normal de cabra e 0,3% de Triton X-100. Após 3 lavagens, os cortes foram incubados por 90 minutos com um anticorpo biotinilado anti-IgG de coelhos, feito em cabras (Jackson Laboratories, West Grove, Pennsylvania) na diluição de 1:200 em PB com 0,3% de Triton X-100. Seguiu-se a incubação com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain kit, Vector, Burlingame, California) de acordo com instruções do fabricante; a atividade da peroxidase (revelação da reação) foi detectada com diaminobenzidina como cromógeno (250 µg/ml em PB), na presença de 0,0075% de peróxido de hidrogênio. Os cortes foram

montados em laminas gelatinizadas, desidratados e cobertos com lamínula. Para a estimativa do número de células Fos positivas foram utilizados três cortes por animal de cada uma das áreas analisadas. Em cada corte, a área a ser analisada foi delineada de acordo com referências anatômicas e coordenadas estereotáticas. As coordenadas estereotáticas aproximadas das seções utilizadas na contagem de células Fos positivas foram: bregma $-0,82$ mm para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), e bregma $-1,22$ mm para o núcleo central da amígdala (CeA) (FRANKLIN; PAXINOS, 1996). O número de núcleos marcados com Fos foi quantificado por meio da utilização de um sistema de análise de imagens auxiliado por computador (ImageJ, versão 1.32j, distribuído pelos Institutos Nacionais de Saúde dos EUA).

4.7 Teste de esquiva passiva

Animais imunizados de acordo com o protocolo A foram utilizados para avaliação comportamental. Foi adaptado um teste clássico de esquiva passiva baseado no reconhecimento de um compartimento que fora previamente associado a um estímulo desagradável (aversivo) para a avaliação do impacto comportamental do desafio antigênico em um animal alérgico. Quinze dias após a imunização primária (sessão de treino) todos os animais foram colocados individualmente no lado claro de uma caixa acrílica de dimensões $45 \times 20 \times 20$ cm (comprimento x largura x altura) dividida em dois compartimentos: um iluminado por uma lâmpada de 60W, que corresponde a $1/3$ de sua área total, e outro escuro, constituindo os $2/3$ restantes (adaptado de BOURIN; HASCOET, 2003); os dois compartimentos são separados por um porta deslizante de 5×5 cm. A demora para a primeira passagem ao compartimento escuro foi medida (com um teto pré-estabelecido de 1 minuto). Ao passar para o lado escuro, a porta de conexão entre os compartimentos era fechada e o

animal recebia a nebulização de OVA (2,5% em salina) por 10 minutos. No dia seguinte (sessão de teste) eles foram reintroduzidos no lado claro do aparelho e novamente a latência para a passagem ao lado escuro foi medida (desta vez com um teto de 5 minutos). Animais não-imunizados foram desafiados e manipulados à semelhança dos camundongos imunizados.

4.8 Determinação de IgG1 anti-OVA

Anticorpos IgG1 anti-OVA foram quantificados por ELISA como descrito anteriormente (RUSSO et al., 2001). Resumidamente, placas de 96 poços Nunc-Immuno Maxi-Sorb (Inter-Med, São Paulo) foram recobertas com 2 µg de OVA por poço (12 horas a 4°C), lavadas com PBS com 0,05% de Tween e bloqueadas com 0,25% de caseína em PBS. Após várias lavagens, as amostras de soro (diluídas 1:1000) a serem testadas foram adicionadas e as placas incubadas por 1 hora. Os anticorpos aderidos foram detectados pela adição de 1 µg/ml de anticorpo anti-IgG1 de camundongo (feito em cabras) por 1 hora, seguido de lavagens e adição de anticorpo anti-IgG de cabras (feito em coelhos) ligado a peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, Alabama) por mais 1 hora. Após lavagens, a reação foi revelada com a adição de 100 µl/poço do substrato da peroxidase, que consistiu de 0,5 mg/ml de OPD (Sigma, St Louis, Missouri) com 0,0015 % de H₂O₂ em tampão ácido cítrico e citrato de sódio 0,1 M (Merck S. A., São Paulo), em pH 5.0. A reação foi interrompida com H₂SO₄ 4M e a absorbância das amostras determinada em 490 nanômetros utilizando um leitor Multiskan EX (Thermo Labsystems, Vantaa, Finland). As concentrações de anticorpos IgG1 foram estimadas por comparação com padrões quantificados em paralelo, em placas recobertas de anti-Ig de camundongos, feito em coelhos (Southern Biotechnology).

4.9 Determinação de IgE anti-OVA

Para a quantificação de IgE anti-OVA, as placas foram recobertas por 12 horas a 4°C com 2 µg/ml de anticorpo anti-IgE de camundongos feito em cabras (Southern Biotechnology). As amostras de soro foram então adicionadas aos poços, seguidas de OVA biotinizada. A OVA biotinizada aderida às placas foi revelada com a adição de conjugado extraAvidin–peroxidase (Sigma) seguido de 100 µl/poço do mesmo substrato descrito acima para IgG1. Os níveis de IgE anti-OVA foram determinados a partir de um controle positivo interno, obtido pela mistura de soros retirados de animais BALB/c imunizados várias vezes, o qual recebeu arbitrariamente o valor de 1000 unidades (U.A.).

4.10 Avaliação da permeabilidade vascular pelo extravasamento de azul de Evans

A avaliação da eficácia do tratamento prévio com cromoglicato dissódico sobre a desgranulação de mastócitos presentes nas vias aéreas foi realizada, indiretamente, pela análise do aumento de permeabilidade vascular (SIROIS et al., 1988) induzido pela exposição de animais alérgicos a nebulização com OVA. Desse modo, os animais receberam, sob leve anestesia com halotano, uma solução de azul de Evans (25 mg/ml de solução salina 0,9%; 0,1 ml para cada 10 g de peso vivo) por via intravenosa, e 10 microgramas de OVA em 50 microlitros de solução salina por via intranasal. Após 10 minutos, os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina e xilazina e receberam 0,1 ml de heparina sódica. Foram imediatamente perfundidos através do ventrículo direito, com o auxílio de uma bomba peristáltica, com 10 ml de PBS para a retirada do excesso de sangue (e, conseqüentemente, de azul de Evans) presente no leito vascular das vias aéreas. O pulmão foi então retirado (em conjunto com a traquéia), lavado em PBS, dividido em 2 partes, e ambas

pesadas em balança analítica. Uma porção foi colocada a 37°C para secagem e pesada novamente após 24 h para que fosse estabelecido seu peso seco. A segunda porção de cada pulmão foi cortada em pedaços pequenos e colocada em formamida (4 ml para cada grama de peso; SIGMA®) por 24 h a 37°C. Alíquotas resultantes da extração do azul de Evans em formamida tiveram sua absorbância analisada em 620nm (Titertek® Multiskan MCC340, ICN) e comparadas com soluções de concentração conhecida de azul de Evans em formamida (após regressão linear utilizando-se o GraphPad InStat®) para estimativa da quantidade do corante presente nestas amostras. O aumento de permeabilidade vascular foi então expresso em microgramas de azul de Evans por grama de tecido seco (utilizando-se para isso o percentual de peso seco de cada pulmão proveniente da pesagem de amostras antes e depois de sua secagem).

4.11 Tratamento estatístico dos dados obtidos

Dados comportamentais foram analisados por teste t, corrigido pelo método de Welch para diferentes desvios padrão quando necessário. Níveis de anticorpos séricos foram analisados por teste t ou por ANOVA, de acordo com o número de grupos. O número de núcleos marcados por imunoistoquímica para Fos e a avaliação de permeabilidade vascular foram analisados por ANOVA seguida de teste de Tukey. Nos casos em que houve diferença significativa de desvios padrão entre grupos, os dados foram transformados em seus respectivos logaritmos decimais antes da análise estatística. O limite de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo em todas as análises. Todos os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Foram utilizados os pacotes estatísticos GraphPad InStat (versão 3.0) e SigmaStat (versão 7.0) para Microsoft® Windows.

5 RESULTADOS

5.1 Experimento 1

Efeito da inalação de OVA sobre a ativação de núcleos específicos do SNC (PVN e CeA) e sobre um comportamento de esquiva em animais alérgicos à OVA.

Buscamos avaliar inicialmente as áreas do SNC ativadas por um único desafio intranasal com o alérgeno em animais imunizados com OVA. Ainda, analisamos o efeito do pareamento da exposição ao alérgeno com um contexto particular, a entrada em um compartimento escuro de uma caixa adaptada de esquiva, sobre o desenvolvimento de uma resposta adaptativa: evitar o local do desafio com OVA.

5.1.1 Animais imunizados apresentam anticorpos específicos anti-OVA

Para termos certeza da eficácia da imunização com OVA, foi coletado sangue de todos os animais utilizados neste experimento e quantificados os níveis de anticorpos IgE e IgG1 anti-OVA, característicos de reação alérgica e respostas polarizadas Th2 em camundongos. Animais imunizados tinham níveis altos de IgE e IgG1 anti-OVA quando comparados com seus controles não-imunizados. Os dois protocolos de imunização utilizados foram capazes de induzir a geração de anticorpos destas classes (Figura 1).

Figura 1 – Níveis séricos de anticorpos anti-OVA em animais imunizados com OVA. A imunização com OVA causou aumento dos níveis de IgE e IgG1 no soro de animais imunizados (I+O) em relação aos animais não imunizados (NI+O). * indica diferença em relação ao grupo NI+O. $n = 14-17$ animais por grupo. (A) Níveis de IgE anti-OVA ($t(13) = 8,45$, $p < 0,05$). (B) Níveis de IgG1 anti-OVA ($t(13) = 6,51$, $p < 0,05$)

5.1.2 Camundongos alérgicos têm aumento de expressão de Fos no PVN e CeA

A quantificação da marcação de Fos (um marcador aceito de ativação neuronal) mostrou que animais alérgicos desafiados com OVA intranasal (grupo I+O) possuem aumento da atividade do PVN e CeA se comparados com seus controles, a saber: animais não-imunizados que receberam OVA (NI+O), imunizados que receberam salina (I+S), ou não manipulados (naive) retirados de suas caixas antes da perfusão (Figuras 2, 3 e 4). Uma possível influência do procedimento anestésico na expressão de Fos no PVN e CeA pode ser descartada, nas nossas condições experimentais, pois os animais controles não possuem o mesmo padrão de ativação observado nos camundongos do grupo I+O.

Figura 2 – Marcação imunoistoquímica de Fos no PVN e CeA de camundongos imunizados e desafiados com OVA. Animais imunizados que receberam o antígeno (I+O) apresentaram maior número de núcleos marcados com Fos no PVN (A) e CeA (B) do que animais dos grupos I+S (que haviam sido imunizados e receberam solução salina), NI+O (não imunizados que receberam OVA) ou naive (retirados da caixa imediatamente antes do sacrifício). * indica diferença em relação a todos os outros grupos; $n = 4-5$ animais por grupo. (A) PVN ($F(3,12) = 11,69$, $p < 0,05$). (B) CeA ($F(3,15) = 55,91$, $p < 0,05$)

Figura 3 – Instilação intranasal de OVA induz a expressão de Fos no PVN de animais imunizados. Cortes histológicos representativos mostram praticamente a ausência de núcleos positivos para Fos no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) de animais dos grupos naive (A), NI+O (B) e I+S (C); por outro lado, animais imunizados e desafiados com OVA (I+O) apresentaram grande número de células marcadas para Fos na mesma área (D). Barra de escala = 100 μ m

Figura 4 – Instilação intranasal de OVA induz a expressão de Fos no CeA de animais imunizados. Cortes histológicos representativos mostram praticamente a ausência de núcleos positivos para Fos no núcleo central da amígdala (CeA) de animais dos grupos naive (A), NI+O (B) e I+S (C); por outro lado, animais imunizados e desafiados com OVA (I+O) apresentaram grande número de células marcadas para Fos na mesma área (D). Barra de escala = 100 μ m

5.1.3 Locomoção não é alterada pelo desafio com OVA em animais imunizados

Camundongos imunizados desafiados com OVA 24 horas antes do teste em campo aberto apresentam níveis de atividade locomotora (Figura 5) semelhantes aos de animais não imunizados (7304 ± 981 cm e 6117 ± 1910 cm, respectivamente). Deste modo, os animais que haviam sido previamente imunizados e desafiados não apresentam um decréscimo em locomoção que pudesse incorrer em alterações no teste de esquiva, utilizado em nossos experimentos.

Figura 5 – Ambulação em campo aberto. A distância percorrida por animais imunizados (I+O) ou não (NI+O) e desafiados com OVA mostra que este parâmetro comportamental é semelhante nos animais de ambos os grupos ($t(16) = 1,93$, $p > 0,05$; $n = 12-13$ animais por grupo)

5.1.4 Animais imunizados evitam o compartimento escuro associado ao desafio com OVA

Durante a sessão de treino na caixa claro-escuro não houve diferença entre os animais não imunizados (NI+O) e imunizados (I+O) (34 ± 24 s e 24 ± 18 s, respectivamente) quanto à latência para a passagem do lado claro (teoricamente aversivo) ao lado escuro. No entanto, durante o teste (dia seguinte) a demora para passar ao lado escuro da caixa foi consideravelmente maior em animais imunizados, comparados ao grupo NI+O (194 ± 38 s e 9 ± 9 s, respectivamente), ou a eles mesmos no dia do treino (24 ± 18 s). Assim, os camundongos imunizados evitam o compartimento no qual eles foram desafiados com OVA, enquanto os animais não-imunizados não o fazem (Figura 6).

Figura 6 – Teste de esquia na caixa claro-escuro. Durante a sessão de treino, animais não-imunizados (NI+O) e imunizados (I+O), ambos desafiados com OVA, se comportaram de modo semelhante na caixa de esquia; o tempo médio de latência para a primeira passagem ao lado escuro da caixa não foi diferente ($t(9) = 0,75$, $p = 0,47$). No entanto, durante a sessão de teste, os animais do grupo I+O permaneceram por mais tempo no lado claro da caixa quando comparados com animais do grupo NI+O ($t(3) = 9,55$, $p < 0,05$), ou com eles mesmos durante a sessão de treino ($t(6) = 7,08$, $p < 0,05$). # indica diferença entre as sessões de treino e teste, para o grupo I+O; * indica diferença entre os grupos I+O e NI+O no dia do teste. $n = 4-7$ animais por grupo

5.2 Experimento 2

Efeito da indução de tolerância imunológica sobre a ativação do SNC e sobre o comportamento de esquiva em animais expostos à OVA.

Como as reações alérgicas são dependentes da produção de anticorpos IgE e IgG1 específicos direcionados ao alérgeno (neste caso, a OVA), buscamos investigar o efeito da indução de tolerância imunológica por apresentação desse antígeno por via oral anteriormente à imunização primária, visto que tal procedimento foi descrito como eficaz na inibição da produção de anticorpos e no desenvolvimento de respostas alérgicas (RUSSO et al., 2001).

5.2.1 Tolerância oral foi capaz de impedir a produção de anticorpos anti-OVA

Assim como amplamente descrito, a indução de tolerância imunológica por administração oral do antígeno previamente à imunização foi capaz de modificar a produção de anticorpos específicos anti-OVA dos isotipos IgE e IgG1. A tolerância oral preveniu totalmente a produção de IgE (Figura 7A) e IgG1 (Figura 7B) anti-OVA, visto que os níveis dessas imunoglobulinas em animais do grupo T+O não diferem daqueles encontrados nos animais não imunizados (NI+O), porém ambos diferem daqueles de animais do grupo I+O.

Figura 7 – Níveis de anticorpos anti-OVA em camundongos submetidos ao protocolo de tolerância oral a OVA previamente à imunização. A indução de tolerância imunológica foi capaz de inibir a produção de anticorpos anti-OVA nos animais do grupo T+O, comparados aos grupos imunizado (I+O) e não imunizado (NI+O) que receberam OVA. Anticorpos do isotipo IgE (A) e IgG1 (B) foram suprimidos pela indução prévia de tolerância, pois os valores do grupo T+O não diferem daqueles do grupo NI+O, enquanto ambos apresentam valores menores que aqueles encontrados no grupo I+O. * indica diferença em relação a todos os outros grupos. $n = 8-11$ animais por grupo. (A) ($F(2,23) = 26,07$, $p < 0,05$). (B) ($F(2,23) = 48,72$, $p < 0,05$)

5.2.2 Tolerância oral impediu a expressão de Fos no PVN e CeA induzida pela OVA

A ativação dos núcleos paraventricular do hipotálamo (PVN) e central da amígdala (CeA) observada anteriormente nos animais imunizados e desafiados com OVA foi prevenida em ambas as estruturas pela indução prévia de tolerância imunológica. A figura 8 apresenta quantificação de corpos celulares de neurônios dessas duas áreas marcados para a proteína Fos. A figura 9 apresenta exemplos representativos de marcação imunoistoquímica de Fos em animais controles (NI+O), imunes (I+O) e tolerantes (T+O) no PVN (painéis A, B e C, respectivamente) e no CeA (painéis D, E e F, respectivamente).

Figura 8 – Marcação imunoistoquímica de Fos no PVN e CeA de camundongos tolerantes, imunizados e desafiados com OVA. Animais do grupo tolerante (T+O) apresentaram número de núcleos marcados com Fos no PVN (A) e CeA (B) semelhante aquele encontrado nos animais do grupo não imunizado (NI+O). Animais do grupo imunizado (I+O) apresentaram um aumento do número de núcleos marcados nessas duas áreas, quando comparado àqueles dos grupos NI+O e T+O. * indica diferença em relação aos grupos NI+O e T+O. $n = 4$ animais por grupo. (A) $F(2,9) = 237,9, p < 0,05$. (B) $F(2,9) = 403,9, p < 0,05$

Figura 9 – Ilustração da marcação imunoistoquímica para Fos em animais tolerantes (dia -7). Enquanto animais imunizados e desafiados com OVA (grupo I+O) apresentam um grande número de células marcadas para Fos no PVN (B) e CeA (E), a atividade desses núcleos em animais tolerantes (T+O; painéis C e F) se assemelha àquela vista nos animais não imunizados (NI+O; painéis A e D). As setas indicam a marcação positiva para Fos no PVN (esquerda) e CeA (direita) apenas de animais do grupo I+O, enquanto que naqueles de outros grupos (NI+O e T+O) tal marcação é praticamente inexistente. Barra de escala = 100 μ m

5.2.3 Animais tolerantes não evitam o compartimento escuro associado ao desafio com OVA

Animais tornados tolerantes pelo protocolo descrito acima, e submetidos ao teste de esQUIVA passiva, utilizando OVA como o estímulo aversivo, não evitam o compartimento escuro no dia de teste, enquanto que aqueles animais do grupo imune demoram a entrar no compartimento onde haviam sido submetidos a nebulização com OVA (Figura 10). Assim, anticorpos IgE e IgG1 anti-OVA parecem ser importantes na sinalização para o SNC de uma resposta imunológica iniciada por desafio com o aeroalérgeno.

Figura 10 – Teste de esQUIVA na caixa claro-escuro com camundongos tolerantes a OVA. Durante a sessão de treino, animais tolerantes (T+O) ou não a OVA (I+O), que foram posteriormente imunizados e desafiados com OVA, se comportam de modo semelhante na caixa de esQUIVA; o tempo médio de latência para a primeira passagem ao lado escuro da caixa não foi diferente ($t(6) = 0,33$, $p = 0,75$). No entanto, durante a sessão de teste, os animais do grupo I+O permaneceram por mais tempo no lado claro da caixa quando comparados com animais do grupo T+O ($t(6) = 6,61$, $p < 0,05$), ou com eles mesmos durante a sessão de treino ($t(6) = 6,14$, $p < 0,05$). # indica diferença entre as sessões de treino e teste, para o grupo I+O; * indica diferença entre os grupos I+O e T+O no dia do teste. $n = 4$ animais por grupo

5.3 Experimento 3

Avaliação da influência do padrão de resposta inflamatória pulmonar mediante a utilização de animais da linhagem C3H/HeJ.

Como o teste de esquiva passiva, com OVA como estímulo aversivo, é realizado após múltiplos desafios antigênicos, não podíamos descartar *a priori* a participação da inflamação alérgica pulmonar na geração desta resposta. Assim, optamos pela utilização da linhagem de camundongos citada acima visto que não desenvolvem uma inflamação alérgica pulmonar característica dos modelos murinos de asma (RUSSO¹, 2004), que por sua vez tenta reproduzir características da fase tardia da reação de hipersensibilidade imediata em humanos. Animais C3H/HeJ apresentam reduzido infiltrado inflamatório peribroncovascular quando imunizados e desafiados com OVA. Além disso, a célula predominante em tal infiltrado, quando ocorre, é o neutrófilo polimorfonuclear, e não o eosinófilo, como observado em modelos de asma experimental. Inicialmente, buscamos a reprodução dos resultados observados em animais BALB/c quanto à ativação do SNC pela instilação de OVA intranasal em camundongos imunizados, pois se animais C3H/HeJ não apresentassem a ativação do SNC observada em animais BALB/c, não faria sentido buscar uma resposta comportamental de aversão relacionada à apresentação do alérgeno por via aérea.

¹ Informação fornecida por Russo em São Paulo, em 2004.

5.3.1 Camundongos C3H/HeJ imunizados desenvolvem anticorpos anti-OVA

Animais da linhagem C3H/HeJ desenvolvem, à semelhança de camundongos BALB/c, anticorpos IgE e IgG1 anti-OVA, após imunização e desafio com OVA (Figura 11).

Figura 11 – Níveis séricos de anticorpos anti-OVA em camundongos C3H/HeJ imunizados com OVA. A imunização com OVA causou aumento dos níveis de IgE e IgG1 no soro de animais imunizados (I+O) em relação aos animais não imunizados (NI+O). * indica diferença em relação ao grupo NI+O. $n = 9-13$ animais por grupo. (A) Níveis de IgE anti-OVA ($t(8) = 6,71, p < 0,05$). (B) Níveis de IgG1 anti-OVA ($t(8) = 9,32, p < 0,05$)

5.3.2 Camundongos C3H/HeJ imunizados apresentam aumento de atividade do PVN e CeA frente ao desafio com OVA, à semelhança daquele observado nos animais BALB/c

Com a finalidade de utilizarmos essa linhagem de camundongos no teste de esquiva com OVA como estímulo aversivo, deveríamos antes averiguar se esses animais apresentam ativação do PVN e CeA após imunização e desafio com OVA. A figura 12 apresenta a quantificação das células marcadas para Fos nos núcleos citados acima. À semelhança das observações feitas em camundongos BALB/c, apenas os animais imunizados e desafiados com OVA intranasal (I+O) apresentaram um grande número de células positivas para Fos no PVN (Figura 12A) e CeA (Figura 12B). Animais não imunizados que receberam OVA (NI+O) e animais imunizados que receberam solução salina (I+S) praticamente não apresentaram células positivas para Fos nos núcleos analisados. A marcação característica de cada grupo é exemplificada na figura 13.

Figura 12 – Marcação imunoistoquímica de Fos no PVN e CeA de camundongos da linhagem C3H/HeJ imunizados e desafiados com OVA. Animais imunizados que receberam o antígeno (I+O) apresentaram maior número de núcleos marcados com Fos no PVN (A) e CeA (B) do que animais dos grupos I+S (que haviam sido imunizados e receberam solução salina) e NI+O (não imunizados que receberam OVA). * indica diferença em relação a todos os outros grupos; $n = 4$ animais por grupo. (A) PVN ($F(2,9) = 797,31$, $p < 0,05$). (B) CeA ($F(2,9) = 177,79$, $p < 0,05$)

Figura 13 – Marcação imunoistoquímica para Fos nos núcleos paraventricular do hipotálamo (PVN, painéis A, B e C) e central da amígdala (D, E e F) em animais C3H/HeJ imunizados e desafiados com OVA (I+O). As imagens ilustram o aumento no número de células marcadas para Fos nos núcleos escolhidos apenas nos animais do grupo I+O (à semelhança daquela encontrada em camundongos da linhagem BALB/c), enquanto tal marcação é praticamente inexistente nos animais dos outros grupos (NI+O e I+S). Barra de escala = 100 μ m

5.3.3 Animais C3H/HeJ evitam o compartimento escuro associado ao desafio com OVA

O teste de esquiava realizado em animais C3H/HeJ apresentou resultados semelhantes aos descritos anteriormente para a linhagem BALB/c. Enquanto que no dia de treino os animais imunizados (I+O) se comportaram como os não imunizados (NI+O), na sessão de teste, os animais do grupo I+O demoraram mais tempo para entrar no compartimento escuro que aqueles do grupo NI+O, ou que eles mesmo no dia anterior (Figura 14). Como o teste de esquiava realizado com animais da linhagem C3H/HeJ, que não apresentam inflamação alérgica pulmonar após desafio com OVA inalada, apresentou resultados semelhantes aos observados em animais BALB/c, a resposta inflamatória associada à fase tardia da resposta de hipersensibilidade imediata não parece ser essencial para a geração do comportamento de evitar um local previamente associado à nebulização do antígeno (OVA) com o qual os animais foram previamente imunizados.

Figura 14 – Teste de esquiava na caixa claro-escuro com camundongos da linhagem C3H/HeJ. Na sessão de treino, animais não-imunizados (NI+O) e imunizados (I+O), ambos desafiados com OVA, se comportaram de modo semelhante na caixa de esquiava; o tempo médio de latência para a primeira passagem ao lado escuro da caixa não foi diferente ($t(8) = 0,35$, $p = 0,74$). No entanto, durante a sessão de teste, os animais do grupo I+O permaneceram por mais tempo no lado claro da caixa quando comparados com animais do grupo NI+O ($t(4) = 12,55$, $p < 0,05$), ou com eles mesmos durante a sessão de treino ($t(4) = 12,30$, $p < 0,05$). # indica diferença entre as sessões de treino e teste, para o grupo I+O; * indica diferença entre os grupos I+O e NI+O no dia do teste. $n = 5$ animais por grupo

5.4 Experimento 4

Efeito da indução de tolerância imunológica, iniciada no dia da imunização primária com OVA, sobre a ativação do SNC e sobre o comportamento de esquiva em animais expostos à OVA.

A intenção da utilização deste protocolo de indução de tolerância imunológica foi a discriminação entre as respostas dependentes de IgE e IgG1, no que diz respeito tanto à ativação do SNC, quanto ao comportamento de animais imunizados no teste de esquiva descrito anteriormente. Como descrito anteriormente (RUSSO et al., 2001), a ingestão da solução de OVA iniciando-se no mesmo dia da imunização primária com este antígeno parece ser eficaz na inibição de produção de IgE, mas não de IgG1 anti-OVA. Desta maneira, comparando-se os resultados encontrados neste experimento com aqueles observados no Experimento 2, onde o consumo de OVA visando a indução de tolerância foi realizado na semana anterior à imunização primária, poderemos analisar a importância relativa dos isotipos IgE e IgG1 na ativação do SNC e no comportamento de esquiva após desafio com OVA.

5.4.1 Tolerância oral no dia 0 foi capaz de impedir a produção de anticorpos IgE, mas não IgG1 anti-OVA

Ao contrário do observado quando a tolerância imunológica foi induzida a partir da semana anterior à imunização primária, o protocolo utilizado nesse experimento previne a produção de anticorpos IgE anti-OVA (Figura 15A), mas não de IgG1 (Figura 15B). Assim, as respostas observadas no decorrer deste experimento ocorrem na ausência de IgE e presença de IgG1.

Figura 15 – Níveis de anticorpos anti-OVA em camundongos submetidos ao protocolo de tolerância oral a OVA iniciado concomitante à imunização primária. A indução de tolerância imunológica no dia 0 foi capaz de inibir a produção de anticorpos IgE (A) anti-OVA nos animais do grupo T+O, comparados aos grupos imunizado (I+O) que receberam OVA. No entanto, a resposta de IgG1 (B) foi mantida em animais tolerantes, pois os valores do grupo T+O não diferem daqueles do grupo I+O. * indica diferença em relação ao grupo T+O. $n = 13-14$ animais por grupo. (A) $t(13) = 6,72$, $p < 0,05$. (B) $t(13) = 0,88$, $p < 0,05$

5.4.2 A tolerância oral no dia 0 impediu o aumento de expressão de Fos no PVN e CeA induzido pela OVA, à semelhança da tolerância iniciada no dia -7

Camundongos submetidos a indução de tolerância imunológica na semana da imunização primária se comportaram como aqueles tornados tolerantes durante a semana anterior à imunização (Experimento 2). A figura 16 mostra que apenas animais imunizados e desafiados com OVA (grupo I+O) apresentam aumento de atividade do PVN e CeA, medido por marcação imunoistoquímica para Fos, enquanto animais tolerantes desafiados com OVA (T+O) se comportam à semelhança daqueles recebendo salina (T+S) ou imunizados que receberam solução salina (I+S), praticamente sem neurônios marcados para Fos. Assim, como o protocolo de indução de tolerância imunológica utilizado nesse experimento apenas a produção de IgE, e os animais tolerantes não apresentaram ativação no SNC, esse isotipo parece ser essencial para a sinalização da resposta alérgica iniciada por instilação intranasal de OVA para o SNC. A marcação de Fos é ilustrada nas figuras 17 e 18.

Figura 16 – Marcação imunoistoquímica de Fos no PVN e CeA de camundongos tolerantes, imunizados e desafiados com OVA. Animais do grupo tolerante (T+O) apresentaram número de núcleos marcados com Fos no PVN (A) e CeA (B) após desafio com OVA semelhante àquele encontrado nos animais tolerantes que receberam salina (T+S) e àquele do grupo imunizado que recebeu salina (I+S). Por outro lado, animais imunizados e desafiados com OVA (I+O) apresentaram grande número de núcleos marcados para Fos nessas áreas. * indica diferença em relação a todos os outros grupos. $n = 3-4$ animais por grupo. (A) $F(3,11) = 193,77$, $p < 0,05$. (B) $F(3,11) = 98,67$, $p < 0,05$

Figura 17 – Ilustração da marcação imunoistoquímica para Fos no PVN em animais tolerantes (dia 0). Enquanto animais imunizados e desafiados com OVA (grupo I+O) apresentam um grande número de células marcadas para Fos (D) a atividade desses núcleos em animais tolerantes recebendo salina (T+S) ou OVA (T+O), assim como nos animais imunizados que receberam salina (I+S) é praticamente inexistente. Barra de escala = 100 μ m

Figura 18 – Ilustração da marcação imunoistoquímica para Fos no CeA em animais tolerantes (dia 0). Enquanto animais imunizados e desafiados com OVA (grupo I+O) apresentam um grande número de células marcadas para Fos (D) a atividade desses núcleos em animais tolerantes recebendo salina (T+S) ou OVA (T+O), assim como nos animais imunizados que receberam salina (I+S) é praticamente inexistente. Barra de escala = 100 μ m

5.4.3 Animais submetidos à indução de tolerância com início no dia 0 não evitam o compartimento escuro que fora associado ao desafio com OVA

O comportamento de evitar um local previamente associado a nebulização com OVA por parte de animais alérgicos não ocorre naqueles camundongos tornados tolerantes por consumo de OVA iniciado junto à imunização primária. A figura 19 mostra que no dia de treino não há diferença entre animais tornados tolerantes a OVA (T+O) ou não (I+O) na latência para a primeira entrada no compartimento escuro da caixa de esQUIVA. No entanto, animais do grupo I+O demoraram mais para a primeira passagem ao lado escuro da caixa no dia de teste, quando comparados a eles mesmos no dia de treino ou aos animais do grupo T+O no dia de teste. Portanto, a tolerância foi capaz de impedir a aversão dos animais pelo compartimento da caixa previamente associado com a nebulização com o alérgeno.

Figura 19 – Teste de esQUIVA na caixa claro-escuro com camundongos tolerantes a OVA. Durante a sessão de treino, animais tolerantes (T+O) ou não a OVA (I+O), que foram posteriormente imunizados e desafiados com OVA, se comportam de modo semelhante na caixa de esQUIVA; o tempo médio de latência para a primeira passagem ao lado escuro da caixa não foi diferente ($t(18) = 0,55$, $p = 0,59$). No entanto, durante a sessão de teste, os animais do grupo I+O permaneceram por mais tempo no lado claro da caixa quando comparados com animais do grupo T+O ($t(9) = 10,68$, $p < 0,05$), ou com eles mesmos durante a sessão de treino ($t(18) = 1,07$, $p < 0,05$). # indica diferença entre as sessões de treino e teste, para o grupo I+O; * indica diferença entre os grupos I+O e T+O no dia do teste. $n = 4$ animais por grupo

5.5 Experimento 5

Efeito do tratamento prévio com cromoglicato dissódico, um inibidor da desgranulação de mastócitos, sobre a ativação do SNC em camundongos imunizados e desafiados com OVA, assim como sobre o desenvolvimento de um comportamento de esquia induzido pelo alérgeno.

Como a fase imediata da reação alérgica parece estar envolvida na ativação do PVN e CeA, visto que tal ativação ocorre 90 minutos após o desafio com OVA em animais imunizados, e a principal célula efetora dessa fase da resposta alérgica é o mastócito, buscamos impedir a sua desgranulação empregando o tratamento farmacológico com cromoglicato dissódico, amplamente utilizado como antialérgico em humanos.

5.5.1 Tratamento com cromoglicato não altera a produção de anticorpos anti-OVA

O tratamento com cromoglicato dissódico não alterou a produção de anticorpos IgE ou IgG1 anti-OVA (Figura 20). Animais imunizados tratados (I+Cro) ou não (I+O) com cromoglicato apresentaram níveis de ambas as classes de imunoglobulina maiores que aqueles encontrados em animais não imunizados (NI+O).

Figura 20 – Níveis de anticorpos anti-OVA em camundongos submetidos ao tratamento com cromoglicato dissódico. O tratamento com cromoglicato não alterou a produção de IgE (A) nem de IgG1 anti-OVA (B). Animais do grupo tratado (I+Cro) apresentaram níveis semelhantes de ambas as classes de imunoglobulina quando comparados aos do grupo imunizado não tratado (I+O); esses dois grupos apresentaram níveis de anticorpos maiores que os encontrados em animais não imunizados (NI+O). * indica diferença em relação a todos os outros grupos. $n = 4-7$ animais por grupo. (A) $(F(2,12) = 30,03, p < 0,05)$. (B) $(F(2,12) = 93,12, p < 0,05)$

5.5.2 Cromoglicato inibiu a expressão de Fos no PVN e CeA induzida pela OVA

Pode-se observar na figura 21 que animais tratados com cromoglicato (I+Cro) não apresentam ativação do PVN ou CeA após desafio com OVA. Enquanto animais do grupo imunizado (I+O) apresentam grande número de células marcadas para Fos nesses núcleos, camundongos do grupo I+Cro apresentam marcação para Fos semelhante àquela encontrada em animais não imunizados tratados (N+Cro) ou não (N+O) com cromoglicato. Portanto, a desgranulação de mastócitos durante a fase imediata da resposta alérgica é importante na transmissão do sinal proveniente da resposta imunológica disparada pela presença do alérgeno em vias aéreas para o SNC. As figuras 22 e 23 ilustram a marcação encontrada nos animais citados acima, nos núcleos PVN e CeA (respectivamente).

Figura 21 – Marcação imunoistoquímica de Fos no PVN e CeA de camundongos tratados com cromoglicato dissódico. O tratamento prévio com cromoglicato dissódico foi capaz de impedir a ativação do SNC induzida pela reação alérgica. Animais do grupo imunizado e tratado com cromoglicato dissódico (I+Cro) apresentaram número de núcleos marcados com Fos no PVN (A) e CeA (B) semelhantes aquele encontrado nos animais não imunizados, tratados (N+Cro) ou não (N+O) com cromoglicato dissódico. Animais do grupo imunizado (I+O) apresentaram um aumento no número de núcleos marcados nessas duas áreas, quando comparado àquele dos grupos I+Cro, N+Cro e N+O. * indica diferença em relação a todos os outros grupos. $n = 3-5$ animais por grupo. (A) $F(3,12) = 95,69, p < 0,05$. (B) $F(3,12) = 36,26, p < 0,05$

Figura 22 – Ilustração da marcação imunoistoquímica para Fos no PVN em animais tratados com cromoglicato dissódico. Animais imunizados, tratados com cromoglicato dissódico (I+Cro) e posteriormente desafiados com OVA praticamente não apresentaram núcleos marcados para Fos no PVN, à semelhança da marcação observada em animais não imunizados, tratados (N+Cro) ou não (N+O) com o fármaco; por outro lado, animais não tratados e desafiados com OVA (I+O) apresentavam um grande número de células marcadas para Fos. Barra de escala = 100 μ m

Figura 23 – Ilustração da marcação imunoistoquímica para Fos no CeA em animais tratados com cromoglicato dissódico. Animais imunizados, tratados com cromoglicato dissódico (I+Cro) e posteriormente desafiados com OVA praticamente não apresentaram núcleos marcados para Fos no CeA, à semelhança da marcação observada em animais não imunizados, tratados (N+Cro) ou não (N+O) com o fármaco; por outro lado, animais não tratados e desafiados com OVA (I+O) apresentavam um grande número de células marcadas para Fos. Barra de escala = 100 μ m

5.5.3 Animais tratados previamente com cromoglicato não evitam o compartimento escuro que fora associado ao desafio com OVA

O tratamento prévio com cromoglicato dissódico, realizado com o intuito de impedir a desgranulação de mastócitos presentes nas vias aéreas de animais imunizados, foi eficaz na inibição do comportamento de evitar o compartimento escuro da caixa de esquia, previamente associado a nebulização com o alérgeno. No dia de treino, não houve diferença entre animais tratados (I+Cro) ou não (I+O) com cromoglicato na latência para a primeira entrada no lado escuro da caixa. No entanto, no dia de teste, apenas animais do grupo I+O evitaram a ida ao compartimento em que receberam a nebulização com OVA no dia anterior (Figura 24). Animais do grupo I+Cro passaram ao lado escuro da caixa tão rápido quanto no primeiro dia, demonstrando que o tratamento prévio com esse fármaco foi capaz de prevenir o desenvolvimento da aversão pelo compartimento associado ao alérgeno.

Figura 24 – Teste de esquia na caixa claro-escuro com camundongos tratados previamente com cromoglicato dissódico. Durante a sessão de treino, animais tratados (Cro+O) ou não (I+O) com cromoglicato dissódico, que foram imunizados e desafiados com OVA, se comportam de modo semelhante na caixa de esquia; o tempo médio de latência para a primeira passagem ao lado escuro da caixa não foi diferente ($t(11) = 1,34, p = 0,21$). No entanto, durante a sessão de teste, os animais do grupo I+O permaneceram por mais tempo no lado claro da caixa quando comparados com animais do grupo I+Cro ($t(11) = 9,58, p < 0,05$), ou com eles mesmos durante a sessão de treino ($t(5) = 9,38, p < 0,05$). [#] indica diferença entre as sessões de treino e teste, para o grupo I+O; * indica diferença entre os grupos I+O e I+Cro no dia do teste. $n = 6-7$ animais por grupo

5.5.4 Cromoglicato diminuiu o aumento de permeabilidade vascular induzido pelo desafio com OVA no pulmão de animais previamente imunizados

Para avaliarmos, ainda que de forma indireta, a eficácia do tratamento com cromoglicato dissódico sobre a desgranulação de mastócitos induzida pelo desafio com OVA nas vias aéreas, animais imunizados e desafiados por ambos os protocolos descritos no item apropriado foram utilizados para este experimento. A figura 25 apresenta os resultados de permeabilidade vascular em animais imunizados e desafiados de acordo com o protocolo A (esquerda) ou B (direita). Em ambos os casos, a administração prévia de cromoglicato dissódico foi capaz de reduzir o extravasamento vascular de azul de Evans induzido pela instilação intranasal de OVA em animais imunizados. Apesar de não se comportarem de maneira idêntica aos animais não imunizados (grupo naïve), camundongos tratados com cromoglicato (I+Cro) apresentaram redução de 46,3% (A) e 43,2% (B) na quantidade recuperada de azul de Evans de seus pulmões, quando comparados a animais não tratados (I+O). Assim, ao menos parcialmente, o tratamento com cromoglicato dissódico foi capaz de impedir a desgranulação de mastócitos induzida por OVA em animais imunizados.

Figura 25 – Avaliação do efeito do tratamento prévio com cromoglicato dissódico sobre o aumento de permeabilidade vascular. Animais imunizados e tratados com cromoglicato dissódico (I+Cro) tiveram redução no aumento de permeabilidade vascular induzido por OVA quando comparados com animais não tratados com o fármaco (I+O). (A) Nos animais imunizados pelo protocolo A (imunizados nos dia 0 desafiados nos dias 12,13 e 14) a redução média do aumento de permeabilidade vascular no grupo I+Cro em relação ao grupo I+O foi 43,2% ($F(2,12) = 40,49$, $p < 0,05$, $n = 5$ animais por grupo). (B) Naqueles imunizados de acordo com o protocolo B (com duas imunizações e um único desafio) a redução média do aumento de permeabilidade vascular no grupo I+Cro em relação ao grupo I+O foi 46,3% ($F(2,14) = 249,81$, $p < 0,05$, $n = 4-7$ animais por grupo). É importante notar que em nenhum dos casos o tratamento com cromoglicato impediu totalmente o aumento de permeabilidade vascular em animais imunizados, quando comparados com animais controle (naive). * indica diferença em relação a todos os outros grupos. # indica diferença em relação ao grupo naive

6 DISCUSSÃO

Nossos resultados evidenciaram os seguintes fatos: 1) camundongos alérgicos a OVA e desafiados uma única vez com o antígeno por via intranasal apresentam aumento de expressão de Fos no PVN e no CeA; 2) a ativação do PVN e do CeA ocorre tão cedo quanto 90 minutos após o desafio, implicando a fase imediata da hipersensibilidade imediata, com pouco ou nenhum infiltrado inflamatório, e importante participação de mastócitos sensibilizados por IgE; 3) o desenvolvimento da aversão foi observado em animais desafiados várias vezes, e por esta razão, com um importante processo inflamatório em curso, não sendo possível então eliminar esse componente como responsável pela aversão ao lado escuro; animais imunizados e desafiados por nebulização com OVA evitam o compartimento de uma caixa de esquiwa (claro-escuro) que fora associado ao antígeno; 4) tanto a alteração na expressão de Fos quanto o desenvolvimento de aversão ao compartimento associado à OVA foram abolidos pela indução de tolerância imunológica, capaz de suprimir a produção de IgE e IgG1 anti-OVA; 5) nem a ativação do PVN e CeA nem o desenvolvimento de aversão ao local associado ao antígeno são dependentes de um processo inflamatório em curso no pulmão, pois camundongos C3H/HeJ que não desenvolvem a inflamação alérgica característica de modelos murinos de asma comportaram-se como animais BALB/c; 6) a indução de tolerância imunológica iniciada no mesmo dia da imunização primária foi capaz de suprimir totalmente tanto a ativação do SNC, quanto o desenvolvimento da aversão ao lado escuro da caixa, demonstrando que o principal isotipo na modulação de ambos os parâmetros estudados é a IgE, pois este protocolo de tolerização não inibe a produção de IgG1; 7) o tratamento prévio com um desgranulador de mastócitos, o cromoglicato dissódico, evitou a ativação do SNC mediante o desafio com a OVA, bem como preveniu o

estabelecimento da aversão ao compartimento associado ao antígeno; 8) o tratamento com cromoglicato foi capaz de inibir o aumento de extravasamento vascular induzido pelo desafio com OVA em animais imunizados, sendo este um método aceito para avaliar, ainda que de modo indireto, a desgranulação de mastócitos, um fenômeno característico da fase imediata das alergias em geral.

Os resultados do primeiro experimento desse projeto apontam inicialmente dois fatos relevantes. Em animais imunizados com OVA, o primeiro contato com o alérgeno por via aerógena é suficiente para levar à ativação de dois núcleos do SNC com funções cruciais na elaboração de respostas adaptativas tanto endócrinas quanto comportamentais, o PVN e o CeA. Camundongos imunizados associam o contexto em que são desafiados com o alérgeno com as decorrências desse desafio e passam a evitar o local que contenha o antígeno, demonstrando uma vantagem adaptativa da sinalização do SI para o SNC neste modelo.

Desde a demonstração do ‘efeito rosa’, em que pacientes alérgicos apresentavam crises frente uma rosa falsa, observa-se que as reações alérgicas pulmonares podem ser influenciadas pelo SNC; além do mais, nesses pacientes já ficava claro um possível valor adaptativo dessa resposta: os pacientes alérgicos evitariam rosas a qualquer custo (falsas ou não) diminuindo a chance de crises (MACKENZIE, 1886). O efeito do condicionamento de uma resposta alérgica pulmonar havia sido demonstrado havia pouco tempo em nosso laboratório. Ratos tornados alérgicos a OVA apresentavam todo o repertório de comportamentos associados a nebulização do alérgeno na ausência do mesmo, contanto que um sinal sonoro (estímulo condicionado) fosse previamente pareado com o antígeno, e reapresentado no momento do teste (PALERMO-NETO; GUIMARAES, 2000). Esse resultado sugere que a reação alérgica em curso nas vias aéreas sinalize de alguma maneira ao SNC, para que possa existir a criação de uma resposta condicionada, demonstrada posteriormente quando da apresentação do estímulo condicionado. Apesar de os autores não

abordarem quaisquer parâmetros histológicos ou imunológicos que lhes permitisse demonstrar que os animais montavam a resposta alérgica na ausência do alérgeno, tal presunção é cabível, visto que o condicionamento da desgranulação de mastócitos mediada por IgE foi descrita há muito (MACQUEEN et al., 1989).

Analizados em conjunto, os fatos colocados acima sugerem que o SNC recebe informações sobre uma reação alérgica ocorrendo em vias aéreas, e que tal sinal pode ser suficiente para gerar um comportamento adaptativo valioso: a capacidade de evitar a exposição ao alérgeno, associando-o ao local onde foi apresentado. Esses resultados sustentavam a possibilidade de uma importante interação imunoneuroendócrina durante uma resposta alérgica em vias aéreas.

As respostas adaptativas, com forte conteúdo afetivo ou emocional, são comumente associadas à ativação do PVN e do CeA (IVERSEN; KUPFERMANN; KANDEL, 2000) e as evidências sustentando a importância dessas áreas são inúmeras (MENZAGHI et al., 1993). Ambas são ativadas após exposição a estressores (HONKANIEMI et al., 1992) – avaliadas por meio da expressão de Fos. As maiores concentrações de CRF no SNC estão nessas áreas (GRAY, 1993), e sua produção está relacionada à ativação delas (COOK, 2004). O PVN é a estrutura central na ativação do eixo HPA, visto que produz CRF, estimulando a liberação de ACTH e culminando com a secreção de glicocorticóides, um dos fenômenos característicos de respostas de estresse e ansiedade (RIVIER; VALE, 1982). Além da importância endócrina, existe considerável evidência de que estas áreas participem da elaboração das respostas comportamentais associadas ao estresse. Com particular importância neste trabalho, uma intensa marcação de Fos no PVN (LAMPRECHT; DUDAI, 1995) e CeA (YAMAMOTO et al., 1997) em ratos submetidos a um condicionamento aversivo com cloreto de lítio foi descrita, reforçando a importância dessas áreas no momento de criação do condicionamento, isto é, do pareamento de estímulos não condicionado (UCS) e

condicionado (CS). Curiosamente, a relevância da ativação dessas áreas após a criação da resposta condicionada é controversa: enquanto Yamamoto e colaboradores encontraram ativação do CeA apenas com a reapresentação do CS (solução adocicada com sacarina) (YAMAMOTO et al., 1997), e Pezzone e colaboradores encontraram forte marcação de Fos no PVN durante reapresentação do CS (PEZZONE et al., 1992), Lamprecht e Dudai não observaram ativação seguinte ao CS (LAMPRECHT; DUDAI, 1995). Talvez a ativação de ambas as áreas seja crucial para o desenvolvimento da resposta condicionada, i.e., nos momentos de pareamento CS-UCS – cuja magnitude varia inclusive em função do número de pareamentos (NAVARRO et al., 2000) – mas não para sua recuperação e expressão. De fato, o bloqueio funcional do RNA mensageiro para *c-fos* com uma oligonucleotídeo antisense administrado diretamente na amígdala central prejudicou o estabelecimento de uma aversão condicionada a solução doce (LAMPRECHT; DUDAI, 1996) mostrando que, além de importante marcador de ativador neuronal, a proteína Fos participa ativamente de alguns processos essenciais nessas áreas específicas (tal como o CeA) e que, ao menos no momento de pareamento entre CS e UCS, sua expressão é crucial nesse núcleo.

Assim como estímulos físicos e cognitivos podem levar à ativação dessas áreas, com conseqüências sobre comportamentos adaptativos ou aversivos, perturbações do sistema imunológico podem levar a alterações comportamentais comparáveis e foram descritas como capazes de gerar sinal semelhante. Administração de LPS gera aumento de atividade do PVN e CeA (ELMQUIST et al., 1993; SAGAR et al., 1995; TKACS; LI; STRACK, 1997), correlacionado a inúmeras alterações comportamentais (por exemplo, aquelas englobadas no comportamento doentio). Dados de nosso laboratório mostram de forma inequívoca a ativação do PVN e do CeA durante uma resposta alérgica desencadeada contra um antígeno presente na dieta. Utilizando um modelo de alergia a OVA, observamos que camundongos apresentam marcação aumentada de Fos no PVN e CeA após desafio com OVA por gavagem

(BASSO et al., 2003). Ainda, camundongos alérgicos evitam o consumo de uma solução adocicada de clara de ovo (que contém o antígeno com o qual foram imunizados), demonstrando claramente o valor adaptativo da comunicação entre o SI e o SNC na modulação do comportamento animal. Como era de se esperar, a ativação do PVN e do CeA nesse modelo é relacionada à produção de CRF, visto que em cortes com dupla marcação (imunoistoquímica para Fos e hibridização *in situ* para transcritos de CRF) células marcadas para Fos também apresentam marcação para CRF¹.

A ativação do SNC encontrada em nossas condições é coerente com aquela descrita por vários grupos utilizando diversos modelos, e é particularmente semelhante àquela encontrada em nossos laboratórios, utilizando o referido modelo de alergia alimentar (BASSO et al., 2003). Apesar da diferente via de acesso do alérgeno ao organismo, aparentemente o sinal gerado pela sua apresentação é semelhante, assim como a resposta comportamental decorrente dele.

Com a finalidade de avaliar a elaboração de um comportamento adaptativo frente ao desafio com o alérgeno, modificamos um teste de esquiwa baseado na preferência natural de roedores por ambientes escuros; os animais normalmente optam pelo lado escuro de uma caixa, até que em dado momento são expostos a um estímulo potencialmente aversivo nesse compartimento. Ao invés de utilizarmos um estímulo convencional, como o choque elétrico, empregamos o alérgeno nebulizado, com a finalidade de avaliar uma resposta comportamental direcionada ao antígeno. Animais previamente imunizados evitam, após um único contato com o antígeno no compartimento escuro, passar a este lado da caixa de esquiwa, demonstrando que houve uma sinalização proveniente da reação alérgica para o SNC, responsável por gerar essa resposta aversiva. É importante ressaltar que animais manipulados de maneira semelhante, i.e., imunizados e desafiados seqüencialmente, não

¹ Informação fornecida por Basso em São Paulo, em 2004.

apresentaram qualquer déficit locomotor quando testados em um campo aberto, que pudesse explicar a maior demora em passar ao lado escuro da caixa de esquia. Como se trata de um aparelho que pressupõe a capacidade locomotora inalterada dos animais testados, esse controle era essencial para validar os resultados do teste de esquia. Analisados conjuntamente, os dados de ativação do SNC e a performance dos camundongos imunizados no teste de esquia parecem compatíveis: uma resposta aversiva leva embutida um forte componente afetivo, que por sua vez é notadamente associado à ativação das áreas descritas aqui (PVN e CeA), as quais possuem papel crucial na elaboração de respostas orgânicas e comportamentais direcionadas ao estímulo inicial, demonstrando uma possível interação entre o SI e o SNC com importância adaptativa durante um processo alérgico em vias aéreas.

Todas as respostas encontradas durante o desenvolvimento inicial desse trabalho sempre pareceram advindos da reação alérgica em questão. No experimento de marcação de Fos no SNC, apenas os animais previamente imunizados com OVA e que posteriormente receberam o antígeno por via intranasal (grupo I+O) apresentaram aumento de Fos no PVN e CeA. Como controles, foram incluídos: o grupo imunizado que recebeu solução salina (I+S), para que se testasse a hipótese de haver algum resíduo de ativação advinda da imunização com OVA em alum, e não necessariamente resultante do desafio; grupo não imunizado que recebeu OVA (NI+O) para avaliar o efeito da simples instilação intranasal de um peptídeo estranho sobre a ativação do SNC; e o grupo naïve, apenas retirado da caixa moradia antes do sacrifício, para estabelecermos possíveis efeitos das outras manipulações comuns a todos os grupos (imunização, habituação ao procedimento anestésico, anestesia antes do desafio etc.). Pelos resultados desse experimento, confirmamos nossas expectativas: a imunização e desafio são necessários para a ativação do SNC descrita. De forma semelhante, no experimento de esquia, apenas animais imunizados expressaram a aversão ao local associado a nebulização com OVA, apesar dos camundongos não imunizados também terem

sido submetidos a vários procedimentos novos, tal como a exposição à caixa claro-escuro, que poderia representar por si só um estímulo ansiogênico, e influenciar o resultado do teste de esquiva. Tais resultados em conjunto apontam para efeitos da reação alérgica em si, e não artefatos do delineamento experimental. É importante ressaltar que, por se tratarem de áreas cruciais na elaboração de quaisquer respostas adaptativas, em especial o estresse, o PVN e o CeA podem ser ativados mediante os mais diversos estímulos, dentre os quais aqueles necessários para a elaboração do modelo de asma murina: manipulação dos animais, exposição a novos ambientes, imunização, nebulizações, procedimento anestésico e vários outros. Dessa forma, o emprego de um grupo controle (ou mais de um em muitos casos) que incluísse tais estímulos foi essencial para que pudéssemos confiar em nossos resultados, eliminando artefatos de técnica.

Com o intuito de confirmar a importância da resposta imunológica sobre ambos os parâmetros analisados, e visando avançar na compreensão dos fenômenos responsáveis pela sinalização entre o SI e o SNC em nosso modelo, optamos pela indução de tolerância imunológica a OVA por ingestão prévia deste antígeno.

A tolerância imunológica é aceita hoje em dia como uma propriedade básica do sistema imunológico. O termo ‘tolerância’ foi proposto por Burnet e se referia à capacidade de dado organismo em aceitar (ou *tolerar*) a presença de moléculas (majoritariamente peptídeos) desconhecidas, que de acordo com suas próprias idéias, deveriam ser percebidas como estranhas (ou não-próprias), serem reconhecidas e desencadear uma resposta específica (BURNET, 1959). No entanto, o fenômeno da indução de tolerância havia sido descrito por Dakin muito antes de seu arcabouço conceitual: populações indígenas americanas tradicionalmente ingeriam folhas de urtiga como profilaxia da reação

urticariforme que poderia advir do contato com essa planta (DAKIN², 1829 apud VAZ, 1979, p. 1037). À época da descrição por Dakin deste fenômeno, experimentos sistematizados já estavam em andamento. Wells mostrou, em uma série de experimentos, que cobaios se tornavam refratários à indução de anafilaxia a, por exemplo, proteínas purificadas de ovos de galinha, se alimentados com elas antes de imunizados (WELLS³, 1911 apud FARIA; WEINER, 1999, p. 156). Recentemente a importância terapêutica da indução de tolerância imunológica têm sido amplamente descrita para doenças autoimunes (FARIA et al., 2003; WEINER et al., 1994) e alérgicas (CHUNG et al., 2002; COHN, 2001; HANSON et al., 1977; RUSSO et al., 2001). Originalmente os fenômenos responsáveis pela indução do estado de tolerância imunológica periférica eram mais associados à eliminação de clones específicos de células T responsáveis pelo reconhecimento de antígenos em particular (deleção clonal) ou pela indução de um estado não responsivo (anergia); modernamente, a tolerância imunológica têm sido atribuída à geração de processos ativos de regulação ou supressão, baseados na indução de células T com características especiais que regulam, por contato ou secreção de moléculas inibitórias, a evolução de respostas imunológicas (SOUSA MUCIDA et al., 2003). Na asma alérgica, a tolerância imunológica induzida por apresentação oral do antígeno é capaz de suprimir praticamente todos os parâmetros analisados laboratorialmente: AHR, produção de muco, IgE e IgG1 específicas para o antígeno administrado, infiltrado inflamatório marcante e predominantemente eosinofílico, e produção de citocinas Th2, medidas no lavado broncoalveolar (CHUNG et al., 2002; RUSSO et al., 2001). Assim, pareceu-nos relevante empregar a indução de um estado de tolerância periférica por ingestão de OVA anteriormente à imunização primária, com o intuito de avaliarmos a dependência dos

² DAKIN, R. Remarks on a cutaneous affection produced by certain poisonous vegetables. *Am. J. Med. Sci.*, v. 4, n. 8, 1829.

³ WELLS, H.G. Studies on the chemistry of anaphylaxis. III. Studies with isolated proteins, specially those of hen's egg. *J. Inf. Dis.*, v. 9, n. 147, 1911.

fenômenos observados (ativação do SNC e comportamento aversivo) na resposta alérgica pulmonar contra a OVA.

Os resultados do segundo experimento desse projeto demonstram que tanto a marcação de Fos no SNC, quanto a aversão dos camundongos ao compartimento escuro da caixa de esquiwa foram abolidas quando os animais foram antes submetidos à indução de tolerância oral à OVA. Enquanto animais imunizados (I+O) evitam a entrada no lado previamente associado a nebulização com OVA, aqueles tolerantes (T+O) se portam como os não imunizados (NI+O), e continuam visitando o compartimento escuro. Tal resultado reflete a ativação do PVN e do CeA nesses animais quando de seu primeiro contato com a OVA aerógena: apenas animais imunizados e não tolerantes apresentam intensa marcação de Fos nessas áreas quando desafiados com OVA intranasal. É importante notar que a tolerância foi eficaz na inibição da produção de anticorpos anti-OVA, corroborando sua ampla descrição na literatura. Ainda, à semelhança do observado por Russo et al. (2001) e outros, animais tolerantes não desenvolvem a reação inflamatória pulmonar característica da fase tardia da reação de hipersensibilidade imediata (Apêndice A). No tocante à ativação do SNC, ficava cada vez mais evidente que a fase imediata da reação alérgica estava implicada, visto que ocorre bem cedo após um único desafio antigênico em animais imunizados; apesar de outras possibilidades existirem, tais como produção de citocinas que pudessem ser responsáveis pela ativação do SNC, o tempo necessário para a ocorrência dessa resposta, assim como a ausência de inflamação pulmonar nesse momento (Apêndice A) não colaboram para sustentar tais idéias. Os resultados do experimento descrito não parecem discordantes de nossa hipótese inicial, pois a supressão da produção de IgE anti-OVA observada nos animais tolerantes é condizente com a inibição da desgranulação de mastócitos (dependente de IgE) característica da fase imediata das reações alérgicas. Como citado anteriormente, a íntima relação entre mastócitos e fibras nervosas poderia representar um sistema de transdução do

sinal proveniente da alergia pulmonar para o SNC, gerando a ativação observada lá, que condiz com a geração de uma resposta aversiva.

No entanto, como outros parâmetros da reação alérgica são também suprimidos pela tolerância oral (RUSSO et al., 2001) e o experimento de esquiva é realizado após vários desafios com OVA, ou seja, em um momento em que a inflamação alérgica pulmonar é evidente e importante para a fisiopatologia da doença, não podíamos afirmar de modo inequívoco, que a tolerância impedia o desenvolvimento da aversão pelo bloqueio da fase imediata da reação alérgica. Deste modo, a importância da fase tardia da reação alérgica, particularmente da influência de um processo inflamatório em curso, sobre a indução da aversão ao local do desafio não podia ainda ser totalmente descartada.

Com a finalidade de abordarmos a importância da inflamação alérgica pulmonar na geração da resposta de esquiva observada, utilizamos a linhagem C3H/HeJ de camundongos que, além de não responderem ao LPS por uma mutação no receptor TLR-4 (POLTORAK et al., 1998), não desenvolvem o processo inflamatório característico da fase tardia da alergia. Os parâmetros analisados relacionados à reação alérgica nesses animais estão, em sua maioria, diminuídos ou totalmente inibidos, na dependência das condições experimentais. Whitehead e colaboradores descreveram redução na produção de IL-5 e ausência de IL-4 e IL-13 no BAL de animais C3H/HeJ, bem como diminuição drástica do infiltrado inflamatório total ou diferencial de eosinófilos, quando comparados, por exemplo, a camundongos BALB/c (WHITEHEAD et al., 2003). De modo ainda mais marcante, camundongos C3H/HeJ imunizados e desafiados de acordo com um protocolo semelhante ao utilizado aqui, com múltiplos desafios por nebulização ou instilação intranasal de OVA, não apresentaram sinal de inflamação pulmonar, AHR ou espessamento da parede de vias aéreas após desafios seguidos com OVA instilada por via intranasal, apesar de apresentarem níveis de citocinas Th2 no BAL (IL-4, IL-5, IL-13) comparáveis àsquelas encontradas em animais BALB/c,

assim como de IgE anti-OVA (SHINAGAWA; KOJIMA, 2003). Curiosamente, tais animais apresentaram um discreto aumento de deposição pulmonar de colágeno nesse estudo.

As características da linhagem C3H/HeJ quanto à evolução de uma reação alérgica em vias aéreas, ou seja, níveis normais de IgE e ausência de inflamação pulmonar após o desafio antigênico, tornaram-na um modelo interessante para a avaliação da aversão condicionada a OVA. Porém, não haveria razão para testá-los no teste de esquiva se animais dessa linhagem não apresentassem, à semelhança dos camundongos BALB/c, ativação do PVN e CeA após desafio com OVA em animais imunizados. Assim, no terceiro experimento desse projeto, submetemos camundongos C3H/HeJ aos procedimentos descritos ao longo desse trabalho: avaliação de ativação do SNC por marcação de Fos, no PVN e no CeA, e teste de esquiva utilizando o alérgeno como estímulo aversivo. Além disso, avaliamos a produção de IgE e IgG1 nesses animais, para confirmar sua imunização, assim como a histopatologia dos pulmões de animais desafiados uma única vez (protocolo utilizado para marcação de Fos) ou diversas vezes (para o teste de esquiva). Animais da linhagem C3H/HeJ se comportaram, quanto à atividade do SNC e a aversão no teste de esquiva, à semelhança dos BALB/c: animais imunizados e desafiados apresentaram atividade aumentada no PVN e no CeA, e evitaram o compartimento associado com o antígeno, mesmo na ausência de inflamação pulmonar (Apêndice A). Assim, a reação inflamatória decorrente da fase tardia da alergia pulmonar não parece essencial para nenhuma dessas respostas. Tais achados confirmaram nossas expectativas acerca da importância da fase imediata da reação alérgica, baseada principalmente na desgranulação de mastócitos mediada por IgE. No entanto, apesar de termos eliminado a variável da inflamação pulmonar utilizando animais C3H/HeJ, ainda não poderíamos afirmar qual classe de imunoglobulinas é importante na sinalização para o SNC. Em camundongos, tanto a IgE quanto a IgG1 são anafiláticas, podendo tomar parte na hipersensibilidade imediata mediada por mastócitos nessa espécie (DOMBROWICZ et al.,

1997). Apesar da enorme predominância das descrições do papel realizado pela IgE e seu receptor FcεRI em mastócitos na fase imediata da hipersensibilidade do tipo I, receptores de baixa afinidade para IgG (FcγRII e III) também são encontrados nessa célula, e a IgG1 produzida durante uma resposta Th2 é considerada anafilática – ao menos fração dela, segundo Faquim-Mauro et al. (1999) – com capacidade de se acoplar ao alérgeno e induzir a desgranulação de mastócitos. Animais recipientes do sobrenadante de cultura de hibridomas produzindo IgE ou IgG1 anti-OVA ficaram igualmente sensibilizados para o desenvolvimento de uma reação de hipersensibilidade imediata cutânea a OVA e desenvolveram, após 2 outros desafios aerógenos, AHR (OSHIBA et al., 1996). Além da ação de IgG1 em mastócitos, outra via descrita como importante em alguns modelos de anafilaxia sistêmica depende da ação da IgG ligada ao antígeno em macrófagos (FcγRIII) liberando o fator de agregação plaquetária (PAF), levando a rápida queda em níveis de atividade geral e temperatura corpórea (STRAIT et al., 2002). Além do mais, Crosby e colaboradores observaram que animais não imunizados que receberam IgG anti-OVA purificada de camundongos 1 hora antes do desafio com OVA apresentam um episódio de broncoconstrição com pico em 15 minutos, mesmo na ausência de mastócitos (CROSBY et al., 2002). Como a imunização com OVA induz a produção de ambos os isotipos, e o protocolo de tolerância empregado no segundo experimento também os suprime (com ligeira tendência a favorecer a supressão de IgE, em nossas condições), não havíamos testado nenhuma situação em que apenas uma das classes estivesse presente. Essa condição foi propiciada pela utilização de um protocolo semelhante de indução de tolerância imunológica por ingestão de OVA, porém iniciado concomitantemente à imunização primária (dia 0).

Russo e colaboradores descreveram o padrão de resposta imunológica em camundongos recém-imunizados que começaram, em seguida, a consumir solução de OVA 1% em água potável (RUSSO et al., 2001). Nesses animais, em que a indução de tolerância

foi iniciada junto à imunização, a mesma supressão da asma descrita antes, avaliada por redução de inflamação eosinofílica pulmonar, níveis de citocinas Th2 no BAL e níveis de IgE anti-OVA circulantes foi observada, com apenas uma diferença: a produção de IgG1 não era afetada pela tolerância no dia 0, apresentando valores para este isotipo semelhantes àqueles vistos em animais imunizados. Desse modo, tal protocolo se prestava a esclarecer a importância dos anticorpos IgE ou IgG1 anti-OVA sobre a ativação do SNC e a aversão condicionada.

Resultados do quarto experimento desse estudo demonstraram que, em nossas condições, a tolerância iniciada no dia 0 reproduziu, ao menos em relação aos parâmetros estudados aqui, as observações de Russo e colaboradores. Animais tolerantes tinham níveis de IgE semelhantes àqueles de animais não imunizados, apesar de concentrações de IgG1 que não diferiram das encontradas em animais imunizados; assim, esse protocolo de indução de tolerância oral suprimiu particularmente a produção de IgE, sem efeito sobre a IgG1. Ainda, animais tolerantes não apresentaram inflamação pulmonar após vários desafios com OVA nebulizada, assim como o descrito (RUSSO et al., 2001). De modo interessante, animais submetidos a esse protocolo de tolerância oral no dia 0 se comportaram exatamente como aqueles submetidos à tolerância uma semana antes da imunização primária, ou seja, não apresentaram ativação do SNC após desafio com OVA nem evitaram o compartimento previamente associado com a nebulização do alérgeno. Como apenas a IgE anti-OVA foi suprimida, e os animais tolerantes apresentaram níveis comparáveis de IgG1 com aqueles encontrados no grupo imunizado, a IgG1 não parece ser suficiente para mediar a sinalização da reação alérgica para o SNC; a coincidência entre a supressão de IgE e a abolição de todas as respostas observadas anteriormente sugere um papel crucial desse isotipo na mediação dos parâmetros analisados nesse projeto.

Apesar de improvável em nosso modelo, deveríamos considerar uma outra possibilidade de sinalização descrita como importante em outros modelos de comunicação entre o SI e o SNC: a presença de altos níveis de citocinas circulantes. Baseando-se na ampla descrição da atividade de citocinas no SNC e sua importância na modulação de comportamentos, poderíamos supor que esses mediadores podem ter papel importante na sinalização de uma reação alérgica pulmonar ao SNC. Animais com reação inflamatória pulmonar possuem níveis consideráveis de IL-4, IL-5 e IL-13 tanto circulantes quanto no BAL. Apesar de o efeito dessas citocinas sobre a atividade do SNC não ser bem descrito, pode-se aceitar que atinjam de algum modo, direto ou indireto, o SNC e que possam mediar, à semelhança da IL-1, alterações importantes de atividade, com decorrências endócrinas e comportamentais. Tal fato poderia ser particularmente importante nos animais utilizados para o teste de esquia, visto que foram desafiados várias vezes e apresentam um importante infiltrado inflamatório pulmonar capaz de gerar níveis importantes de citocinas circulantes e no BAL. Porém, este não parece ser o caso em nosso modelo. A marcação de Fos no PVN e CeA é detectada tão cedo quanto 90 minutos após um único desafio com OVA inalada, momento em que não existe qualquer sinal de acúmulo de células inflamatórias no pulmão de animais imunizados e desafiados com o antígeno. Além disso, é estimado que o tempo para a produção da proteína Fos detectável imunologicamente por meio de uma reação imunoistoquímica seja entre 30 e 45 minutos (informação verbal⁴). Assim, a marcação positiva para Fos em neurônios reflete um estado ativado ocorrido entre 45 minutos e uma hora após o desafio com OVA. Portanto, parece-nos improvável que a resposta local a um único desafio possa gerar nesse curto intervalo quantidade suficiente de interleucinas para ativar o SNC via circulação sistêmica, pois não são descritos receptores para elas em neurônios periféricos. Somando-se a isso, não são encontrados estudos enfocando

⁴ Informação fornecida por Britto em São Paulo, em 2001

especificamente uma possível ação das citocinas Th2 citadas sobre o SNC (ao contrário do amplamente descrito para IL-1 e IL-6) bem como não são encontrados relatos na literatura de presença de seus receptores em nervos periféricos que pudesse justificar uma sinalização rápida dessas moléculas para o SNC.

Os resultados descritos até esse momento apontam para uma importante participação da fase imediata da alergia iniciada em vias aéreas sobre a ativação do SNC que ocorre após o desafio com OVA em animais imunizados, assim como na aversão condicionada observada posteriormente: 1) animais imunizados têm ativação e aversão; 2) ambos são inibidos pelo bloqueio da reação pela tolerância oral; 3) a inflamação pulmonar não parece envolvida, pois as respostas permanecem em animais C3H/HeJ e 4) o isotipo IgE parece ser o mediador dessas respostas, pois sua supressão as previne, independentemente da presença de IgG1.

Da maneira como os experimentos haviam sido encaminhados até aquele momento, a conexão entre o SI e o SNC no modelo murino de asma alérgica utilizado aqui parecia advir da interação entre os mastócitos e os terminais sensitivos livres, pois dependem de IgE e não dependem de IgG1 ou de inflamação. Assim, a desgranulação dos mastócitos presentes nas vias aéreas, mediada pela ligação de IgE anti-OVA em receptores de alta afinidade (FcεRI) localizados em sua membrana e pela reação cruzada entre eles, quando da reapresentação do alérgeno (OVA) por via aerógena, parecia uma hipótese palpável para explicar a ativação de núcleos do SNC que recebem inervação, direta ou indireta, de aferências vagais, notadamente envolvidas na sinalização de reações imunomediadas ocorrendo na periferia do SNC. Tal sinalização poderia, de acordo com a literatura aceita, estar envolvida na criação de uma resposta adaptativa visando à diminuição do risco de nova exposição ao alérgeno, representada em nossa abordagem pela criação da aversão condicionada ao local onde o antígeno foi apresentado. Para que tal resposta seja iniciada, assumimos que os mastócitos das vias aéreas de camundongos estão desgranulando frente ao desafio com OVA, em

animais imunizados, e que essa desgranulação, mediada por IgE e OVA, é importante para a ativação dos terminais nervosos intimamente associados aos mastócitos, responsáveis pela primeira transdução de sinal de uma longa via aferente.

Para testarmos essa hipótese, no quinto e último experimento desse estudo, utilizamos uma ferramenta farmacológica amplamente empregada na clínica humana em alergias acometendo as vias aéreas: o cromoglicato dissódico, um inibidor da desgranulação de mastócitos, que estabiliza sua membrana dificultando a liberação de grânulos dependente do influxo de cálcio. Como previsto, o bloqueio da desgranulação de mastócitos com cromoglicato inalado foi capaz de impedir o aumento de permeabilidade induzido pela OVA em vias aéreas de camundongos alérgicos. Somando-se a isso, o aumento de atividade do SNC e a indução de aversão ao local do desafio com OVA foram prevenidos pelo tratamento prévio com esse fármaco. Dada a relativa especificidade de ações descritas para o cromoglicato na literatura, assumimos que tal bloqueio se dê pela inibição de mastócitos sensibilizados com IgE anti-OVA nas vias aéreas.

A ausência de qualquer resposta (ativação no SNC ou aversão) em um animal imunizado e desafiado com OVA propiciada apenas pelo tratamento com um inibidor da desgranulação de mastócitos confirma um ponto levantado anteriormente: a participação da resposta inflamatória pulmonar, bem como das citocinas Th2 produzidas durante essa resposta, na ativação observada no SNC e na resposta aversiva elaborada contra a OVA, não parece relevante em nosso modelo experimental. Animais tratados com cromoglicato, apesar de terem todos os componentes da resposta alérgica pulmonar, incluindo anticorpos anafiláticos anti-OVA, inflamação peribroncovascular e, apesar de não quantificados aqui, citocinas Th2 no BAL, não apresentam ativação do PVN nem do CeA após desafio com OVA e também não desenvolvem aversão ao local de nebulização com o antígeno.

O cromoglicato dissódico é um fármaco considerado de baixa toxicidade, praticamente sem efeitos colaterais. Duas são as razões principais para tal afirmação: suas características moleculares não propiciam sua penetração através de barreiras biológicas, assim tendem a se distribuir ao longo do local de administração – por essa razão pode-se concentrar o tratamento no foco de interesse; apesar de interferir com um mecanismo básico de regulação celular, a disponibilidade de cálcio, essencial para a desgranulação dos mastócitos (SPATARO; BOSMANN, 1976), a atividade do cromoglicato parece ser restrita a mastócitos (e basófilos circulantes), selecionando dessa forma seu universo de ação (MAZUREK; BERGER; PECHT, 1980). A eficácia do tratamento com cromoglicato sobre a desgranulação de mastócitos foi discutida extensamente na literatura correlacionando-a com diferenças morfológicas entre subtipos dessas células. Admite-se que exista subpopulações (no mínimo duas) distintas de mastócitos, dentre os quais os mais estabelecidos são o de mucosa e o de serosa, com morfologia, localização e atividade diferentes. Além do mais, há muito se conhece o mastócito presente no SNC, com características distintas tanto dos de mucosa quanto dos de tecido conectivo. Na tentativa de se estabelecer populações baseadas em características funcionais, os mastócitos passaram a ser divididos de acordo com a principal protease por eles produzida: quimase ou triptase (WELLE, 1997). Mesmo essa classificação não se mostra perfeita, visto que alguns tipos deles produzem ambas em quantidade. Uma análise ainda mais minuciosa revela, apenas na população de mastócitos presentes em vias aéreas de ratos, 3 tipos de mastócitos com características histoquímicas diferentes, e com distribuição preferencial de cada tipo em um nível das vias aéreas (traquéia e brônquios diferem de bronquíolos e parênquima) (BACHELET; BERNAUDIN; FLEURY-FEITH, 1988). Para complicar ainda mais a classificação, a geração *in vitro* de mastócitos com características daqueles de mucosas a partir de outros do peritônio, ou seja, precursores de tecido conjuntivo, mostra que talvez as características dessas células dependam muito de

seu microambiente (KANAKURA et al., 1988). Muito provavelmente, tais diferenças se reflitam também em peculiaridades funcionais. Alguns grupos descrevem a ineficácia do tratamento com cromoglicato em mastócitos de mucosa, presentes, por exemplo, no trato gastrointestinal e no parênquima pulmonar. Por outro lado, essa molécula tem sido utilizada clinicamente em afecções do trato respiratório em humanos há décadas. Além do mais, vários grupos descreveram sua eficácia no controle da asma experimental, sustentando uma ação, ainda que menos potente, em mastócitos presentes nas vias aéreas. Talvez a variabilidade dos resultados encontrados por laboratórios diferentes seja advinda não só das razões óbvias (modelos e estímulos diferentes para desgranulação, dose de antígenos ou irritantes, tempo de evolução, entre vários outros), mas também da dificuldade de uma classificação exata das populações em questão para cada desenho experimental e ainda pelas alterações causadas não só no número dessas células em situações patológicas, como também em suas características, se levarmos em conta a possibilidade descrita acima para uma re-diferenciação dos mastócitos já existentes em outros, com particularidades morfofuncionais distintas. Em um modelo de anafilaxia intestinal em ratos, o tratamento com cromoglicato foi ineficiente na inibição de secreção de histamina induzida por OVA (PERDUE; GALL, 1985); de modo semelhante, a inibição de correntes locais *in vitro* no epitélio de traquéia de ratos imunizados e desafiados com OVA não foi modificada por esse fármaco (SESTINI et al., 1990). A pleurisia induzida por carragenina, por outro lado, foi prevenida por tratamento prévio com cromoglicato (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996) assim como a inflamação de vias aéreas em ratos induzida por solução salina hipertônica (YAMAWAKI et al., 1997). O aumento de permeabilidade vascular cutânea induzido por CRF é inibido totalmente com cromoglicato (THEOHARIDES et al., 1998). Utilizando um modelo de asma murina, Cieslewicz e colaboradores demonstraram que o tratamento prévio com cromoglicato aboliu totalmente a hiperreatividade transitória característica da fase imediata (5 a 30 minutos após o

desafio) da alergia pulmonar (CIESLEWICZ et al., 1999). No modelo utilizado por nós, o cromoglicato não só inibiu o aumento de permeabilidade característico da desgranulação de mastócitos durante a fase imediata da alergia, como impediu a ativação do SNC e o comportamento aversivo que se seguiria a ela.

A capacidade de adaptar-se às pressões ambientais é uma característica dos seres vivos e o desenvolvimento do sistema nervoso central representou um importante passo na integração de estímulos provenientes de diversos sistemas sensoriais. Evidências inequívocas das últimas décadas demonstram que o sistema imunológico trabalha em conjunto com o SNC em um nível de interações superior ao previsto até então, tornando o SI um órgão sensorial difuso (BLALOCK, 1984), capaz de perceber sinais que de outro modo teriam sido perdidos pelo SNC. Sabendo que estes sistemas, separadamente já complexos, se comunicam continuamente formando uma rede ainda mais elevada de interações (ELENKOV et al., 2000) é esperável que essa participe da modulação de uma ampla gama de processos orgânicos que requerem adaptações fisiológicas e comportamentais. O padrão de ativação no SNC descrito aqui é condizente com algumas dessas adaptações, e pode ser responsável por gerar o comportamento aversivo observado. Isso representa uma seleção de um contexto ambiental mais seguro baseando-se na detecção de um antígeno aerógeno, tornando então essa discriminação ambiental uma resposta adaptativa direcionada ao alérgeno.

7 CONCLUSÕES

A reação alérgica iniciada em vias aéreas leva à ativação de áreas do SNC relacionadas à elaboração de respostas adaptativas, com conteúdo emocional.

Animais alérgicos apresentam aversão ao local onde tiveram contato com o antígeno aerógeno, uma resposta adaptativa direcionada para a diminuição de contato com o mesmo.

A atividade no SNC e o comportamento que se seguem ao desafio alérgico dependem da presença de anticorpos específicos da classe IgE.

A resposta inflamatória pulmonar não é necessária para ativar as áreas do SNC estudadas, nem para induzir a aversão ao local de contato com o alérgeno.

A desgranulação de mastócitos é crucial para a sinalização da alergia em vias aéreas para o SNC, e, conseqüentemente, para a geração da resposta comportamental associada.

A ativação do SNC durante a ocorrência de uma reação alérgica disparada por antígenos inalados é mediada por mastócitos presentes nas vias aéreas, que desgranulam na presença de antígenos ligados a moléculas de IgE específicas. Essa ativação está ligada à elaboração de respostas adaptativas, culminando em nosso estudo com a expressão de uma resposta direcionada ao estímulo presente no ambiente. Portanto, empregando um modelo murino de asma evidenciamos a importância da comunicação neuroimunoendócrina na elaboração de respostas adaptativas durante uma reação alérgica iniciada em vias aéreas.

REFERÊNCIAS

ABEHSIRA-AMAR, O.; GIBERT, M.; JOLIVY, M.; THEZE, J.; JANKOVIC, D. L. IL-4 plays a dominant role in the differential development of Th0 into Th1 and Th2 cells. **J. Immunol.**, v. 148, n. 12, p. 3820-3829, 1992.

ADER, R.; COHEN, N. Behaviorally conditioned immunosuppression. **Psychosom. Med.**, v. 37, n. 4, p. 333-340, 1975.

ADER, R.; COHEN, N. Behaviorally conditioned immunosuppression and murine systemic lupus erythematosus. **Science**, v. 215, n. 4539, p. 1534-1536, 1982.

ADER, R.; GROTA, L. J.; COHEN, N. Conditioning phenomena and immune function. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 496, p. 532-544, 1987.

ALVAREZ-BORDA, B.; RAMIREZ-AMAYA, V.; PEREZ-MONTFORT, R.; BERMUDEZ-RATTONI, F. Enhancement of antibody production by a learning paradigm. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 64, n. 2, p. 103-105, 1995.

ANISMAN, H.; MERALI, Z. Anhedonic and anxiogenic effects of cytokine exposure. In: DANTZER, R., WOLLMAN, E.E. (Ed.). **Cytokines, stress and depression.**, New York: Kluwer Academic, 1999. p. 199-233.

ARNSTEN, A. T.; SEGAL, D. S. Naloxone alters locomotion and interaction with environmental stimuli. **Life Sci.**, v. 25, n. 12, p. 1035-1042, 1979.

AUBERT, A. Sickness and behaviour in animals: a motivational perspective. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 23, n. 7, p. 1029-1036, 1999.

AUBERT, A.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Differential effect of lipopolysaccharide on food hoarding behavior and food consumption in rats. **Brain. Behav. Immun.**, v. 11, n. 3, p. 229-238, 1997.

BACHELET, C. M.; BERNAUDIN, J. F.; FLEURY-FEITH, J. Distribution and histochemical characterization of pulmonary mast cells in the rat and guinea pig. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 87, n. 3, p. 225-229, 1988.

BARTROP, R. W.; LUCKHURST, E.; LAZARUS, L.; KILOH, L. G.; PENNY, R. Depressed lymphocyte function after bereavement. **Lancet**, v. 1, n. 8016, p. 834-836, 1977.

BASSO, A. S.; PINTO, F. A.; RUSSO, M.; BRITTO, L. R.; DE SA-ROCHA, L. C.; PALERMO NETO, J. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **J. Neuroimmunol.**, v. 140, n. 1-2, p. 69-77, 2003.

BELVISI, M. G.; WARD, J. K.; MITCHELL, J. A.; BARNES, P. J. Nitric oxide as a neurotransmitter in human airways. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 329, n. 1, p. 97-110, 1995.

BERKENBOSCH, F.; VAN OERS, J.; DEL REY, A.; TILDERS, F.; BESEDOVSKY, H. Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. **Science**, v. 238, n. 4826, p. 524-526, 1987.

BERRIDGE, C. W.; DUNN, A. J. A corticotropin-releasing factor antagonist reverses the stress-induced changes in exploratory behavior in mice. **Horm. Behav.**, v. 21, p. 393-401, 1987.

BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; DA PRADA, M.; BURRI, R.; HONEGGER, C. The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons. **Science**, v. 221, n. 4610, p. 564-566, 1983.

BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; DINARELLO, C. A. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. **Science**, v. 233, n. 4764, p. 652-654, 1986.

BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E.; FELIX, D.; HAAS, H. Hypothalamic changes during the immune response. **Eur. J. Immunol.**, v. 7, n. 5, p. 323-325, 1977.

BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E.; KELLER, M.; MULLER, J. Changes in blood hormone levels during the immune response. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 150, n. 2, p. 466-470, 1975.

BIENENSTOCK, J.; PERDUE, M.; BLENNERHASSETT, M.; STEAD, R.; KAKUTA, N.; SESTINI, P.; VANCHERI, C.; MARSHALL, J. Inflammatory cells and the epithelium. Mast cell/nerve interactions in the lung in vitro and in vivo. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 138, n. 6, p. S31-34, 1988.

BLALOCK, J. E. The immune system as a sensory organ. **J. Immunol.**, v. 132, n. 3, p. 1067-1070, 1984.

BLALOCK, J. E. The syntax of immune-neuroendocrine communication. **Immunol. Today**, v. 15, n. 11, p. 504-511, 1994.

- BLALOCK, J. E.; HARBOUR-MCMENAMIN, D.; SMITH, E. M. Peptide hormones shared by the neuroendocrine and immunologic systems. **J. Immunol.**, v. 135, n. 2 Supplement, p. 858s-861s, 1985.
- BLUTHE, R. M.; DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Effects of interleukin-1 receptor antagonist on the behavioral effects of lipopolysaccharide in rat. **Brain Res.**, v. 573, n. 2, p. 318-320, 1992.
- BOURIN, M.; HASCOET, M. The mouse light/dark box test. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 463, n. 1-3, p. 55-65, 2003.
- BRET-DIBAT, J. L.; BLUTHE, R. M.; KENT, S.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Lipopolysaccharide and interleukin-1 depress food-motivated behavior in mice by a vagal-mediated mechanism. **Brain Behav. Immun.**, v. 9, n. 3, p. 242-246, 1995.
- BRUSSELLE, G. G.; KIPS, J. C.; TAVERNIER, J. H.; VAN DER HEYDEN, J. G.; CUVELIER, C. A.; PAUWELS, R. A.; BLUETHMANN, H. Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. **Clin. Exp. Allergy**, v. 24, n. 1, p. 73-80, 1994.
- BURNET, M. **The clonal selection theory of acquired immunity**. Nashville: Vanderbilt University Press, 1959. 208 p.
- CABANAC, M. Physiological role of pleasure. **Science**, v. 173, n. 2, p. 1103-1107, 1971.
- CAO, C.; MATSUMURA, K.; WATANABE, Y. Induction of cyclooxygenase-2 in the brain by cytokines. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 813, p. 307-309, 1997.
- CARA, D. C.; CONDE, A. A.; VAZ, N. M. Immunological induction of flavor aversion in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, n. 6, p. 1331-1341, 1994.
- CARLSON, S. L.; FELTEN, D. L.; LIVNAT, S.; FELTEN, S. Y. Alterations of monoamines in specific central autonomic nuclei following immunization in mice. **Brain. Behav. Immun.**, v. 1, n. 1, p. 52-63, 1987.
- CHUNG, Y.; CHO, J.; CHANG, Y. S.; CHO, S. H.; KANG, C. Y. Preventive and therapeutic effects of oral tolerance in a murine model of asthma. **Immunobiology**, v. 206, n. 4, p. 408-423, 2002.
- CIESLEWICZ, G.; TOMKINSON, A.; ADLER, A.; DUEZ, C.; SCHWARZE, J.; TAKEDA, K.; LARSON, K. A.; LEE, J. J.; IRVIN, C. G.; GELFAND, E. W. The late, but not early, asthmatic response is dependent on IL-5 and correlates with eosinophil infiltration. **J. Clin. Invest.**, v. 104, n. 3, p. 301-308, 1999.

COHEN, N. Biological relevance of data variability. **Brain. Behav. Immun.**, v. 18, n. 6, p. 495-496, 2004.

COHN, D. W. H. **Efeitos da administração de lipopolissacarídeo (LPS) de Escherichia coli sobre o comportamento de camundongos dominantes e submissos: uma abordagem etofarmacológica ao estudo do comportamento doentio.** 2003. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

COHN, L. Food for thought: can immunological tolerance be induced to treat asthma? **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 24, n. 5, p. 509-512, 2001.

COHN, L.; HOMER, R. J.; MACLEOD, H.; MOHRS, M.; BROMBACHER, F.; BOTTOMLY, K. Th2-induced airway mucus production is dependent on IL-4R α , but not on eosinophils. **J. Immunol.**, v. 162, n. 10, p. 6178-6183, 1999.

COHN, L.; HOMER, R. J.; MARINOV, A.; RANKIN, J.; BOTTOMLY, K. Induction of airway mucus production By T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. **J. Exp. Med.**, v. 186, n. 10, p. 1737-1747, 1997.

COOK, C. J. Stress induces CRF release in the paraventricular nucleus, and both CRF and GABA release in the amygdala. **Physiol. Behav.**, v. 82, n. 4, p. 751-762, 2004.

CORRY, D. B.; FOLKESSON, H. G.; WARNOCK, M. L.; ERLE, D. J.; MATTHAY, M. A.; WIENER-KRONISH, J. P.; LOCKSLEY, R. M. Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. **J. Exp. Med.**, v. 183, n. 1, p. 109-117, 1996.

CROSBY, J. R.; CIESLEWICZ, G.; BORCHERS, M.; HINES, E.; CARRIGAN, P.; LEE, J. J.; LEE, N. A. Early phase bronchoconstriction in the mouse requires allergen-specific IgG. **J. Immunol.**, v. 168, n. 8, p. 4050-4054, 2002.

CUTRONEO, K. R. Gene therapy for tissue regeneration. **J. Cell. Biochem.**, v. 88, n. 2, p. 418-425, 2003.

DAHLEN, I.; JANSON, C. Anxiety and depression are related to the outcome of emergency treatment in patients with obstructive pulmonary disease. **Chest**, v. 122, n. 5, p. 1633-1637, 2002.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? **Brain. Behav. Immun.**, v. 15, n. 1, p. 7-24, 2001.

DE MONCHY, J. G.; KAUFFMAN, H. F.; VENGE, P.; KOETER, G. H.; JANSEN, H. M.; SLUITER, H. J.; DE VRIES, K. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 131, n. 3, p. 373-376, 1985.

DENT, L. A.; STRATH, M.; MELLOR, A. L.; SANDERSON, C. J. Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. **J. Exp. Med.**, v. 172, n. 5, p. 1425-1431, 1990.

DOMBROWICZ, D.; FLAMAND, V.; MIYAJIMA, I.; RAVETCH, J. V.; GALLI, S. J.; KINET, J. P. Absence of Fc epsilonRI alpha chain results in upregulation of Fc gammaRIII-dependent mast cell degranulation and anaphylaxis. Evidence of competition between Fc epsilonRI and Fc gammaRIII for limiting amounts of FcR beta and gamma chains. **J. Clin. Invest.**, v. 99, n. 5, p. 915-925, 1997.

DRAGUNOW, M.; FAULL, R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. **J. Neurosci. Methods**, v. 29, n. 3, p. 261-265, 1989.

DUNN, A. J. Interactions between the nervous system and the immune system. In: BLOOM, F.E., KUPFER, D.J. (Ed.). **Psychopharmacology: The fourth generation of progress.**, New York: Raven Press, 1995. p. 719-731

DUNN, A. J. Mechanisms by which cytokines signal the brain. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 52, n., p. 43-65, 2002.

DUNN, A. J.; BERRIDGE, C. W. Corticotropin-releasing factor administration elicits a stress-like activation of cerebral catecholaminergic systems. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 27, p. 685-691, 1987.

DUNN, A. J.; BERRIDGE, C. W. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? **Brain Res. Brain Res. Rev.**, v. 15, n. 2, p. 71-100, 1990.

DUNN, A. J.; FILE, S. E. Corticotropin-releasing factor has an anxiogenic action on the social interaction test. **Horm. Behav.**, v. 21, p. 193-202, 1987.

DUNN, A. J.; SWIERGIEL, A. H. Behavioral responses to stress are intact in CRF-deficient mice. **Brain Res.**, v. 845, n. 1, p. 14-20, 1999.

EGAN, R. W.; ATHWAHL, D.; CHOU, C. C.; EMTAGE, S.; JEHN, C. H.; KUNG, T. T.; MAUSER, P. J.; MURGOLO, N. J.; BODMER, M. W. Inhibition of pulmonary eosinophilia and hyperreactivity by antibodies to interleukin-5. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 107, n. 1-3, p. 321-322, 1995.

- EK, M.; ARIAS, C.; SAWCHENKO, P.; ERICSSON-DAHLSTRAND, A. Distribution of the EP3 prostaglandin E(2) receptor subtype in the rat brain: relationship to sites of interleukin-1-induced cellular responsiveness. **J. Comp. Neurol.**, v. 428, n. 1, p. 5-20, 2000.
- EK, M.; KUROSAWA, M.; LUNDEBERG, T.; ERICSSON, A. Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1beta: role of endogenous prostaglandins. **J. Neurosci.**, v. 18, n. 22, p. 9471-9479, 1998.
- ELENKOV, I. J.; WILDER, R. L.; CHROUSOS, G. P.; VIZI, E. S. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, n. 4, p. 595-638, 2000.
- ELIAS, J. A.; ZHU, Z.; CHUPP, G.; HOMER, R. J. Airway remodeling in asthma. **J. Clin. Invest.**, v. 104, n. 8, p. 1001-1006, 1999.
- ELMQUIST, J. K.; ACKERMANN, M. R.; REGISTER, K. B.; RIMLER, R. B.; ROSS, L. R.; JACOBSON, C. D. Induction of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following *Pasteurella multocida* endotoxin administration. **Endocrinology**, v. 133, n. 6, p. 3054-3057, 1993.
- FAQUIM-MAURO, E. L.; COFFMAN, R. L.; ABRAHAMSOHN, I. A.; MACEDO, M. S. Cutting edge: mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL-4 and IL-12. **J. Immunol.**, v. 163, n. 7, p. 3572-3576, 1999.
- FARIA, A. M.; MARON, R.; FICKER, S. M.; SLAVIN, A. J.; SPAHN, T.; WEINER, H. L. Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor-beta/interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Autoimmun.**, v. 20, n. 2, p. 135-145, 2003.
- FARIA, A. M.; WEINER, H. L. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. **Adv. Immunol.**, v. 73, p. 153-264, 1999.
- FELDMAN, J. L.; MCCRIMMON, D. R. Neural control of breathing. In: ZIGMOND, M.J., BLOOM, F.E., LANDIS, S.C., ROBERTS, J.L., SQUIRE, L.R. (Ed.). **Fundamental neuroscience**, San Diego: Academic Press, 1999. v.1, p. 1600.
- FELTEN, D. L.; FELTEN, S. Y.; CARLSON, S. L.; OLSCHOWKA, J. A.; LIVNAT, S. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. **J. Immunol.**, v. 135, n. 2 Supplement, p. 755s-765s, 1985.
- FINKELMAN, F. D.; KATONA, I. M.; URBAN JR., J. F.; HOLMES, J.; OHARA, J.; TUNG, A. S.; SAMPLE, J. V.; PAUL, W. E. IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. **J. Immunol.**, v. 141, n. 7, p. 2335-2341, 1988.

- FLESHNER, M.; GOEHLER, L. E.; HERMANN, J.; RELTON, J. K.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Interleukin-1 beta induced corticosterone elevation and hypothalamic NE depletion is vagally mediated. **Brain Res. Bull.**, v. 37, n. 6, p. 605-610, 1995.
- FORSYTHE, P.; EBELING, C.; GORDON, J. R.; BEFUS, A. D.; VLIAGOFTIS, H. Opposing effects of short- and long-term stress on airway inflammation. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 169, n. 2, p. 220-226, 2004.
- FOSTER, P. S.; HOGAN, S. P.; RAMSAY, A. J.; MATTHAEI, K. I.; YOUNG, I. G. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. **J. Exp. Med.**, v. 183, n. 1, p. 195-201, 1996.
- FRANKLIN, K.; PAXINOS, G. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. San Diego: Academic Press, 1996. 208 p.
- FRITZ, G. K.; OVERHOLSER, J. C. Patterns of response to childhood asthma. **Psychosom. Med.**, v. 51, n. 3, p. 347-355, 1989.
- GALLI, S. J. Complexity and redundancy in the pathogenesis of asthma: reassessing the roles of mast cells and T cells. **J. Exp. Med.**, v. 186, n. 3, p. 343-347, 1997.
- GARCIA, J.; LASITER, P. S.; BERMUDEZ-RATTONI, F.; DEEMS, D. A. A general theory of aversion learning. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 443, p. 8-21, 1985.
- GLEICH, G. J.; KITA, H. Bronchial asthma: lessons from murine models. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 94, n. 6, p. 2101-2102, 1997.
- GOEHLER, L. E.; GAYKEMA, R. P.; NGUYEN, K. T.; LEE, J. E.; TILDERS, F. J.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Interleukin-1beta in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? **J. Neurosci.**, v. 19, n. 7, p. 2799-2806, 1999.
- GRAY, T. S. Amygdaloid CRF pathways. Role in autonomic, neuroendocrine, and behavioral responses to stress. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 697, p. 53-60, 1993.
- GROTA, L. J.; ADER, R.; MOYNIHAN, J. A.; COHEN, N. Voluntary consumption of cyclophosphamide by nondeprived Mrl-lpr/lpr and Mrl +/+ mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 37, n. 3, p. 527-530, 1990.
- HABIB, K. E.; WELD, K. P.; RICE, K. C.; PUSHKAS, J.; CHAMPOUX, M.; LISTWAK, S.; WEBSTER, E. L.; ATKINSON, A. J.; SCHULKIN, J.; CONTOREGGI, C.; CHROUSOS, G. P.; MCCANN, S. M.; SUOMI, S. J.; HIGLEY, J. D.; GOLD, P. W. Oral

administration of a corticotropin-releasing hormone receptor antagonist significantly attenuates behavioral, neuroendocrine, and autonomic responses to stress in primates. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 97, n. 11, p. 6079-6084, 2000.

HANSON, D. G.; VAZ, N. M.; MAIA, L. C.; HORNBROOK, M. M.; LYNCH, J. M.; ROY, C. A. Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 55, n. 1-6, p. 526-532, 1977.

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 12, n. 2, p. 123-137, 1988.

HEINE, H.; FORSTER, F. J. Relationships between mast cells and preterminal nerve fibers. **Z. Mikrosk. Anat. Forsch.**, v. 89, n. 5, p. 934-937, 1975.

HOLGATE, S. T. The epidemic of asthma and allergy. **J. R. Soc. Med.**, v. 97, n. 3, p. 103-110, 2004.

HONKANIEMI, J.; KAINU, T.; CECCATELLI, S.; RECHARDT, L.; HOKFELT, T.; PELTO-HUIKKO, M. Fos and jun in rat central amygdaloid nucleus and paraventricular nucleus after stress. **Neuroreport**, v. 3, n. 10, p. 849-852, 1992.

HOSOI, T.; OKUMA, Y.; NOMURA, Y. Electrical stimulation of afferent vagus nerve induces IL-1 β expression in the brain and activates HPA axis. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 279, n. 1, p. R141-147, 2000.

ISENBERG, S. A.; LEHRER, P. M.; HOCHRON, S. The effects of suggestion and emotional arousal on pulmonary function in asthma: a review and a hypothesis regarding vagal mediation. **Psychosom. Med.**, v. 54, n. 2, p. 192-216, 1992.

ITO, S. Multiple projection of vagal non-myelinated afferents to the anterior insular cortex in rats. **Neurosci. Lett.**, v. 148, n. 1-2, p. 151-154, 1992.

IVERSEN, S.; KUPFERMANN, I.; KANDEL, E. R. Emotional states and feelings. In: KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H., JESSEL, T.M. (Ed.). **Principles of neural science**, New York: McGraw-Hill, 2000. p. 982-997

IZUHARA, K.; SHIRAKAWA, T. Signal transduction via the interleukin-4 receptor and its correlation with atopy. **Int. J. Mol. Med.**, v. 3, n. 1, p. 3-10, 1999.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Immunobiology**: the immune system in health and disease. New York: Garland Publishing, 1999. 635 p.

JANSON, C.; BJORNSSON, E.; HETTA, J.; BOMAN, G. Anxiety and depression in relation to respiratory symptoms and asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.**, v. 149, n. 4, p. 930-934, 1994.

JOACHIM, R. A.; QUARCOO, D.; ARCK, P. C.; HERZ, U.; RENZ, H.; KLAPP, B. F. Stress enhances airway reactivity and airway inflammation in an animal model of allergic bronchial asthma. **Psychosom. Med.**, v. 65, n. 5, p. 811-815, 2003.

JOOS, G. F. Bronchial hyperresponsiveness: too complex to be useful? **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 3, n. 3, p. 233-238, 2003.

JOOS, G. F.; GERMONPRE, P. R.; PAUWELS, R. A. Neural mechanisms in asthma. **Clin. Exp. Allergy**, v. 30 Supplement 1, p. 60-65, 2000.

JOVANOVA-NESIC, K.; NIKOLIC, V.; JANKOVIC, B. D. Locus ceruleus and immunity. II. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis and hypersensitivity skin reactions in rats with lesioned locus ceruleus. **Int. J. Neurosci.**, v. 68, n. 3-4, p. 289-294, 1993.

KANAKURA, Y.; THOMPSON, H.; NAKANO, T.; YAMAMURA, T.; ASAI, H.; KITAMURA, Y.; METCALFE, D. D.; GALLI, S. J. Multiple bidirectional alterations of phenotype and changes in proliferative potential during the in vitro and in vivo passage of clonal mast cell populations derived from mouse peritoneal mast cells. **Blood**, v. 72, n. 3, p. 877-885, 1988.

KENT, S.; BLUTHE, R. M.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Sickness behavior as a new target for drug development. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 13, n. 1, p. 24-28, 1992.

KIERNAN, J. A. Degranulation of mast cells in the trachea and bronchi of the rat following stimulation of the vagus nerve. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 91, n. 4, p. 398-402, 1990.

KLUGER, M. J.; RINGLER, D. H.; ANVER, M. R. Fever and survival. **Science**, v. 188, n. 4184, p. 166-168, 1975.

KOBZIK, L. The lung. In: COTRAN, R.S., KUMAR, V., COLLINS, T. (Ed.). **Robbins pathologic basis of disease**, Philadelphia: W.B.Saunders, 1999. p. 1425

KONSMAN, J. P.; KELLEY, K.; DANTZER, R. Temporal and spatial relationships between lipopolysaccharide-induced expression of Fos, interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in rat brain. **Neuroscience**, v. 89, n. 2, p. 535-548, 1999.

KONSMAN, J. P.; PARNET, P.; DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. **Trends Neurosci.**, v. 25, n. 3, p. 154-159, 2002.

KONSMAN, J. P.; TRIDON, V.; DANTZER, R. Diffusion and action of intracerebroventricularly injected interleukin-1 in the CNS. **Neuroscience**, v. 101, n. 4, p. 957-967, 2000.

KOOB, G. F. Corticotropin-releasing factor, norepinephrine, and stress. **Biol. Psychiatry**, v. 46, n. 9, p. 1167-1180, 1999.

KOPF, M.; LE GROS, G.; BACHMANN, M.; LAMERS, M. C.; BLUETHMANN, H.; KOHLER, G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. **Nature**, v. 362, n. 6417, p. 245-248, 1993.

KRAHN, D. D.; GOSNELL, B. A.; GRACE, M.; LEVINE, A. S. CRF antagonist partially reverses CRF- and stress-induced effects on feeding. **Brain Res. Bull.**, v. 17, p. 285-289, 1986.

KRUSHEL, L. A.; VAN DER KOOY, D. Visceral cortex: integration of the mucosal senses with limbic information in the rat agranular insular cortex. **J. Comp. Neurol.**, v. 270, n. 1, p. 39-54, 1988.

LAMPINEN, M.; CARLSON, M.; HAKANSSON, L. D.; VENGE, P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. **Allergy**, v. 59, n. 8, p. 793-805, 2004.

LAMPRECHT, R.; DUDAI, Y. Differential modulation of brain immediate early genes by intraperitoneal LiCl. **Neuroreport**, v. 7, n. 1, p. 289-293, 1995.

LAMPRECHT, R.; DUDAI, Y. Transient expression of c-Fos in rat amygdala during training is required for encoding conditioned taste aversion memory. **Learn. Mem.**, v. 3, n. 1, p. 31-41, 1996.

LARSON, S. J.; DUNN, A. J. Behavioral effects of cytokines. **Brain. Behav. Immun.**, v. 15, n. 4, p. 371-387, 2001.

LARSON, S. J.; ROMANOFF, R. L.; DUNN, A. J.; GLOWA, J. R. Effects of interleukin-1beta on food-maintained behavior in the mouse. **Brain. Behav. Immun.**, v. 16, n. 4, p. 398-410, 2002.

LAWRENCE, D. A. Psychologic stress and asthma: neuropeptide involvement. **Environ. Health Perspect.**, v. 110, n. 5, p. A230-231, 2002.

- LEE, J. J.; MCGARRY, M. P.; FARMER, S. C.; DENZLER, K. L.; LARSON, K. A.; CARRIGAN, P. E.; BRENNEISE, I. E.; HORTON, M. A.; HACZKU, A.; GELFAND, E. W.; LEIKAUF, G. D.; LEE, N. A. Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma. **J. Exp. Med.**, v. 185, n. 12, p. 2143-2156, 1997.
- LEFF, A. R.; STIMLER, N. P.; MUNOZ, N. M.; SHIOYA, T.; TALLET, J.; DAME, C. Augmentation of respiratory mast cell secretion of histamine caused by vagus nerve stimulation during antigen challenge. **J. Immunol.**, v. 136, n. 3, p. 1066-1073, 1986.
- LEHRER, P. M.; ISENBERG, S.; HOCHRON, S. M. Asthma and emotion: a review. **J. Asthma**, v. 30, n. 1, p. 5-21, 1993.
- LEON, A.; BURIANI, A.; DAL TOSO, R.; FABRIS, M.; ROMANELLO, S.; ALOE, L.; LEVI-MONTALCINI, R. Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 91, n. 9, p. 3739-3743, 1994.
- LEVI-MONTALCINI, R. Effects of mouse tumor transplantation on the nervous system. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 55, n. 2, p. 330-344, 1952.
- LILLY, C. M.; NAKAMURA, H.; KESSELMAN, H.; NAGLER-ANDERSON, C.; ASANO, K.; GARCIA-ZEPEDA, E. A.; ROTHENBERG, M. E.; DRAZEN, J. M.; LUSTER, A. D. Expression of eotaxin by human lung epithelial cells: induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids. **J. Clin. Invest.**, v. 99, n. 7, p. 1767-1773, 1997.
- LIU, L. Y.; COE, C. L.; SWENSON, C. A.; KELLY, E. A.; KITA, H.; BUSSE, W. W. School examinations enhance airway inflammation to antigen challenge. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 165, n. 8, p. 1062-1067, 2002.
- LUNDBERG, J. M.; SARIA, A. Capsaicin-induced desensitization of airway mucosa to cigarette smoke, mechanical and chemical irritants. **Nature**, v. 302, n. 5905, p. 251-253, 1983.
- LUNDGREN, J. D.; SHELHAMER, J. H. Pathogenesis of airway mucus hypersecretion. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 85, n. 2, p. 399-417, 1990.
- MACKENZIE, J. N. The production of the so-called "rose effect" by means of an artificial rose, with remarks and historical notes. **Am. J. Med. Sci.**, v. 91, p. 45-57, 1886.
- MACQUEEN, G.; MARSHALL, J.; PERDUE, M.; SIEGEL, S.; BIENENSTOCK, J. Pavlovian conditioning of rat mucosal mast cells to secrete rat mast cell protease II. **Science**, v. 243, n. 4887, p. 83-85, 1989.

MADDEN, K. S.; BOEHM, G. W.; LEE, S. C.; GROTA, L. J.; COHEN, N.; ADER, R. One-trial conditioning of the antibody response to hen egg lysozyme in rats. **J. Neuroimmunol.**, v. 113, n. 2, p. 236-239, 2001.

MADDEN, K. S.; SANDERS, V. M.; FELTEN, D. L. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 35, p. 417-448, 1995.

MADDOX, L.; SCHWARTZ, D. A. The pathophysiology of asthma. **Annu. Rev. Med.**, v. 53, p. 477-498, 2002.

MAESTRONI, G. Immunology needs the mind. **Nat. Immunol.**, v. 5, n. 8, p. 763, 2004.

MATTHEWS, A. N.; FRIEND, D. S.; ZIMMERMANN, N.; SARAFI, M. N.; LUSTER, A. D.; PEARLMAN, E.; WERT, S. E.; ROTHENBERG, M. E. Eotaxin is required for the baseline level of tissue eosinophils. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 95, n. 11, p. 6273-6278, 1998.

MATTHEWS, D. J.; CALLARD, R. E. Interleukin-13. In: Thorpe, R. (Ed.). **Cytokines**, San Diego: Academic Press, 1988. p. 205-215

MAYR, S. I.; ZUBERI, R. I.; LIU, F. T. Role of immunoglobulin E and mast cells in murine models of asthma. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, n. 7, p. 821-827, 2003.

MAYR, S. I.; ZUBERI, R. I.; ZHANG, M.; DE SOUSA-HITZLER, J.; NGO, K.; KUWABARA, Y.; YU, L.; FUNG-LEUNG, W. P.; LIU, F. T. IgE-dependent mast cell activation potentiates airway responses in murine asthma models. **J. Immunol.**, v. 169, n. 4, p. 2061-2068, 2002.

MAZUREK, N.; BERGER, G.; PECHT, I. A binding site on mast cells and basophils for the anti-allergic drug cromolyn. **Nature**, v. 286, n. 5774, p. 722-723, 1980.

MCCARTHY, D. O.; KLUGER, M. J.; VANDER, A. J. Suppression of food intake during infections: Is interleukin-1 involved? **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 42, p. 1179-1182, 1985.

MCCARTHY, D. O.; KLUGER, M. J.; VANDER, A. J. The role of fever in appetite suppression after endotoxin administration. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 40, p. 310-316, 1984.

MCDONALD, D. M. Neurogenic inflammation in the respiratory tract: actions of sensory nerve mediators on blood vessels and epithelium of the airway mucosa. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 136, p. 65-72, 1987.

MENZAGHI, F.; HEINRICHS, S. C.; PICH, E. M.; WEISS, F.; KOOB, G. F. The role of limbic and hypothalamic corticotropin-releasing factor in behavioral responses to stress. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 697, p. 142-154, 1993.

MILLER, N. E. Some psychophysiological studies of motivation and of the behavioral effects of illness. **Bull. Br. Psych. Soc.**, v. 17, p. 1-20, 1964.

MINSHALL, E. M.; LEUNG, D. Y.; MARTIN, R. J.; SONG, Y. L.; CAMERON, L.; ERNST, P.; HAMID, Q. Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 17, n. 3, p. 326-333, 1997.

MORGULIS, M. S.; STANKEVICIUS, D.; SA-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a sick cage mate: consequences on behavior and on ehrlich tumor growth. **Neuroimmunomodulation**, v. 11, n. 1, p. 49-57, 2004.

MORLEY, J. E.; LEVINE, A. S. Corticotropin-releasing factor, grooming and ingestive behavior. **Life Sci.**, v. 31, p. 1459-1464, 1982.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 145-173, 1989.

MUNCK, A.; GUYRE, P. M.; HOLBROOK, N. J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. **Endocr. Rev.**, v. 5, n. 1, p. 25-44, 1984.

MURRAY, M. J.; MURRAY, A. B. Anorexia of infection as a mechanism of host defense. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 32, n. 3, p. 593-596, 1979.

NAGAI, H.; YAMAGUCHI, S.; TANAKA, H. The role of interleukin-5 (IL-5) in allergic airway hyperresponsiveness in mice. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 796, p. 91-96, 1996.

NAKAJIMA, H.; SANO, H.; NISHIMURA, T.; YOSHIDA, S.; IWAMOTO, I. Role of vascular cell adhesion molecule 1/very late activation antigen 4 and intercellular adhesion molecule 1/lymphocyte function-associated antigen 1 interactions in antigen-induced eosinophil and T cell recruitment into the tissue. **J. Exp. Med.**, v. 179, n. 4, p. 1145-1154, 1994.

NAVARRO, M.; SPRAY, K. J.; CUBERO, I.; THIELE, T. E.; BERNSTEIN, I. L. c-Fos induction during conditioned taste aversion expression varies with aversion strength. **Brain Res.**, v. 887, n. 2, p. 450-453, 2000.

- NEWSON, B.; DAHLSTROM, A.; ENERBACK, L.; AHLMAN, H. Suggestive evidence for a direct innervation of mucosal mast cells. **Neuroscience**, v. 10, n. 2, p. 565-570, 1983.
- NIKOLIC, V.; JOVANOVA-NESIC, K.; JANKOVIC, B. D. Locus ceruleus and immunity. I. Suppression of plaque-forming cell response and antibody production in rats with lesioned locus ceruleus. **Int. J. Neurosci.**, v. 68, n. 3-4, p. 283-287, 1993.
- OHNO, I.; NITTA, Y.; YAMAUCHI, K.; HOSHI, H.; HONMA, M.; WOOLLEY, K.; O'BYRNE, P.; TAMURA, G.; JORDANA, M.; SHIRATO, K. Transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) gene expression by eosinophils in asthmatic airway inflammation. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 15, n. 3, p. 404-409, 1996.
- OKA, T.; OKA, K.; SCAMMELL, T. E.; LEE, C.; KELLY, J. F.; NANTEL, F.; ELMQUIST, J. K.; SAPER, C. B. Relationship of EP(1-4) prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups involved in lipopolysaccharide fever responses. **J. Comp. Neurol.**, v. 428, n. 1, p. 20-32, 2000.
- OLIVEIRA, S. H.; LUKACS, N. W. The role of chemokines and chemokine receptors in eosinophil activation during inflammatory allergic reactions. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, n. 11, p. 1455-1463, 2003.
- OPARA, E. I.; LAVIANO, A.; MEGUID, M. M.; YANG, Z. J. Correlation between food intake and CSF IL-1 alpha in anorectic tumor bearing rats. **Neuroreport**, v. 6, n. 5, p. 750-752, 1995.
- OSHIBA, A.; HAMELMANN, E.; TAKEDA, K.; BRADLEY, K. L.; LOADER, J. E.; LARSEN, G. L.; GELFAND, E. W. Passive transfer of immediate hypersensitivity and airway hyperresponsiveness by allergen-specific immunoglobulin (Ig) E and IgG1 in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 97, n. 6, p. 1398-1408, 1996.
- PALERMO NETO, J.; MASSOCO, C. O.; FAVARE, R. C. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Neurotoxicol. Teratol.**, v. 23, n. 5, p. 497-507, 2001.
- PALERMO-NETO, J.; GUIMARAES, R. K. Pavlovian conditioning of lung anaphylactic response in rats. **Life Sci.**, v. 68, n. 6, p. 611-623, 2000.
- PALFRAMAN, R. T.; COLLINS, P. D.; WILLIAMS, T. J.; RANKIN, S. M. Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow. **Blood**, v. 91, n. 7, p. 2240-2248, 1998.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524-526, 1987.

PERDUE, M. H.; GALL, D. G. Transport abnormalities during intestinal anaphylaxis in the rat: effect of antiallergic agents. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 76, n. 3, p. 498-503, 1985.

PEZZONE, M. A.; LEE, W. S.; HOFFMAN, G. E.; RABIN, B. S. Induction of c-Fos immunoreactivity in the rat forebrain by conditioned and unconditioned aversive stimuli. **Brain Res.**, v. 597, n. 1, p. 41-50, 1992.

PLATA-SALAMAN, C. R. Anorexia during acute and chronic disease: relevance of neurotransmitter-peptide-cytokine interactions. **Nutrition**, v. 13, n. 2, p. 159-160, 1997.

PLATA-SALAMAN, C. R.; OOMURA, Y.; KAI, Y. Tumor necrosis factor and interleukin-1 beta: suppression of food intake by direct action in the central nervous system. **Brain Res.**, v. 448, n. 1, p. 106-114, 1988.

POLTORAK, A.; HE, X.; SMIRNOVA, I.; LIU, M. Y.; VAN HUFFEL, C.; DU, X.; BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; GALANOS, C.; FREUDENBERG, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; LAYTON, B.; BEUTLER, B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085-2088, 1998.

PORTELA, C. P.; TIBERIO, I. F.; LEICK-MALDONADO, E. A.; MARTINS, M. A.; PALERMO-NETO, J. Effects of diazepam and stress on lung inflammatory response in OVA-sensitized rats. **Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.**, v. 282, n. 6, p. L1289-1295, 2002.

PUNNONEN, J.; YSSEL, H.; DE VRIES, J. E. The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis induced by activated CD4⁺ or CD8⁺ T cells. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 100, n. 6, p. 792-801, 1997.

QUAN, N.; WHITESIDE, M.; HERKENHAM, M. Time course and localization patterns of interleukin-1beta messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. **Neuroscience**, v. 83, n. 1, p. 281-293, 1998.

RAMIREZ-AMAYA, V.; ALVAREZ-BORDA, B.; ORMSBY, C. E.; MARTINEZ, R. D.; PEREZ-MONTFORT, R.; BERMUDEZ-RATTONI, F. Insular cortex lesions impair the acquisition of conditioned immunosuppression. **Brain. Behav. Immun.**, v. 10, n. 2, p. 103-114, 1996.

- RAMIREZ-AMAYA, V.; BERMUDEZ-RATTONI, F. Conditioned enhancement of antibody production is disrupted by insular cortex and amygdala but not hippocampal lesions. **Brain. Behav. Immun.**, v. 13, n. 1, p. 46-60, 1999.
- RENZ, H.; BRADLEY, K.; ENSSLE, K.; LOADER, J. E.; LARSEN, G. L.; GELFAND, E. W. Prevention of the development of immediate hypersensitivity and airway hyperresponsiveness following in vivo treatment with soluble IL-4 receptor. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 109, n. 2, p. 167-176, 1996.
- RIETVELD, S.; EVERAERD, W.; CREER, T. L. Stress-induced asthma: a review of research and potential mechanisms. **Clin. Exp. Allergy**, v. 30, n. 8, p. 1058-1066, 2000.
- RIVEST, S. How circulating cytokines trigger the neural circuits that control the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26, n. 8, p. 761-788, 2001.
- RIVIER, C.; VALE, W. Inhibition of adrenocorticotrophic hormone secretion in the rat by immunoneutralization of corticotropin-releasing factor. **Science**, v. 218, p. 377-379, 1982.
- RIVIER, C.; VALE, W. Synthetic competitive antagonists of corticotropin-releasing factor: effects on ACTH secretion in the rat. **Science**, v. 224, p. 889-891, 1984.
- ROBINSON, D. S.; HAMID, Q.; YING, S.; TSICOPOULOS, A.; BARKANS, J.; BENTLEY, A. M.; CORRIGAN, C.; DURHAM, S. R.; KAY, A. B. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. **N. Engl. J. Med.**, v. 326, n. 5, p. 298-304, 1992.
- ROTHENBERG, M. E.; MACLEAN, J. A.; PEARLMAN, E.; LUSTER, A. D.; LEDER, P. Targeted disruption of the chemokine eotaxin partially reduces antigen-induced tissue eosinophilia. **J. Exp. Med.**, v. 185, n. 4, p. 785-790, 1997.
- RUSSO, M.; JANCAR, S.; PEREIRA DE SIQUEIRA, A. L.; MENGEL, J.; GOMES, E.; FICKER, S. M.; CAETANO DE FARIA, A. M. Prevention of lung eosinophilic inflammation by oral tolerance. **Immunol. Lett.**, v. 61, n. 1, p. 15-23, 1998.
- RUSSO, M.; NAHORI, M. A.; LEFORT, J.; GOMES, E.; DE CASTRO KELLER, A.; RODRIGUEZ, D.; RIBEIRO, O. G.; ADRIOUCH, S.; GALLOIS, V.; DE FARIA, A. M.; VARGAFTIG, B. B. Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 24, n. 5, p. 518-526, 2001.
- SAGAR, S. M.; PRICE, K. J.; KASTING, N. W.; SHARP, F. R. Anatomic patterns of Fos immunostaining in rat brain following systemic endotoxin administration. **Brain Res. Bull.**, v. 36, n. 4, p. 381-392, 1995.

- SALEH, T. S.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. **Br. J. Pharmacol.**, v. 118, n. 3, p. 811-819, 1996.
- SALTO JUNIOR, J. J.; WANDALSEN, G.; NASPITZ, C. K.; SOLE, D. Asthma and respiratory disease mortality rates in the state of Sao Paulo, Brazil: 1970-1996. **Allergol. Immunopathol. (Madr)**, v. 30, n. 1, p. 30-35, 2002.
- SAPHIER, D.; ABRAMSKY, O.; MOR, G.; OVADIA, H. Multiunit electrical activity in conscious rats during an immune response. **Brain. Behav. Immun.**, v. 1, n. 1, p. 40-51, 1987.
- SAPOLSKY, R.; RIVIER, C.; YAMAMOTO, G.; PLOTSKY, P.; VALE, W. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. **Science**, v. 238, n. 4826, p. 522-524, 1987.
- SCHILTZ, J. C.; SAWCHENKO, P. E. Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults. **J. Neurosci.**, v. 22, n. 13, p. 5606-5618, 2002.
- SCHNEIDER, H.; PITOSI, F.; BALSCHUN, D.; WAGNER, A.; DEL REY, A.; BESEDOVSKY, H. O. A neuromodulatory role of interleukin-1beta in the hippocampus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 95, n. 13, p. 7778-7783, 1998.
- SCHWARTZ, G. J.; PLATA-SALAMAN, C. R.; LANGHANS, W. Subdiaphragmatic vagal deafferentation fails to block feeding-suppressive effects of LPS and IL-1 beta in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 273, n. 3, p. R1193-1198, 1997.
- SELYE, H. A syndrome produced by diverse noxious agents. **Nature**, v. 32, p., 1936.
- SESTINI, P.; BIENENSTOCK, J.; CROWE, S. E.; MARSHALL, J. S.; STEAD, R. H.; KAKUTA, Y.; PERDUE, M. H. Ion transport in rat tracheal epithelium in vitro. Role of capsaicin-sensitive nerves in allergic reactions. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 141, n. 2, p. 393-397, 1990.
- SHINAGAWA, K.; KOJIMA, M. Mouse model of airway remodeling: strain differences. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 168, n. 8, p. 959-967, 2003.
- SIROIS, M. G.; JANCAR, S.; BRAQUET, P.; PLANTE, G. E.; SIROIS, P. PAF increases vascular permeability in selected tissues: effect of BN-52021 and L-655,240. **Prostaglandins**, v. 36, n. 5, p. 631-644, 1988.

SOUSA MUCIDA, D.; CASTRO KELLER, A.; FERNEVIK, E. C.; RUSSO, M. Unconventional strategies for the suppression of allergic asthma. **Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy**, v. 2, n. 2, p. 187-195, 2003.

SPADARO, F.; DUNN, A. J. Intracerebroventricular administration of interleukin-1 to mice alters investigation of stimuli in a novel environment. **Brain. Behav. Immun.**, v. 4, n. 4, p. 308-322, 1990.

SPATARO, A. C.; BOSMANN, H. B. Mechanism of action of disodium cromoglycate--mast cell calcium ion influx after a histamine-releasing stimulus. **Biochem. Pharmacol.**, v. 25, n. 5, p. 505-510, 1976.

SPINA, D.; PAGE, C. P. Asthma - a need for a rethink? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 23, n. 7, p. 311-315, 2002.

STEHR, D. E.; KLEIN, B. J.; MURATA, G. H. Emergency department return visits in chronic obstructive pulmonary disease: the importance of psychosocial factors. **Ann. Emerg. Med.**, v. 20, n. 10, p. 1113-1116, 1991.

STRAIT, R. T.; MORRIS, S. C.; YANG, M.; QU, X. W.; FINKELMAN, F. D. Pathways of anaphylaxis in the mouse. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 109, n. 4, p. 658-668, 2002.

STRETTON, C. D.; BELVISI, M. G.; BARNES, P. J. Sensory nerve depletion potentiates inhibitory non-adrenergic, non-cholinergic nerves in guinea-pig airways. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 184, n. 2-3, p. 333-337, 1990.

SWIERGIEL, A. H.; DUNN, A. J. Distinct roles for cyclooxygenases 1 and 2 in interleukin-1-induced behavioral changes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 302, n. 3, p. 1031-1036, 2002.

SWIERGIEL, A. H.; SMAGIN, G. N.; DUNN, A. J. Influenza virus infection of mice induces anorexia: comparison with endotoxin and interleukin-1 and the effects of indomethacin. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 57, n. 1-2, p. 389-396, 1997.

SWIERGIEL, A. H.; SMAGIN, G. N.; JOHNSON, L. J.; DUNN, A. J. The role of cytokines in the behavioral responses to endotoxin and influenza virus infection in mice: effects of acute and chronic administration of the interleukin-1-receptor antagonist (IL-1ra). **Brain Res.**, v. 776, n. 1-2, p. 96-104, 1997.

TEMANN, U. A.; PRASAD, B.; GALLUP, M. W.; BASBAUM, C.; HO, S. B.; FLAVELL, R. A.; RANKIN, J. A. A novel role for murine IL-4 in vivo: induction of MUC5AC gene expression and mucin hypersecretion. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 16, n. 4, p. 471-478, 1997.

THEOHARIDES, T. C.; SINGH, L. K.; BOUCHER, W.; PANG, X.; LETOURNEAU, R.; WEBSTER, E.; CHROUSOS, G. Corticotropin-releasing hormone induces skin mast cell degranulation and increased vascular permeability, a possible explanation for its proinflammatory effects. **Endocrinology**, v. 139, n. 1, p. 403-413, 1998.

TKACS, N. C.; LI, J.; STRACK, A. M. Central amygdala Fos expression during hypotensive or febrile, nonhypotensive endotoxemia in conscious rats. **J. Comp. Neurol.**, v. 379, n. 4, p. 592-602, 1997.

UEHARA, A.; SEKIYA, C.; TAKASUGI, Y.; NAMIKI, M.; ARIMURA, A. Anorexia induced by interleukin-1: involvement of corticotropin-releasing factor. **Am. J. Physiol.**, v. 257, p. R613-617, 1989.

UMETSU, D. T.; MCINTIRE, J. J.; AKBARI, O.; MACAUBAS, C.; DEKRUYFF, R. H. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. **Nat. Immunol.**, v. 3, n. 8, p. 715-720, 2002.

UNITED STATES OF AMERICA. Centers for Disease Control. **Current Trends Asthma - United States, 1982-1992**. Disponível em:
<<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00035450.htm>>. Acesso em: 09 set. 2004.

VALE, W.; SPIESS, J.; RIVIER, C.; RIVIER, J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. **Science**, v. 213, n. 4514, p. 1394-1397, 1981.

VARGAFTIG, B. B. Biology of airway inflammation: from immunology to altered responsiveness. **Res. Immunol.**, v. 148, n. 1, p. 7-8, 1997.

VAZ, N. M. Immunological tolerance and dogma. **Med. Hypoth.**, v. 5, p. 1037-1043, 1979.

VIGNOLA, A. M.; CHANEZ, P.; CHIAPPARA, G.; MERENDINO, A.; PACE, E.; RIZZO, A.; LA ROCCA, A. M.; BELLIA, V.; BONSIGNORE, G.; BOUSQUET, J. Transforming growth factor-beta expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 156, n. 2, p. 591-599, 1997.

VITKOVIC, L.; KONSMAN, J. P.; BOCKAERT, J.; DANTZER, R.; HOMBURGER, V.; JACQUE, C. Cytokine signals propagate through the brain. **Mol. Psychiatry**, v. 5, n. 6, p. 604-615, 2000.

VLAJKOVIC, S.; MILANOVIC, S.; CVIJANOVIC, V.; JANKOVIC, B. D. Behavioral and immunological events induced by electrical stimulation of the rat midbrain periaqueductal gray region. **Int. J. Neurosci.**, v. 77, n. 3-4, p. 287-302, 1994.

- WAN, W.; WETMORE, L.; SORENSEN, C. M.; GREENBERG, A. H.; NANCE, D. M. Neural and biochemical mediators of endotoxin and stress-induced c-fos expression in the rat brain. **Brain Res. Bull.**, v. 34, n. 1, p. 7-14, 1994.
- WARD, S. G.; BACON, K.; WESTWICK, J. Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. **Immunity**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 1998.
- WATKINS, L. R.; GOEHLER, L. E.; RELTON, J. K.; TARTAGLIA, N.; SILBERT, L.; MARTIN, D.; MAIER, S. F. Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication. **Neurosci. Lett.**, v. 183, n. 1-2, p. 27-31, 1995.
- WEINER, H. L.; FRIEDMAN, A.; MILLER, A.; KHOURY, S. J.; AL-SABBAGH, A.; SANTOS, L.; SAYEGH, M.; NUSSENBLATT, R. B.; TRENTAM, D. E.; HAFLER, D. A. Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 12, p. 809-837, 1994.
- WELLE, M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. **J. Leukoc. Biol.**, v. 61, n. 3, p. 233-245, 1997.
- WENINGER, S. C.; DUNN, A. J.; MUGLIA, L. J.; DIKES, P.; MICZEK, K. A.; SWIERGIEL, A. H.; BERRIDGE, C. W.; MAJZOU, J. A. Stress-induced behaviors require the corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor, but not CRH. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 96, n. 14, p. 8283-8288, 1999.
- WHITEHEAD, G. S.; WALKER, J. K.; BERMAN, K. G.; FOSTER, W. M.; SCHWARTZ, D. A. Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v. 285, n. 1, p. L32-42, 2003.
- WILLIAMS, C. M.; GALLI, S. J. Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice. **J. Exp. Med.**, v. 192, n. 3, p. 455-462, 2000.
- WILLS-KARP, M. Smooth muscle as a direct or indirect target accounting for bronchopulmonary hyperresponsiveness. **Res. Immunol.**, v. 148, n. 1, p. 59-72, 1997.
- WILLS-KARP, M.; LUYIMBAZI, J.; XU, X.; SCHOFIELD, B.; NEBEN, T. Y.; KARP, C. L.; DONALDSON, D. D. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. **Science**, v. 282, n. 5397, p. 2258-2261, 1998.

WOOLCOCK, A. J.; PEAT, J. K. Evidence for the increase in asthma worldwide. **Ciba Found. Symp.**, v. 206, p. 122-134; discussion 134-129, 157-129, 1997.

WRIGHT, R. J.; RODRIGUEZ, M.; COHEN, S. Review of psychosocial stress and asthma: an integrated biopsychosocial approach. **Thorax**, v. 53, n. 12, p. 1066-1074, 1998.

YAMAMOTO, T.; SAKO, N.; SAKAI, N.; IWAFUNE, A. Gustatory and visceral inputs to the amygdala of the rat: conditioned taste aversion and induction of c-fos-like immunoreactivity. **Neurosci. Lett.**, v. 226, n. 2, p. 127-130, 1997.

YAMAWAKI, I.; TAMAOKI, J.; TAKEDA, Y.; NAGAI, A. Inhaled cromoglycate reduces airway neurogenic inflammation via tachykinin antagonism. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.**, v. 98, n. 3, p. 265-272, 1997.

YING, S.; MENG, Q.; ZEIBECOGLOU, K.; ROBINSON, D. S.; MACFARLANE, A.; HUMBERT, M.; KAY, A. B. Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (Intrinsic) asthmatics. **J. Immunol.**, v. 163, n. 11, p. 6321-6329, 1999.

YIRMIYA, R. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. **Brain Res.**, v. 711, n. 1-2, p. 163-174, 1996.

ZIMMERMANN, N.; HOGAN, S. P.; MISHRA, A.; BRANDT, E. B.; BODETTE, T. R.; POPE, S. M.; FINKELMAN, F. D.; ROTHENBERG, M. E. Murine eotaxin-2: a constitutive eosinophil chemokine induced by allergen challenge and IL-4 overexpression. **J. Immunol.**, v. 165, n. 10, p. 5839-5846, 2000.

APÊNDICE A – Cortes histológicos de pulmão de animais utilizados nos experimentos descritos nesse estudo, corados por hematoxilina-eosina

Os pulmões representados na folha anterior foram retirados 24 horas após o último desafio em animais submetidos a várias nebulizações com OVA. (A) Grupo não imunizado. (B) Imunizado e desafiado. (C) Tolerantes no dia -7. (D) Animais C3H/HeJ imunizados. (E) Tolerantes no dia 0. (F) Tratados com cromoglicato dissódico e imunizados. Note o considerável infiltrado inflamatório peribroncovascular existente em (B) e (F), e ausente nos demais grupos. A barra de escala mede 50 μm .