POLIANA FERREIRA GOMES

**Avaliação da participação do sistema nervoso autônomo
parassimpático em um modelo de resposta alérgica
alimentar em camundongos**

São Paulo

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

POLIANA FERREIRA GOMES

**Avaliação da participação do sistema nervoso autônomo parassimpático em
um modelo de resposta alérgica alimentar em camundongos**

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

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. João Palermo Neto

Co-orientador:

Profa. Dra. Cristina Oliveira Massoco Salles
Gomes

São Paulo

2013

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2852
FMVZ

Gomes, Poliana Ferreira

Avaliação da participação do sistema nervoso autônomo parassimpático em um modelo de resposta alérgica alimentar em camundongos. / Poliana Ferreira Gomes. -- 2013.
59 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. João Palermo Neto.

Co-orientador: Profa. Dra. Cristina Oliveira Massoco Salles Gomes.

1. Neuroimunomodulação. 2. Alergia. 3. Anabasina. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da participação do Sistema Nervoso Autônomo Parassimpático em um modelo de resposta alérgica alimentar em camundongos", protocolado sob o nº 2269/2011, utilizando 240 (duzentos e quarenta) camundongos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. João Palermo Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/6/2011.

We certify that the Research "Evaluation of participation Parasympathetic Nervous System in a model of food allergic response in mice", protocol number 2269/2011, utilizing 240 (two hundred and forty) mice, under the responsibility Prof. Dr. João Palermo Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/22/2011.

São Paulo, 5 de julho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GOMES, Poliana Ferreira

Título: Avaliação da participação do sistema nervoso autônomo parassimpático em um modelo de resposta alérgica alimentar em camundongos

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Dedico este trabalho à minha mãe, Paula Francinete
Ferreira, por sempre ter colocado minha educação em
primeiro lugar e dedicado parte de sua vida a me permitir
aprender.*

Agradecimentos

Ao meu marido, Paulo Henrique Oliveira Gomes por ter sempre caminhado junto à mim e me apoiado em todas as minhas decisões. Por ter gasto muito de seu tempo me ajudando e acompanhando todo o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao Professor João Palermo Neto, pela oportunidade e orientação no trabalho.

À Professora Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes por todo o apoio no desenvolvimento do trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Patologia Experimental e Comparada por terem aberto suas portas fornecendo estrutura, participando e contribuindo para que esse projeto fosse realizado.

Aos membros do grupo de Neuroimunomodulação que me receberam muito bem e sempre estiveram por perto auxiliando em todas as dúvidas e dificuldades.

À FAPESP pela Bolsa concedida, além do apoio financeiro através do Projeto Temático sob coordenação do Professor Doutor João Palermo Neto. FAPESP (Processes 09/51886-3 and 2011/03884-1).

“...aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão...”

Willian Shakespeare

RESUMO

GOMES, P. F. **Avaliação da participação do sistema nervoso autônomo parassimpático em um modelo de resposta alérgica alimentar em camundongos.** [Parasympathetic nervous system participation in a model of food allergic response in mice] 2013. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Nas últimas décadas tem sido enfatizada a relevância do estudo das interações específicas entre os sistemas nervoso e imune. Pesquisas conduzidas ao longo dos últimos anos, desde Selye, têm demonstrado não apenas que o estresse modifica a atividade de órgãos linfóides, mas também que o sistema nervoso tem sua função modificada pelo sistema imune. A constatação das relevantes interações bidirecionais existentes entre os sistemas imune e nervoso, e da implicação destas interações na fisiologia e fisiopatologia acabaram por constituir o pilar mestre de um ramo da ciência conhecido como Neuroimunomodulação. Evidências recentes têm demonstrado um importante papel das vias colinérgicas parassimpáticas na comunicação bidirecional entre o cérebro e o sistema imune: a denominada Via Colinérgica Antiinflamatória. Há evidências na literatura de que as vias aferentes/eferentes do nervo vago são importantes nas interessantes interações que se estabelecem entre o sistema imune e áreas específicas do cérebro, tendo-se até mesmo sugerido que a estimulação elétrica de terminações eferentes do nervo vago teria ação terapêutica em processos inflamatórios, como, por exemplo, em modelos experimentais de sepsis, artrites, colites e pancreatites. Trabalhos experimentais de Basso et al. (2003), em nossos laboratórios, mostraram que uma reação alérgica intestinal altera a atividade de células do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e do núcleo central da amígdala (CeA), além de induzir alterações comportamentais indicativas de ansiedade. Neste contexto, pareceu-nos relevante avaliar uma possível participação do sistema nervoso autônomo parassimpático nas funções neurais e imunes desencadeadas por um processo alérgico intestinal. Mais especificamente verificar os possíveis efeitos da administração de anabasina na resposta imune entérica produzida pela administração oral de ovalbimuna (OVA) em animais OVA sensibilizados.

Palavras-chave: Neuroimunomodulação. Alergia. Anabasina.

ABSTRACT

GOMES, P.F. **Parasympathetic nervous system participation in a model of food allergic response in mice.** [Avaliação da participação do sistema nervoso autônomo parassimpático em um modelo de resposta alérgica alimentar em camundongos] 2013. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Studies of the specific interactions between nervous and immune systems increased in the last decades. Since Selye, it is known that stress change lymphoid organs activity; and more recently it was shown that the nervous system activity might be changed by immune system products. The finding of the relevant bidirectional interactions between nervous and immune systems and of their implication on physiology and pathophysiology are now taken as the pillar of neuroimmunomodulation. Recent evidences are showing an important role for parasympathetic cholinergic pathways in the bidirectional communication between the brain and the immune system: the anti-inflammatory cholinergic pathway. Literature data showed that afferent/efferent pathways of the vagus nerve are relevant for the interactions between immune system and specific brain areas; these electric stimulation of the efferent fibers of vagus were reported to have a therapeutic effect on some inflammatory processes, such as colitis, arthritis and sepsis. Data from Basso et al. (2003) showed that an allergic intestinal inflammation changes cell activity within the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) and the central nucleus of amygdala (CeA), and also that it induces behavioral changes. Within this context, it seemed to us relevant to evaluate a possible Parasympathetic Nervous System participation on neural and immune functions alterations triggered by an allergic intestinal inflammation; specifically we thought it be interesting to study the effects of Anabasine administration, on enteric immune response triggered by oral administration of ovalbumine (OVA) in OVA-sensitized mice.

Key words: Neuroimmunomodulation. Allergy. Anabasine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelos neuronais para a modulação da produção de citocinas pelo nervo vago	24
Figura 2	Representação esquemática do delineamento experimental	32
Figura 3	Eosinófilos em intestino delgado porção jejuno proximal de animais Balb/C sensibilizados e desafiados com OVA	37
Figura 4	Os círculos indicam região de infiltrado leucocitário em intestino delgado porção jejuno proximal de camundongos Balb/C sensibilizados desafiados com OVA em um aumento de 200x	39
Figura 5	Alterações morfológicas no intestino delgado porção jejuno proximal de Balb/C sensibilizados desafiados com OVA em um aumento de 100x	40
Figura 6	Número de leucócitos em sangue periférico de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA	42
Figura 7	Número de leucócitos na medula óssea de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA (OVA)	44
Figura 8	Número de leucócitos na medula óssea de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA	45
Figura 9	Concentração de IgE sérico de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de eosinófilos na região proximal do jejuno do intestino	38
Tabela 2	Número de leucócitos no sangue	41
Tabela 3	Contagem diferencial de leucócitos em sangue periférico	43
Tabela 4	Número de leucócitos na medula	43
Tabela 5	Porcentagem de preferência pelo consumo de solução adocicada contendo OVA	45
Tabela 6	Concentração de IgE em soro de sangue periférico	46

LISTA DE ABREVIATURAS

PVN – Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

CeA – Núcleo Central da Amígdala

ACh – Acetilcolina

OVA – Ovalbumina

SNC – Sistema Nervoso Central

ACTH – Hormônio Adenocorticotrófico

TSH – Hormônio Estimulante da Tireóide

NK – Natural Killer

HPA – Hipotálamo Pituitária Adrenal

CRH – Hormônio Liberador de Corticotrofina

SI – Sistema Imune

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral

NTS – Núcleo do Trato Solitário

IgE – Imunoglobulina E

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1.	NEUROIMUNOMODULAÇÃO	18
2.2.	VIA COLINÉRGICA ANTI-INFLAMATÓRIA	21
2.3.	SISTEMA GASTROINTESTINAL E ALERGIA ALIMENTAR	24
3.	OBJETIVOS	29
3.1.	OBJETIVO GERAL	29
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1.	ANIMAL	30
4.2.	FÁRMACO	30
4.3.	FORMAÇÃO DE GRUPOS	31
4.4.	SENSIBILIZAÇÃO COM OVALBUMINA (OVA)	31
4.5.	EUTANASIA	32
4.6.	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA INTESTINAL	32
4.7.	DISTRIBUIÇÃO DE LEUCÓCITOS NA MEDULA ÓSSEA E SANGUE PERIFÉRICO	33
4.8.	DOSAGEM DE IGE SÉRICA	34
4.9.	TESTE DE PREFERÊNCIA	34
4.10.	DOSAGEM SÉRICA DE CITOCINAS PERFIL Th1, Th2 E Th17	34
4.11.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS	36
5.1.	EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO ALÉRGICA INTESTINAL ATRAVÉS DE ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	36
5.2.	EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE LEUCÓCITOS NO SANGUE E NA MEDULA ÓSSEA	40
5.3.	EXPERIMENTO 3: TESTE DE PREFERÊNCIA E DOSAGEM DE IGE	44
5.4.	EXPERIMENTO 4: DOSAGEM DE CITOCINAS DE PERFIL Th1, Th2 E Th17	47
6.	DISCUSSÃO	48
7.	CONCLUSÕES	53
7.1.	CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	53
7.2.	CONCLUSÃO GERAL	53
	REFERENCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

As interações existentes entre o corpo e o cérebro são, há muito tempo, conhecidas e estudadas. Elas vêm sendo considerada desde o momento em que se percebeu que alterações psicológicas produziam mudanças na estrutura do corpo e que alterações no corpo produziam mudanças psicológicas. Nas últimas décadas começou-se a dar maior importância ao estudo das interações específicas existentes entre os sistemas nervoso e imune. Nesse sentido, comprovou-se cientificamente que estados emocionais alterados provocam, dentre outras coisas, modificações do número e da atividade de células ligadas à imunidade inata e/ou adquirida, alterações estas que podem culminar em diminuição da resistência orgânica a processos que demandam por uma resposta imune efetiva, como por exemplo, na vigência de distúrbios infecciosos e tumorais (PALERMO-NETO et al., 2003).

Em sentido inverso, trabalhos experimentais de nosso grupo de pesquisa mostraram que uma reação alérgica intestinal altera a atividade de células do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN) e do Núcleo Central da Amígdala (CeA), além de induzir alterações comportamentais (BASSO et al., 2003). Neste contexto, pareceu-nos relevante avaliar uma possível participação do sistema nervoso autônomo parassimpático em funções neurais e imunes na vigência de um processo alérgico intestinal.

As alergias alimentares são consideradas um grande problema de saúde pública em todo mundo, devido ao impacto que produzem na qualidade de vida. A alergia alimentar é uma reação imunológica adversa que um organismo manifesta frente a determinados antígenos presentes nos alimentos aos quais normalmente não seria de se esperar uma resposta de defesa. Tais antígenos são reconhecidos pelas células apresentadoras de antígeno e geram uma resposta imune mediada por células do tipo Th2. As células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, e determinam a produção de IgE pelas células B. Em uma segunda exposição ao mesmo antígeno, a IgE se ligará aos receptores Fc presentes na membrana dos mastócitos levando à sua desgranulação, com conseqüente liberação de mediadores inflamatórios como, a histamina, serotonina, prostaglandinas e leucotrienos, propiciando, assim, o início de um quadro adverso caracterizado por uma reação de hipersensibilidade imediata ao

antígeno (SAMPSON, H. A.; YORK, 1999; BASSO, 2004; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Vários mecanismos fisiológicos são capazes de regular a liberação das citocinas; mostrou-se, de igual forma, que alguns mediadores antiinflamatórios podem prevenir a liberação de citocinas que desencadeiam o processo inflamatório. No entanto, estudos têm buscado por outros mecanismos que permitam melhor entender a regulação endógena que ocorre quando da liberação destas citocinas. Evidências recentes têm demonstrado um importante papel das vias colinérgicas parassimpáticas na comunicação bidirecional entre o cérebro e o sistema imune: a denominada Via Colinérgica Antiinflamatória. Esta via controla a resposta inflamatória de forma reflexa e não consciente (BOROVIKOVA et al., 2000; TRACEY, 2002). Ela é descrita como um mecanismo neural em que eferências do nervo vago regulam os níveis de citocinas sistêmicas através de uma ação em receptores para Acetilcolina (ACh). A ativação do sistema colinérgico por estimulação elétrica do nervo vago ou por abordagens farmacológicas melhorou significativamente a evolução de doenças mediadas por citocinas (ROSAS-BALLINA et al., 2008a). Demonstrou-se que após insultos inflamatórios (infecciosos ou não) ocorre uma resposta reflexa e inconsciente, via nervo vago, que em última instância libera ACh diminuindo a inflamação. Macrófagos e outras células produtoras de citocinas expressam receptores para acetilcolina, sendo os efeitos até o momento atribuídos à subunidade $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) do receptor nicotínico (TRACEY, 2002; WANG et al., 2003). Agonistas deste receptor podem levar à inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias evitando, assim, os danos causados pela resposta inflamatória exacerbada (CZURA; TRACEY, 2005; TRACEY, 2007).

Os esforços de alguns pesquisadores estão concentrados atualmente na caracterização do papel do sistema nervoso parassimpático sobre parâmetros de imunidade inata em situações como sepsis e inflamações agudas, dentre outras. Neste sentido, o objetivo deste trabalho é ampliar essa linha de pesquisa investigando a participação do sistema nervoso parassimpático na resposta imune entérica, produzida pela administração oral de ovalbumina (OVA) em animais OVA sensibilizados. Pretende-se elucidar alguns dos possíveis mecanismos patofisiológicos desta desordem gastrointestinal, utilizando como ferramenta de trabalho a Anabasina, um agonista do receptor nicotínico $\alpha 7$. O entendimento da maneira pelo qual o sistema nervoso parassimpático interage com o sistema imune entérico é relevante para a

elucidação dos mecanismos patofisiológicos presentes em desordens gastrointestinais, incluindo-se aqui a alergia alimentar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. NEUROIMUNOMODULAÇÃO

As interações entre o corpo e a mente são, há muito tempo, conhecidas e estudadas; de fato, vem sendo consideradas desde o momento em que se percebeu que alterações psicológicas produziam mudanças na estrutura do corpo e que alterações no corpo produziam mudanças psicológicas. Nas últimas décadas começou-se a dar maior importância e maior verticalização ao estudo dessas interações bidirecionais entre os sistemas nervoso e imune.

Sabe-se, nesse sentido, que estados emocionais alterados provocam, dentre outras coisas, modificações do número e da atividade de células ligadas à imunidade inata e/ou adquirida, alterações estas que podem culminar em diminuição da resistência orgânica a processos que demandam por uma resposta imune efetiva, como por exemplo, infecções (PALERMO-NETO et al., 2003).

Até algum tempo atrás, o sistema imune era tido como um sistema de defesa com atividade independente daquela do sistema nervoso. Pesquisas conduzidas ao longo dos últimos anos, partindo do trabalho pioneiro de Selye, 1936, têm demonstrado que o estresse modifica a atividade de órgãos linfoides. De fato, já foi verificado experimentalmente que o estresse e a ansiedade, assim como fármacos de ação no sistema nervoso central (SNC) interferem com funções imunes. De fato, alterações hormonais e comportamentais foram observadas por exemplo, após estresse por choque nas patas (FONSECA; MASSOCCO; PALERMO-NETO, 2002), convivência com companheiro doente (ALVES et al., 2006; ALVES; PALERMO-NETO, 2007; PALERMO-NETO et al., 2008), restrição de movimento (CAO; HUDSON; LAWRENCE, 2003) e confrontos sociais (SÁ-ROCHA; SÁ-ROCHA; PALERMO-NETO, 2006) ou estressores químicos, como anfetamina (LIGEIRO-OLIVEIRA et al., 2004), picrotoxina (STANKEVICIUS et al., 2008) e MDMA (FERRAZ-DE-PAULA et al., 2011). Em contrapartida, tem sido mostrado que o sistema imune comunica-se com o SNC

através de substâncias produzidas durante processos imune/inflamatórios, principalmente citocinas como Interleucina I (BASSO, et al., 2003; KIRSTEN et al., 2012). A constatação das relevantes interações bidirecionais existentes entre os sistemas imune e nervoso, e da implicação destas interações com a fisiopatologia acabaram por constituir o pilar mestre de um novo ramo da ciência conhecido como Neuroimunomodulação ou Psiconeuroimunologia (ADER, 2000).

Trabalhos desenvolvidos por diferentes grupos de pesquisa buscaram pelas bases bioquímicas envolvidas nestas interações. A ligação entre os dois sistemas pode ocorrer a partir da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, através de hormônios hipotalâmicos; pode ainda ocorrer através da inervação de órgãos e células imunes, pelo sistema nervoso autônomo sendo essa ligação bidirecional. Constatou-se que os sistemas neuroendócrino e imune compartilham de receptores para citocinas, neurotransmissores, neuropeptídeos e hormônios. Verificou-se, ainda, que há terminações nervosas simpáticas e parassimpáticas em vários órgãos e tecidos do sistema imune, como timo, medula óssea e baço (BLALOCK, 1984). Além disso, mostrou-se que células imunes produzem ACTH e TSH e que citocinas são produzidas no SNC (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996). Os sistemas nervoso e imune produzem em conjunto neurotransmissores e citocinas que atuam em receptores compartilhados por elas, isto é, presentes nos dois sistemas (BLALOCK, 2005).

A partir destas observações foi possível definir o conceito da existência de uma comunicação recíproca entre os sistemas neuroendócrino e imune (MADDEN; FELTEN, 1995). Diversos resultados experimentais confirmaram o que já se esperava diante das constatações descritas anteriormente. Assim, mostrou-se que estímulos elétricos aplicados em áreas específicas do SNC alteram a resposta imune adquirida (VLAJKOVIĆ et al., 1993). Além disso, fármacos de ação central como o diazepam (LAZZARINI, et al., 2003; SAKAI, et al., 2006), e drogas psicoestimulantes como o ecstasy (MDMA) e a anfetamina (LIGEIRO-OLIVEIRA et al., 2004; PAULA, DE, 2007; LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2008); modificam a resposta imune inata e adaptativa. Variações psicológicas assim como estados de ansiedade e depressão podem interferir com a imunidade, já foram descritas alterações induzidas pelo estresse como uma redução significativa na atividade de células Natural Killer(NK), na atividade de macrófagos e neutrófilos, na proliferação de linfócitos T e B, alterações estas associadas a uma redução significativa da resistência ao desenvolvimento de infecções

e de neoplasias em animais de laboratório (ALVES; PALERMO-NETO, 2007; PALERMO-NETO, et al., 2008).

No sentido inverso BESEDOVSKY et al demonstraram em 1977, que o sistema nervoso responde a sinais do sistema imune; mostraram, especificamente, a ativação elétrica de neurônios do hipotálamo anterior após imunização de ratos (BESEDOVSKY et al., 1977). Anos depois, em 1983 o mesmo grupo observou um decréscimo no conteúdo de noradrenalina no hipotálamo, decréscimo este que aumentava concomitantemente ao pico de produção de anticorpos; demonstraram, ainda, neste estudo que a redução dos níveis de noradrenalina em regiões do hipotálamo poderia ser reproduzida pela administração de mediadores solúveis liberados por células do sistema imune ativadas *in vitro*, fortalecendo o conceito de que o sistema imune ativado provocava alterações no sistema nervoso central. BASSO em 2004, constatarem em nossos laboratórios que animais alérgicos desafiados com o antígeno por gavagem apresentam alterações comportamentais e maiores concentrações séricas de corticosterona e aumento de marcação fós no PVA e CeA em relação a animais imunizados que recebiam água pela mesma via. Outros estudos mostraram que enquanto ratos não-imunizados preferiam uma solução adocicada de OVA, e que ratos imunizados evitavam a mesma solução, além disso, ratos tolerantes apresentaram diminuição dos títulos de IgE, anulando assim a aversão. Verificou-se ainda que a dexametasona preveniu essa aversão (ZARZANA et al., 2009).

De fato, alguns anos depois o grupo de Besedovsky demonstrou que a interleucina 1 (IL-1), normalmente liberada por macrófagos ativados, estimulava o eixo HPA aumentando os níveis plasmáticos de corticosterona, mostrando assim que a ação da IL-1 se fazia através da ativação de neurônios produtores de Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRH) (BESEDOVSKY et al., 1983; BERKENBOSCH et al., 1987). Neste sentido, sabe-se que os neurônios hipofisários do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) projetam-se para a zona externa da eminência mediana, liberando CRH dentro dos capilares do sistema porta hipofisário que vascularizam a pituitária anterior; o CRH liberado liga-se a receptores específicos acoplados à proteína G presentes na superfície dos corticotrofos resultando na estimulação da síntese de ACTH. Uma vez na circulação o ACTH irá induzir a secreção de glicocorticóides pelas adrenais (ELENKOV et al., 2000).

O Sistema Nervoso Simpático é um neuromodulador chave das funções cardiovasculares, metabólicas e imunes em resposta ao estresse. É importante na manutenção da homeostase durante mudanças agudas e crônicas no estado fisiológico. A noradrenalina é o mensageiro químico do SNS e contribui de maneira relevante na resposta orgânica de “luta ou fuga”. Hoje sabemos que a noradrenalina também atua em células imunes. As catecolaminas adrenalina e noradrenalina tem sido descritas, nos últimos 30 anos, como importantes imunomoduladores após exposição a um estímulo estressor; por atuarem em adrenoreceptores α e β , e muito especialmente nos β_2 adrenoreceptores, induzem aumento ou supressão da atividade de células imunes, incluindo-se aqui a proliferação celular, produção de citocinas e de anticorpos, atividade lítica e migração celular (KOHM; SANDERS, 2000). O SNS tem sido considerado um sistema de efeitos principalmente imunossupressores. Estudos in vivo e in vitro, demonstraram que a noradrenalina pode inibir ou estimular uma resposta imune dependendo de inúmeras variáveis, como o tipo de receptor adrenérgico envolvido, a dose de agonista empregada, o tipo de antígeno para iniciar a resposta imune e os subtipos de células afetadas (DEL REY; BESEDOVSKY, 2008). Diferentes mediadores em órgãos linfoides como o baço, tem um papel importante nas interpelações neuroimunes; citocinas e neurotransmissores liberados de células imunes, exercem efeitos sobre terminais nervosos em um mecanismo de feedback, determinando uma regulação recíproca entre respostas do SI e do SNS. Alguns estudos mostraram serem as citocinas produzidas por macrófagos e linfócitos capazes de inibir a liberação de NA de terminais pré-sinápticos (STRAUB et al., 2006).

Outra via bidirecional de interação entre os sistemas nervoso e imune que vem sendo investigada nos últimos anos é a Via Colinérgica Antiinflamatória. Uma via descrita como um mecanismo neural em que o nervo vago eferente regula os níveis de citocinas através de receptores de (ACh), controla a resposta inflamatória de forma reflexa e não consciente (BOROVIKOVA; et al., 2000; TRACEY; 2002). Sobre elas, faremos considerações adicionais.

2.2 VIA COLINÉRGICA ANTI-INFLAMATÓRIA

Evidências recentes têm demonstrado um importante papel das vias colinérgicas parassimpáticas na comunicação bidirecional entre o cérebro e o sistema imune: a denominada Via Colinérgica Antiinflamatória. Esta via controla a resposta inflamatória de forma reflexa e não consciente (BOROVIKOVA et al., 2000; TRACEY, 2002). Ela é descrita como um mecanismo neural em que o nervo vago eferente regula os níveis de citocinas sistêmicas através da ativação de receptores de (ACh). A ativação do sistema colinérgico por estimulação elétrica do nervo vago ou por abordagens farmacológicas melhorou significativamente doenças mediadas por citocinas (ROSAS-BALLINA et al., 2008b). Sabe-se a esse respeito que mediadores como, IL-1 e fator de necrose tumoral (TNF- α) produzidos durante uma resposta imune, auxiliam na regulação e alteração funcional de receptores que sensibilizam neurônios aferentes intestinais, principalmente do nervo vago, convergindo a informação sensorial visceral para o SNC. Trabalhos experimentais de Basso e colaboradores (2003) mostraram que uma reação alérgica intestinal altera a atividade de células do PVN e CeA, além de induzir alterações comportamentais. Há evidências na literatura de que as vias aferentes/eferentes do nervo vago são importantes na interação entre o sistema imune e áreas específicas do cérebro, tendo-se até mesmo sugerido que uma estimulação elétrica de terminais eferentes do nervo vago poderia ter ação terapêutica (TRACEY, 2007).

Mais especificamente, patógenos e danos teciduais induzem a liberação de citocinas no sítio inflamatório. Essas citocinas ativam fibras aferentes do nervo vago que atingem o núcleo do trato solitário no cérebro. Sinais compensatórios são transmitidos via nervo vago eferente até o sítio inflamatório onde ocorre a liberação de neurotransmissores, como a Acetilcolina (ACh), que vão agir nos macrófagos e demais células imunes atenuando, assim, a resposta inflamatória (ROSAS-BALLINA; TRACEY, 2009). Vale ressaltar, que a forma como ocorre esse reflexo inflamatório pelo braço eferente do nervo vago ainda não foi totalmente elucidado. Sabe-se no entanto que estimulações elétricas do nervo vago atenuam a liberação sistêmica de TNF- α através de uma via dependente da subunidade $\alpha 7$ do receptor nicotínico. A administração de agonistas $\alpha 7$ (p. ex. ANABASINA) ou a ativação da via colinérgica neuronal que depende de receptores muscarínicos e que aumentam a atividade vagal, atenuam os níveis de TNF- α . Assim, foram propostos dois modelos neuronais para a modulação da

produção de citocinas pelo nervo vago. O primeiro envolve o neurônio pós-ganglionar localizado no gânglio do plexo mesentérico celíaco superior, que atinge o baço através do nervo esplênico. Neste modelo, a estimulação elétrica do nervo vago cervical atenua os níveis sistêmicos de TNF- α através de uma via dependente da subunidade $\alpha 7$ do receptor nicotínico, do nervo esplênico e de catecolaminas. A estimulação do nervo vago pode modular a liberação de noradrenalina pelo nervo esplênico. Neste cenário, essa noradrenalina liberada pelo nervo esplênico pode agir nos receptores $\beta 2$ adrenérgicos expressos nos macrófagos atenuando assim, a liberação de TNF- α . Ainda, especula-se que a subunidade $\alpha 7$ do receptor nicotínico presente nos neurônios do plexo mesentérico celíaco superior sejam responsáveis pelo sinal entre o vago e o nervo esplênico. Uma segunda alternativa, propõe que a noradrenalina originada nos terminais do nervo esplênico induziriam a liberação de ACh proveniente de células não neurais (por exemplo, linfócitos) que, agindo na subunidade $\alpha 7$ do receptor nicotínico presente nos macrófagos, atenuaria a liberação de TNF- α (ROSAS-BALLINA; TRACEY, 2009) (**Figura 1**).

Figura 1 - Modelos neuronais para a modulação da produção de citocinas pelo nervo vago

Fonte: (ROSAS-BALLINA; TRACEY, KEVIN J, 2009)

2.3. SISTEMA GASTROINTESTINAL E ALERGIA ALIMENTAR

O intestino é responsável pela digestão, absorção de nutrientes e regulação da ingestão dos alimentos; a motilidade e a secreção intestinais são condicionadas à presença ou não de alimentos na luz intestinal que reconhece também, substâncias nocivas ao organismo, promovendo respostas imunes apropriadas (HOLZER et al.,

1994; RAYBOULD, 1999). A alergia alimentar é um dos maiores problemas de saúde pública, e tem aumentado com o passar do tempo. Neste sentido, os alimentos entram em contato com o intestino, e encontram uma superfície mucosa disponível para absorção, com área média estimada de 200m^2 (JUNQUEIRA, 2004). As moléculas protéicas ingeridas poderão ou não desencadear uma resposta imune, dependendo da via de entrada e da história imunológica do indivíduo. Muitas proteínas comuns, que em situações normais não desencadeiam uma resposta alérgica, podem provocar tal resposta em indivíduos geneticamente susceptíveis ou a ela sensibilizados. Estes indivíduos apresentam, de modo geral, uma elevada produção de anticorpos para antígenos alimentares específicos, causando este fato uma resposta alérgica alimentar (SICHERER; SAMPSON, 2010).

Boa parte dos mecanismos envolvidos na sintomatologia que decorre da alergia alimentar, é bem estudada e conhecida. A desgranulação de mastócitos parece estar relacionada ao aumento do transporte de íons pelo epitélio, a alterações na absorção de nutrientes e à contração da musculatura lisa intestinal, além de causar edema de mucosa e diminuição da integridade da barreira epitelial (BASSO, 2004). De fato, podem provocar sintomas em um ou mais órgãos, além de dor, diarreia e vômitos, que afetam o próprio sistema gastrointestinal; têm, ainda, potencial para induzir urticária, rinite, edema de glote e, até mesmo, choque anafilático.

A alergia alimentar é uma reação imunológica que um organismo apresenta a determinados antígenos presentes nos alimentos aos quais normalmente não seria iniciada uma resposta de defesa. No entanto, tais antígenos são reconhecidos pelas células apresentadoras de antígeno e geram uma resposta imune mediada por células do tipo Th2. As células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, e determinam a produção de IgE pelas células B. Em uma segunda exposição aos mesmos antígenos, a IgE se ligará aos receptores Fc presentes na membrana dos mastócitos levando à sua desgranulação, com conseqüente liberação de mediadores inflamatórios como, a histamina, serotonina, prostaglandinas e leucotrienos, isto é, propiciando o início de um quadro patológico (BINGHAM; AUSTEN, 2000) caracterizado como uma reação de hipersensibilidade imediata ao antígeno (SAMPSON; YORK, 1999; BASSO, 2004; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008), que ocorre minutos após a exposição ao antígeno. Estes mediadores irão promover os sintomas e sinais específicos da reação

inflamatória alérgica, dentre os quais se incluem aqueles ligados à atividade do SNC e via de consequência ao comportamento.

Uma série de trabalhos têm mostrado a existência de correlações positivas entre as doenças alérgicas e as alterações comportamentais em humanos; as hipóteses mais aceitas na atualidade, para o entendimento das alterações comportamentais induzidas por reações alérgicas, envolvem sinalização por citocinas. Pesquisas realizadas em nossos laboratórios mostraram que após desafio oral com antígeno, camundongos sensibilizados com OVA apresentam maiores níveis de ansiedade, maiores níveis séricos de corticosterona e aumento de imunorreatividade para Fos no PVN e CeA, áreas cerebrais relacionadas com emotividade. Os neurônios ativados pela alergia alimentar são capazes de produzir fator liberados de CRF. Os dados também demonstram que a alergia alimentar leva a ativação do núcleo do trato solitário (NTS). Verificou-se que a alergia alimentar influencia a atividade do SNC e o comportamento animal, além disso, seus dados evidenciaram a participação de mecanismos dependentes de IgE e das fibras do tipo C na comunicação entre o cérebro e o intestino de animais com alergia alimentar (BASSO, 2004).

Langley em 1921, um pesquisador inglês que primeiro conceituou o sistema nervoso autônomo, não propôs uma divisão do sistema nervoso autônomo em apenas dois grupos, ele propôs ainda um terceiro componente: o sistema nervoso entérico, devido a enorme diferença numérica entre as fibras provenientes do SNC que chegam ao intestino e as fibras nervosas que podem ser encontradas no intestino. As terminações nervosas das fibras sensoriais C adjacentes aos mastócitos na mucosa gastrointestinal, são responsáveis por perceber a liberação destes mediadores. O bloqueio de receptores serotoninérgicos 5-HT₃ mostrou estar a serotonina envolvida no processo de desenvolvimento de aversão na alergia alimentar. As prostaglandinas potencializam o efeito da bradicinina ao sensibilizarem as fibras C aferentes, responsáveis pela nocicepção (RANG et al., 2004; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; ZARZANA et al., 2009).

As citocinas produzidas pelos mastócitos são responsáveis pela reação de fase tardia, que ocorre de 2 a 4 horas após a exposição ao antígeno. A reação de fase tardia consiste no acúmulo de leucócitos inflamatórios, envolve a ativação dos eosinófilos e seu recrutamento de células para o sítio da inflamação, além do recrutamento de outros leucócitos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Sabe-se, a

esse respeito, que vários mecanismos fisiológicos são capazes de regular a liberação das citocinas; assim, mostrou-se que alguns mediadores antiinflamatórios podem prevenir a liberação de citocinas que desencadeiam o processo inflamatório (TRACEY, 2007).

No entanto, estudos têm buscado por outros mecanismos que permitam melhor entender o que ocorre com a regulação endógena da liberação destas citocinas. Tracey em 2007 descreveu um mecanismo alternativo de controle da liberação de citocinas durante um processo inflamatório que envolve a participação do sistema nervoso autônomo parassimpático. De fato, quando o ambiente local na parede ou no lúmen gastrointestinal recebe algum estímulo, a informação é levada ao SNC por inervação vagal, sendo convertida em um reflexo que retorna ao local do estímulo por vias nervosas eferentes, dentre elas, pela parassimpática. Mais especificamente, postulou-se que o sistema nervoso autônomo receberia a informação através de receptores sensoriais e as enviaria ao sistema nervoso central, que coordenaria as respostas parassimpáticas ou simpáticas que promoveriam o retorno à homeostasia. Recentemente, verificou-se que neurônios colinérgicos podem regular a síntese de $\text{TNF-}\alpha$ via Ach, um caminho neural que monitora e ajusta a resposta inflamatória, denominada de via colinérgica antiinflamatória. Demonstrou-se, em especial, que após estímulos inflamatórios (infecciosos ou não) ocorre uma resposta reflexa e inconsciente, via nervo vago, que em última instância culmina com a liberação de Ach diminuindo a inflamação; a este fenômeno foi dado o nome de Reflexo Inflamatório. Macrófagos e outras células produtoras de citocinas expressam receptores para Ach, sendo que os efeitos deste neurotransmissor têm sido, até o momento, atribuídos à subunidade $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) do receptor nicotínico. Estes receptores quando expostos à Ach ou a fármacos agonistas destes receptores nicotínicos são desativados, resultando em inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, atenuando-se, os danos causados pela resposta inflamatória exacerbada (CZURA; TRACEY, 2005; TRACEY, 2007).

Atualmente, os esforços de alguns pesquisadores estão concentrados principalmente na caracterização do papel do sistema nervoso autônomo parassimpático sobre parâmetros de imunidade inata em situações como sepsis e inflamações agudas, dentre outros (TRACEY, 2007). Em nossos laboratórios o papel do sistema nervoso parassimpático tem sido estudado sobre a indução de uma

resposta imune adquirida, mais especificamente sobre a atividade de células dendríticas (PINHEIRO, 2012). Neste sentido o objetivo deste trabalho será ampliar essa linha de pesquisa investigando a participação do sistema nervoso autônomo parassimpático na resposta imune entérica, produzida pela administração oral de ovalbumina (OVA) em animais OVA sensibilizados. Pretende-se elucidar alguns dos possíveis mecanismos patofisiológicos desta desordem gastrointestinal, utilizando-se como ferramenta de estudo a Anabasina, um agonista do receptor nicotínico $\alpha 7$.

A Anabasina é um composto derivado da Anabaseine, um alcaloide tóxico isolado de um verme marinho, e posteriormente encontrado em algumas espécies de formigas. Quando injetado em camundongos estimula a liberação de Acetilcolina no córtex cerebral. A Anabasina exibe um espectro único de ação sobre receptores nicotínicos específicos (KEM et al., 1997); exercendo diferentes efeitos em todo o organismo. Já foi demonstrado que a Anabasina diminui a produção endógena de estrógeno em mulheres fumantes; além disso, verificou-se que a Anabasina tem capacidade de aumentar a cognição em ratos idosos, um efeito comparável ao fato de que a nicotina age em uma variedade de tarefas comportamentais, podendo ter valor terapêutico em doenças ligadas à memória (BARBIERI; GOCHBERG; RYAN 1986; ARENDASH et al., 1995).

Mostrou-se ser a Anabasina um potente ativador do receptor de nicotina $\alpha 7$ (PAPKE et al., 2000). Já foi verificado que camundongos com colite experimental quando tratados com Anabasina, apresentaram diminuição do dano tecidual, diminuição da produção de TNF- α no cólon, em comparação a animais doentes não tratados (BAI; GUO; LU, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Utilizando-se de um agonista farmacológico (Anabasina), avaliar a participação do SNAP em um modelo de resposta alérgica alimentar em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Utilizando-se de ferramentas farmacológicas (um agonista nicotínico) avaliar a participação do SNAP em um modelo de resposta alérgica alimentar induzida por ovalbumina (OVA) em animais OVA sensibilizados sobre:

- Inflamação alérgica intestinal através de análise histopatológica;
- Distribuição de leucócitos no sangue e medula óssea;
- Os níveis de Imunoglobulina E (IgE) por ELISA;
- Os níveis de citocinas TH1, TH2, e TH17 por ELISA;
- Teste de preferência.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAL

Utilizamos camundongos Balb./C, machos com 6 a 8 semanas de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo. Antes do início dos experimentos, os camundongos foram alojados em gaiolas de propileno (28 x 17 x 12cm) em número de 5 animais por gaiola para adaptação às condições do biotério experimental. Estas gaiolas foram acondicionadas em salas cuja temperatura ambiente (24 a 26°C) e umidade (65 a 70%) são mantidas por meio de aparelhos de ar condicionado central, com ventilação, exaustão e luminosidade controladas, obedecendo-se a um ciclo claro – escuro de 12 horas, com início da fase clara às 7:00 horas. Os animais foram alimentados com ração balanceada para roedores NUTRILABOR GUABI®. Ração e água foram fornecidas aos animais *ad libitum* durante todos os experimentos. Os experimentos descritos abaixo, foram aprovados pelo comitê de ética da FMVZ-USP, protocolo número: 2269/2011, tendo sido realizados após um período de adaptação de no mínimo 7 dias.

4.2 FÁRMACO

Utilizamos a anabasina, um agonista de receptor nicotínico $\alpha 7$, na dose de 4mg/Kg, 30 minutos antes do desafio com OVA. Esta dose e tempo foram escolhidos com base em dados obtidos da literatura (Martinez-Ferrer, Iturregui *et al.*, 2008) e em resultados obtidos em nossos laboratórios (PINHEIRO, 2012).

4.3 FORMAÇÃO DE GRUPOS

Os animais foram divididos em 4 grupos:

- alérgico + veiculo (OVA): Animais submetidos à indução de uma inflamação alérgica intestinal e tratados com solução salina 0,9% 30 minutos antes do desafio alergênico.
- alérgico + Anabasina (OVA+ANA): Animais submetidos à indução de uma inflamação alérgica intestinal e tratados com Anabasina 30 minutos antes do desafio alergênico.
- não alérgico + Anabasina (ANA): Animais não submetidos à indução de inflamação alérgica intestinal, e tratados com Anabasina 30 minutos antes do desafio alergênico.
- não alérgico + veiculo (Controle): Animais não submetidos à indução da inflamação alérgica intestinal, e tratados com solução salina 0,9% 30 minutos antes do desafio alergênico.

4.4 SENSIBILIZAÇÃO COM OVALBUMINA (OVA)

A sensibilização intestinal com OVA foi realizada conforme descrita por BASSO e colaboradores (2004), com o acréscimo de dois desafios com OVA. Os camundongos foram imunizados nos dias 0 e 14 do experimento (D_0 e D_{14}) por meio de uma injeção intraperitoneal de 4 μ g de OVA grau V (Sigma® Chemical CO, MO, USA) preparado em PBS com 1,6 mg de gel de hidróxido de alumínio em PBS com volume total de 0,4 mL.

Os camundongos receberam, água (0,5 mL) via oral através de gavagem nos dias D_{18} , D_{19} e D_{20} . Essa habituação permitiu que se minimizem possíveis intervenções da manipulação e/ou da gavagem nos resultados dos experimentos. Nos dias D_{21} , D_{22} D_{23} , dias dos desafios, os camundongos receberam por gavagem 0,5 mL

de solução de OVA (60% de solução de OVA grau II em solução de NaCl 0,9%). A Figura 2 ilustra este delineamento.

Figura 2: Representação esquemática do delineamento experimental

Fonte: (GOMES, P. F., 2013)

4.5 EUTANASIA

Após dessensibilização com cetamina e xilasina, os animais foram eutanasiados por exsanguinamento através de um corte na veia cava caudal, após anestesia com cetamina na dose de 100mg/kg e xilazina na dose de 20 mg/kg, via i.p.

4.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA INTESTINAL

A inflamação intestinal foi avaliada através de cortes histológicos do intestino corados com hematoxilina e eosina (HE); para tanto, o intestino delgado foi retirado, dividido em duas partes, aberto ao meio, ficando a luz intestinal exposta, sendo ele lavado com NaCl 0,9% para retirada das fezes e enrolados com auxílio de uma pinça. Esta metodologia foi adotada no laboratório para melhor visualização de toda a extensão do intestino (MOOLENBEEK; RUITENBERG, 1981). As porções intestinais foram fixadas em formol tamponado a 10%, desidratadas em soluções decrescentes de álcoois, clarificadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes de 5µm foram obtidos para posterior avaliação. Dez campos foram escolhidos ao acaso, empregando-se um aumento de 400x para a contagem do número de eosinófilos; o resultado foi expresso em número de eosinófilos por campo (DOURADO, 2006).

4.7 DISTRIBUIÇÃO DE LEUCÓCITOS NA MEDULA ÓSSEA E SANGUE PERIFÉRICO

Foi analisada a distribuição de leucócitos foi analisada entre a medula óssea e o sangue. Para determinar a celularidade da medula óssea, após anestesia com Cetamina e Xilasina, os animais foram eutanaziados por exsanguinação, na veia cava caudal. O fêmur direito de cada animal foi retirado e o conteúdo da medula óssea foi lavado com 5,0 mL de meio RPMI-1640 e a suspensão resultante foi acondicionada dentro de banho de gelo. A contagem do número de leucócitos totais foi realizada em câmara de Neubauer, após coloração com azul de tripan. O sangue dos animais foi coletado, após anestesia com Cetamina e Xilasina através da veia cava caudal. A contagem de leucócitos totais no sangue foi realizada em câmara de Neubauer, após coloração com Líquido de Thoma. A contagem diferencial dos leucócitos no sangue foi realizada utilizando-se critérios morfológicos após coloração de uma extensão sanguínea com corante Rosenfeld, visando estabelecer a porcentagem de cada tipo celular.

4.8 DOSAGEM DE IGE SÉRICA

O sangue dos animais foi coletado e centrifugado. O soro foi retirado e guardado em freezer -80°C até a dosagem dos níveis séricos de IgE que foi realizado por kits de ELISA, conforme orientação do fabricante.

4.9 TESTE DE PREFERÊNCIA

Os animais foram isolados em gaiolas individuais 3 dias antes do teste. Dois bebedouros idênticos foram dispostos na gaiola. No dia do teste, realizado no segundo dia de desafio, D₂₂, um dos bebedouros foi preenchido com uma solução de clara de ovo a 20% em solução 0,5% de sacarina e o outro com água. Os bebedouros foram pesados antes de iniciar o teste e após 24 horas. O consumo total foi expresso em gramas de solução ingerida. A preferência pela solução adocicada foi indicada pela porcentagem de consumo da mesma (consumo de clara/consumo total)x100.

4.10 DOSAGEM SÉRICA DE CITOCINAS PERFIL TH1, TH2 E TH17

O sangue dos animais foi coletado e centrifugado. O soro foi retirado e armazenado em freezer -80°C até a dosagem dos níveis de citocinas que foi realizada por kit CBA, conforme orientação do fabricante. Foram analisadas as concentrações de IL-10, IL-17A, TNF, IL-4, IFN- γ , IL-2 e IL-6.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de Bartlett para avaliação de serem eles paramétricos ou não paramétricos. Os dados paramétricos foram analisados por meio do teste ANOVA, seguido do teste Newman-Keuls para comparações múltiplas. Foram consideradas significantes as análises com $p < 0,05$. Os testes foram realizados por intermédio do programa GraphPad Prism for Windows versão 5 (2007).

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO ALÉRGICA INTESTINAL ATRAVÉS DE ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os animais foram divididos em grupos de 10, conforme descritos no item 4.3, recebendo os tratamentos descritos nos itens 4.2 e 4.4. Uma hora após o terceiro desafio com OVA por gavagem, os animais foram eutanasiados e seus intestinos coletados conforme descrito nos itens 4.5 e 4.6. Foi realizada a contagem de eosinófilos na região proximal do jejuno do intestino dos animais conforme descrito no item 4.6. A figura 3 exemplifica um campo de contagem de eosinófilos.

Figura 3 - Eosinófilos em intestino delgado porção jejuno proximal de animais Balb/C sensibilizados e desafiados com OVA

Fonte: (GOMES, P. F., 2013)

Legenda: Aumento de 400x, escala 50 μ m.

Resultados: A tabela 1 mostra o número de eosinófilos por campo. De sua leitura observamos que houve um aumento no número de eosinófilos nos animais sensibilizados e desafiados com OVA ($F=150,9$; $df=3,16$; $p<0,001$). Quando tratados previamente com anabasina esse aumento foi evitado.

Tabela 1 - Número de eosinófilos na região proximal do jejuno do intestino

Grupos	Número de eosinófilos no intestino (cél/s/campo)
Controle	2,2±0,48
OVA	6,38±0,14*
ANA+OVA	1,94±0,37
ANA	2,06±0,46

Legenda: Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, n=5; * $p<0,001$ em relação aos grupos Controle, ANA+OVA e ANA. (ANOVA seguido do teste Newman-Keuls)

A figura 4, mostra o infiltrado de leucócitos no jejuno proximal nos animais sensibilizados com OVA e expostos ao desafio oral com OVA.

Figura 4: Os círculos indicam região de infiltrado leucocitário em intestino delgado porção jejuno proximal de camundongos Balb/C sensibilizados desafiados com OVA em um aumento de 200x

Fonte: (GOMES, P. F., 2013)

Legenda: A imagem A mostra o intestino delgado de um animal do grupo controle. A imagem B mostra intestino delgado de um animal alérgico desafiado com OVA (OVA). A imagem C mostra o intestino delgado de um animal do grupo alérgico desafiado com OVA, tratado previamente com Anabasina (ANA+OVA) A imagem D mostra o intestino delgado de um animal não alérgico tratado com Anabasina (ANA).

Foi ainda possível perceber alterações morfológicas nos cortes histológicos do intestino. Os animais do grupo controle apresentam as criptas com pouco infiltrado inflamatório, além disso, os vilos eram longos e finos. Nos animais alérgicos desafiados com OVA as criptas se apresentam edemaciadas e com aumento do infiltrado inflamatório e os vilos apresentam-se curtos e de tamanho aumentado, também com aumento de infiltrado inflamatório como podemos visualizar na Figura 5.

Figura 5 - Alterações morfológicas no intestino delgado porção jejuno proximal de Balb/C sensibilizados desafiados com OVA em um aumento de 100x

Fonte: (GOMES, P. F., 2013)

Legenda: A imagem A mostra a morfologia dos vilos e criptas do intestino delgado de um animal do grupo controle. A imagem B mostra a morfologia dos vilos e criptas do intestino delgado de um animal do grupo OVA. A imagem C mostra a morfologia dos vilos e criptas do intestino delgado de um animal do grupo ANA+OVA. A imagem D mostra a morfologia dos vilos e criptas do intestino delgado do grupo ANA

5.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE LEUCÓCITOS NO SANGUE E NA MEDULA ÓSSEA

Os animais foram divididos em grupos de 10 animais cada, receberam os tratamentos conforme descrito nos itens 4.2 e 4.4. Uma hora após o terceiro desafio

com OVA por gavagem, o sangue dos animais foi coletado conforme descrito no item 4.7. Em seguida os animais foram eutanasiados e a medula óssea foi coletada conforme descrito no mesmo item.

Resultados: A tabela 2 apresenta o número de leucócitos totais no sangue. Houve aumento do número de leucócitos no grupo imunizado, e desafiado com OVA ($F=19,12$; $df=3,36$; $p<0,0001$). Esse aumento não aconteceu quando os animais foram tratados com Anabasina antes do desafio. A análise estatística mostrou diferenças significativas entre os grupos conforme ilustrado na figura 6.

Tabela 2 - Número de leucócitos no sangue

Grupos	Número de leucócitos (cél/s $\times 10^6/\mu\text{L}$)
Controle	3,74 $\pm$ 0,47
OVA	4,89 $\pm$ 0,57
ANA+OVA	3,28 $\pm$ 0,42
ANA	3,61 $\pm$ 0,52

Legenda: Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de $n=10$

Figura 6 - Número de leucócitos em sangue periférico de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA

Legenda: Animais sensibilizados e desafiados com OVA, tratados com Anabasina (ANA+OVA). Animais não alérgicos tratados com Anabasina (ANA). * $p < 0,0001$ em relação aos grupos Controle, ANA+OVA e ANA, $n=10$ animais. (ANOVA seguido do teste Newman-Keuls)

A distribuição diferencial de leucócitos também foi avaliada assim como as porcentagens de leucócitos totais. Como mostra a tabela 3, a porcentagem de monócitos não apresentou alterações, porém as porcentagens de neutrófilos ($F=61,94$; $df=3,36$; $p<0,0001$) e de eosinófilos ($F=28,65$; $df=3,36$; $p<0,0001$) aumentaram quando os animais imunizados foram expostos ao antígeno. O tratamento prévio com Anabasina preveniu este aumento. A porcentagem de linfócitos mostrou-se diminuída nos animais imunizados e expostos ao antígeno ($F=61,74$; $df=3,36$; $p<0,0001$); o mesmo não ocorreu quando os animais foram tratados previamente com Anabasina.

Tabela 3 - Contagem diferencial de leucócitos em sangue periférico

%	Controle	OVA	OVA+ANA	ANA
Neutrófilos	27,9±1,79	43,56±4,97 *	29,56±1,66	28,3±2,00
Linfócitos	65,5±2,06	51,6±3,56 *	62,3±2,54	64,9±1,91
Eosinófilos	0,6±0,51	4,4±1,64 *	0,8±0,78	1,2±0,9

Legenda: valores em porcentagem do número total de leucócitos; * $p < 0,0001$ em relação aos grupos Controle, OVA+ANA e ANA, os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, $n=10$ animais (ANOVA seguido do teste Newman-Keuls)

O número de leucócitos medidos na medula óssea está descrito na tabela 4. Os animais imunizados apresentaram uma redução no número de leucócitos ($F=31,75$; $df=3,36$; $p < 0,0001$), essa redução foi evitada com o uso prévio de Anabasina, conforme descrito na Tabela 4 e ilustrado na Figura 7.

Tabela 4: Número de leucócitos na medula

Grupos	Número de leucócitos (célx $10^6/\mu\text{L}$)
Controle	10,78±0,55
OVA	7,28±0,77*
ANA+OVA	10,19±1,16
ANA	11,00±1,20

Legenda: Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, $n=10$; * $p < 0,0001$ em relação aos grupos Controle, OVA+ANA e ANA, os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, $n=10$ animais (ANOVA seguido do teste Newman-Keuls)

Figura 7 - Número de leucócitos na medula óssea de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA (OVA)

Legenda: Animais sensibilizados e desafiados com OVA, tratados com Anabasina (ANA+OVA). Animais não alérgicos tratados com Anabasina (ANA). * $p < 0,0001$ em relação aos grupos Controle, ANA+OVA e ANA (ANOVA seguido do teste Newman-Keuls). Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, $n=10$ animais

5.3. EXPERIMENTO 3: TESTE DE PREFERÊNCIA E DOSAGEM DE IGE

Os animais foram divididos em grupos de 10 animais, sendo tratados conforme descrito nos itens 4.2 e 4.4 e o teste de preferência foi realizado conforme descrito no item 4.9. O sangue foi coletado e processado conforme descrito no item 4.8 para dosagem de IgE.

Resultados: Conforme mostra a tabela 5 e ilustra a figura 8, os animais sensibilizados apresentam aversão ao consumo de solução contendo OVA ($F=35,83$; $df=3,36$; $p<0,0001$). No entanto, tratamento prévio com Anabasina não foi capaz de impedir que os animais apresentassem aversão à solução de OVA.

Tabela 5 - Porcentagem de preferência pelo consumo de solução adocicada contendo OVA

Grupos	Preferência pelo consumo de solução adocicada de OVA (%)
Controle	66,01±13,07
OVA	32,62±7,16 *
ANA+OVA	29,18±5,94 *
ANA	59,07±11,23

Legenda: Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, n=10; * p <0,0001 em relação aos grupos Controle e ANA, n=10 animais

Figura 8 - Número de leucócitos na medula óssea de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA

Legenda: Animais sensibilizados e desafiados com OVA, tratados com Anabasina (ANA+OVA). Animais não alérgicos tratados com Anabasina (ANA). * p <0,0001 em relação aos grupos Controle, ANA+OVA e ANA. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, n=10 animais

As concentrações de IgE em sangue estão apresentadas na tabela 6, e são ilustradas pela Figura 9. A concentração de IgE mostrou-se aumentada nos animais sensibilizados e desafiados com OVA e também nos animais que receberam o tratamento com Anabasina 30 minutos antes de cada desafio ($F=18,14$; $df=3,18$; $p<0,001$).

Tabela 6 - Concentração de IgE em soro de sangue periférico

Grupos	Concentração de IgE em soro sanguíneo ng/mL
Controle	12,28±1,95
OVA	275,3±128,3
ANA+OVA	321,7±131,2
ANA	7,97±2,39

Legenda: Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, n=6; * $p < 0,0001$ em relação aos grupos Controle e ANA, n=6 animais

Figura 9: Concentração de IgE sérico de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA

Legenda: Animais sensibilizados e desafiados com OVA, tratados com Anabasina (ANA+OVA) Animais não alérgicos tratados com Anabasina (ANA). * $p < 0,0001$ em relação aos grupos Controle e ANA, $n=6$ animais.

5.4 EXPERIMENTO 4: DOSAGEM DE CITOCINAS DE PERFIL TH1, TH2 E TH17

Os animais foram divididos em grupos de 10 animais, sendo tratados conforme descrito nos itens 4.2 e 4.4. Uma hora após o terceiro desafio com OVA por gavage, o sangue dos animais foi coletado conforme descrito no item 4.7. A dosagem de citocinas foi realizada conforme descrito no item 4.10.

Resultados: Os animais não apresentaram níveis detectáveis de IL-10, IL-17A, TNF, IFN- γ , IL-2 e IL-6 no soro. O grupo Controle apresentou $1,62 \pm 0,33$ pg/mL (média mais desvio padrão) de IL-4 e o grupo ANA apresentou $1,38 \pm 0,12$ pg/mL (média mais desvio padrão), os outros grupos tiveram o nível de IL-4 reduzido a níveis indetectáveis.

6. DISCUSSÃO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a participação do sistema nervoso parassimpático na resposta alérgica alimentar, empregando-se Anabasina, um agonista de receptores colinérgicos, buscando, desta forma, mimetizar a ativação da via colinérgica anti-inflamatória descrita por Tracey em 2007. Esta via que tem como mediador a ACh, é responsável por carrear informações do sistema nervoso central (SNC) até o sítio de resposta imunológica, modificando a atividade das células imunes que possuem receptores específicos para a ACh. É preciso recordar que a alergia alimentar é uma reação de hipersensibilidade do tipo I mediada por IgE, com grande participação dos mastócitos. A ligação de várias moléculas de IgE em receptores de mastócitos faz com que esses liberem mediadores químicos. Entre outras funções esses mediadores recrutam leucócitos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008) que participam no desenvolvimento do processo alérgico. Desta forma, iniciamos nossos trabalhos pela avaliação do perfil morfológico e do infiltrado celular do intestino delgado de animais alérgicos submetidos a desafio alergênico, tratados ou não com Anabasina.

No primeiro experimento verificamos que o intestino destes animais apresentava alterações morfológicas indicativas de um processo inflamatório como, por exemplo, diminuição do comprimento dos vilos e aumento da largura destes, com aumento de infiltrado por células inflamatórias e aumento do número de eosinófilos. Essas alterações foram prevenidas pelo uso do agonista colinérgico Anabasina muito provavelmente por atuar em receptores nicotínicos presentes nas células do sistema imune principalmente em macrófagos, mas também em outras células como, por exemplo, em células dendríticas. De fato, foram descritos receptores colinérgicos nicotínicos nestas células (WANG, et al., 2003).

No segundo experimento verificamos que as alterações no número de leucócitos totais, no sangue periférico, na medula óssea e as alterações nas porcentagens de leucócitos específicas como neutrófilos, eosinófilos e linfócitos no sangue foram impedidas quando os animais imunizados foram previamente tratados com Anabasina.

Em um processo alérgico, a exposição repetida a um alérgeno leva a desgranulação do mastócito que libera citocinas responsáveis pelo recrutamento de leucócitos da medula óssea, que passam pela circulação sanguínea e chegam ao sítio da inflamação, local de contato com o alérgeno, fato que explicaria a diminuição agora observada do número de leucócitos na medula óssea e o aumento destes no sangue e no intestino.

Em ambos os experimentos verificamos que o uso prévio de um agonista colinérgico nos animais imunizados e expostos a um desafio alérgico foi capaz de impedir as alterações, o que sugere que um estímulo colinérgico seja capaz de reduzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Um agonista colinérgico consegue inibir a resposta inflamatória, entre outros, por diminuir a produção de TNF- α e inibir a ativação de NF- κ B (BAI; GUO; LU, 2007). Desta forma, ao se ligar ao receptor $\alpha 7$ nicotínico de ACh, a anabasina reduziria a síntese e liberação de citocinas pelos mastócitos. De fato, citocinas produzidas pelos mastócitos, como IL-4, IL-5 e TNF- α , participam da fase tardia da resposta imune, que ocorre de 2 a 4 horas após a exposição ao antígeno. A reação de fase tardia consiste no acúmulo de leucócitos inflamatórios, envolve a ativação dos eosinófilos e seu recrutamento para o sítio da inflamação, além do recrutamento de outros leucócitos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008), fatos que observados neste trabalho, foram reduzidos pela Anabasina.

No terceiro experimento avaliamos a preferência dos animais imunizados pela solução adocicada contendo OVA; mais uma vez observamos que os animais alérgicos apresentavam uma aversão à ingestão da solução com OVA. Os presentes resultados reforçam a ideia de que os animais imunizados pela OVA preferem evitar a ingestão de soluções que contenham o antígeno, optando pela segunda alternativa. Confirmam assim os resultados obtidos anteriormente em nossos laboratórios por (BASSO et al., 2003). No entanto, essa aversão não foi revertida nos animais tratados com Anabasina. Estes resultados foram coerentes com a não diminuição na concentração de IgE no soro sanguíneo dos animais OVA sensibilizados e tratados com a Anabasina. Em seu conjunto, os dados mostram que o uso prévio de Anabasina não foi capaz de impedir que os animais imunizados e desafiados apresentassem alterações nos níveis de IgE e nem as alterações comportamentais desencadeadas pelo processo alérgico, embora este tratamento com Anabasina tenha reduzido o processo inflamatório intestinal e as alterações de

migração de leucócitos sanguíneos. Estes dados vão ao encontro do que foi descrito por (PINHEIRO, 2012), no qual o tratamento com anabasina foi capaz de diminuir o edema nas patas dos camundongos, e também o trabalho de (BOROVIKOVA et al., 2000), no qual o uso do CNI-1493 (agonista colinérgico) também foi capaz de reduzir esta resposta inflamatória nas patas, em um mecanismo dependente do nervo vago intacto.

Outro fato que reforça nossos resultados, é que Cara e Conde em 1994, verificaram a existência de uma relação direta entre a produção de anticorpos totais anti-OVA e o desencadeamento da aversão à ingestão de clara. Uma das evidências a favor desta correlação positiva foi o fato de já ser a aversão evidenciada no 14º dia após a imunização primária, quando o aumento dos níveis séricos de anticorpos específicos (IgM e IgG) anti-OVA acentua-se no 21º dia da inoculação do antígeno, isto é, no momento em que os anticorpos específicos estavam elevados. Os anticorpos específicos parecem, assim, ser fundamentais para que os mecanismos efetores da resposta ao desafio sejam elicitados e, em sua decorrência, ocorra alteração comportamental, isto é, a aversão à solução adocicada de clara de ovo (CARA; CONDE, 1994).

Neste sentido, Basso et al (2003) mostraram, em camundongos que o isotipo IgE é essencial para o desenvolvimento da alteração comportamental uma vez que o tratamento dos animais com um anticorpo anti-IgE realizado sete dias antes do desafio foi capaz de bloquear o desenvolvimento da aversão, nos animais imunizados.

Avaliados em conjunto, os dados do processo inflamatório intestinal, o hemograma, o teste de preferência e a dosagem de IgE, apontam que o uso de um agonista colinérgico após a imunização foi capaz de modular o processo inflamatório proveniente da hipersensibilidade imediata, mas não interferir com a sensibilidade dos mastócitos aos já elevados níveis de anticorpos circulantes, os quais são os responsáveis pela alteração comportamental.

Como não foi possível avaliar o infiltrado de mastócitos no intestino não podemos afirmar se o agonista colinérgico modulou o processo inflamatório via redução da desgranulação de mastócitos, células imprescindíveis para o desencadeamento da resposta inflamatória no modelo estudado. No entanto não houve diferença nos níveis de IgE no grupo tratado com a Anabasina, é tentador supor que a resposta dos mastócitos via IgE deve ter sido semelhante em ambos os

grupos. A uma vez que o comportamento aversivo não foi revertido após o tratamento com a Anabasina e, sabendo que não estão bem descritos e conhecidos os mecanismos envolvidos na hipersensibilidade imediata; nesta, os animais sensibilizados desenvolvem uma produção de anticorpos IgE específicos ao antígeno. Mais especificamente, estes anticorpos se fixam na superfície de mastócitos presentes na mucosa intestinal tornando os animais alérgicos à OVA; de fato após um novo contato com o antígeno é ativada a resposta anafilática.

Essa reação alérgica imediata liberaria mediadores como serotonina, histamina, prostaglandinas e leucotrienos que modulariam o comportamento dos animais, levando-os a preferir uma solução adocicada pela presença de OVA nesta solução.

Sabe-se que os mastócitos são uma das principais células no processo inflamatório desencadeado no modelo estudado e que estes estão localizados em íntima associação morfológica com fibras peptidérgicas presentes na mucosa intestinal. De fato, em seres humanos cerca de 47-77% destas células foram descritas em íntima associação com fibras nervosas (BIENSTOCK, 1995). Neste sentido, alguns estudos funcionais têm indicado que a interação mastócito-nervo faz-se de maneira bidirecional, ou seja, tanto os mediadores derivados dos mastócitos podem estimular os nervos, como vice-versa (MCKAY, BIENSTOCK, 1994).

Em especial, pode-se pensar em uma modulação do comportamento animal desencadeada por sinalização serotoninérgica das fibras C, estimulação esta decorrente da liberação de serotonina na fase imediata da reação alérgica. É possível, ainda, pensar na existência de sensibilização das fibras C produzida pela síntese de prostaglandinas, pois esta se forma minutos após a desgranulação dos mastócitos. Nesse sentido, BASSO em 2004 mostrou que as fibras C participam na transmissão de pelo menos parte da informação gerada pela resposta imune ao ver que o uso de capsaicina aumentou a preferência dos animais OVA-sensibilizados pela solução adocicada contendo OVA em relação aos animais imunizados e não tratados com a capsaicina. Este autor também mostrou a ausência de correlação significativa entre a preferência dos camundongos pela solução adocicada contendo OVA e a sensibilidade visceral, o que indicaria que a dor visceral não estaria envolvida com o desenvolvimento da alteração comportamental em questão.

Em seu conjunto podemos sugerir que o uso de um agonista colinérgico 30 minutos antes de um desafio alergênico em animais previamente imunizados

embora reduza o processo inflamatório e a migração de células inflamatórias para o intestino, não impede as alterações comportamentais decorrentes do desafio antigênico, muito provavelmente devido às altas concentrações de IgE já presentes antes do tratamento.

No entanto, estudos subsequentes devem ser realizados para comprovar a modulação do nervo vago sobre a resposta imune entérica produzida pela administração oral de ovalbumina (OVA) em animais OVA sensibilizados. De qualquer forma, o presente trabalho foi capaz de evidenciar que a modulação do sistema parassimpático é dirigida principalmente à migração de células inflamatórias, não impedindo a manifestação de uma resposta imune anafilática no modelo de imunização empregado neste projeto.

7. CONCLUSÕES

7.1 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

- O tratamento com a Anabasina preveniu as alterações morfológicas indicativas de processo inflamatório, muito provavelmente por atuar em receptores nicotínicos presentes nas células do sistema imune.
- O tratamento com a Anabasina impediu as alterações induzidas pelo processo inflamatório alérgico intestinal no número de leucócitos totais no sangue periférico e na medula óssea e as alterações nas porcentagens de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos.
- O tratamento com a Anabasina não modificou as concentrações de IgE no soro sanguíneo de animais OVA sensibilizados.
- O tratamento com a Anabasina, não reverteu as alterações comportamentais decorrentes do processo inflamatório alérgico intestinal, isto é, a aversão à solução com antígeno.

7.2 CONCLUSÃO GERAL

Conclui-se ainda que a via colinérgica anti-inflamatória está envolvida na resposta alérgica alimentar e que as alterações comportamentais induzidas imunologicamente não tem relação direta com o processo inflamatório intestinal, uma vez que o uso de Anabasina não interferiu com estas alterações comportamentais.

REFERENCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 2008.
- ADER, R. On the development of psychoneuroimmunology. **European Journal of Pharmacology**, v. 29, n. 405, p. 167-76, 2000.
- ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Neuroimunomodulação : sobre o diálogo entre os sistemas nervoso e imune Neuroimmunomodulation : the cross-talk between nervous and immune systems. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. v. 29, n. 55 11, p. 363–369, 2007.
- ALVES, G. J.; VISMARI, L.; FLORIO, J. C.; PALERMO-NETO, JOÃO. Cohabitation with a sick cage mate: Effects on noradrenaline turnover and neutrophil activity. **Neuroscience research**, v. 56, n. 2, p. 172–9, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16971013>>. Acesso em: 28jun.2013.
- ARENDASH, G. W.; SENGSTOCK, G. J.; SANBERG, P. R.; KEM, W. R. Improved learning and memory in aged rats with chronic administration of the nicotinic receptor agonist GTS-21. **Brain research**, v. 674, n. 2, p. 252–9, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7796104>>. Acesso em: 28jun.2013.
- BAI, A; GUO, Y.; LU, N. The effect of the cholinergic anti-inflammatory pathway on experimental colitis. **Scandinavian journal of immunology**, v. 66, n. 5, p. 538–45, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17953529>>. Acesso em: 30maio2012.
- BARBIERI, R. L.; GOCHBERG, J.; RYAN, K. J. Nicotine, cotinine, and anabasine inhibit aromatase in human trophoblast in vitro. **The Journal of clinical investigation**, v. 77, n. 6, p. 1727–33, 1986.
- BASSO, A S. **Percepção neural da alergia alimentar: envolvimento de mecanismos dependentes de IgE e das fibras nervosas do tipo C**. 2004. 151 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- BASSO, A. S.; COSTA PINTO, F. A.; RUSSO, M. BRITTO, L. R. G.; SÁ-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **Journal of Neuroimmunology**, v. 140, n. 1-2, p. 69–77, 2003.
- 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** (New York, N.Y.), v. 238, n. 4826, p. 524–6, 1987.
- BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Endocrine Reviews. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 1, p. 64–102, 1996.

BESEDOVSKY, H. O.; SORKIN, E.; FELIX, D.; HAAS, H. Hypothalamic changes during the immune response. **European Journal of Immunology**, v. 7, n. 5, p. 323–325, 1977.

BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; DA PRADA, M.; BURRI, R.; HONEGGER, C. The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons. **Science** (New York, N.Y.), v. 221, n. 4610, p. 564–6, 1983.

BINGHAM, C. O.; AUSTEN, K. F. Mast-cell responses in the development of asthma. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v. 105, n. 2, p. 527–34, 2000.

BLALOCK, J. E. The immune system as a sensory organ. **Journal of immunology**, v. 132, n. 3, p. 1067–70, 1984.

BLALOCK, J. E. The immune system as the sixth sense. **Journal of internal Medicine**, v. 257, n. 2, p. 126–38, 2005.

BOROVIKOVA, L. V.; IVANOVA, S.; NARDI, D.; ZHANG M.; YANG, H.; OMBRELLINO, M.; TRACEY, K. J.; Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. **Autonomic Neuroscience : Basic & Clinical**, v. 85, n. 1-3, p. 141–7, 2000.

BOROVIKOVA, L. V.; IVANOVA, S.; ZHANG, M.; YANG, H.; BOTCHKINA, G. I.; WATKINS, L. R.; WANG, H.; ABUMRAD, N.; EATON, J. W.; TRACEY, K. J. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 458–62, 2000.

CAO, L.; HUDSON, C. A.; LAWRENCE, D. A. Immune changes during acute cold/restraint stress-induced inhibition of host resistance to *Listeria*. **Toxicological sciences : an official Journal of the Society of Toxicology**, v. 74, n. 2, p. 325–34, 2003.

CARA, D.C.; CONDE, A.A.; VAZ, N. Immunological induction of labor aversion in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 6, n. 27, p. 1331–1341, 1994.

CZURA, C J; TRACEY, K J. Autonomic neural regulation of immunity. **Journal of internal medicine**, v. 257, n. 2, p. 156–66, 2005.

DOURADO, L. P. A. **Participação das citocinas na aversão e alergia alimentar induzida à ovalbumina em camundongos**, 2006. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2006.

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. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 595–638, 2000.

FERRAZ-DE-PAULA, V.; STANKEVICIUS, D.; RIBEIRO, A.; PINHEIRO, M. L.; RODRIGUES-COSTA, E. C.; FLORIO, J. C.; LAPACHINSKE, S. F.; MOREAU, R. L.

M.; PALERMO-NETO, J. Differential behavioral outcomes of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA-ecstasy) in anxiety-like responses in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n.5, p. 428-437, 2011.

FONSECA, E. S. M.; MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J. Effects of prenatal stress on stress-induced changes in behavior and macrophage activity of mice. **Physiology & Behavior**, v. 77, n. 2-3, p. 205–15, 2002.

HOLZER, H. H.; TURKELSON, C. M.; SOLOMON, T. E.; RAYBOULD, H. E. Intestinal lipid inhibits gastric emptying via CCK and vagal capsaicin-sensitive afferent pathway in rats. **American Journal of Physiology**, v. 267, n. 4, p. 625-9, 1994.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2004. 540 p.

KEM, W. R.; MAHNIR, V. M.; PAPKE, R. L.; LINGLE, C. J. Anabaseine is a potent agonist on muscle and neuronal alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 283, n. 3, p. 979–92, 1997.

KIRSTEN, T. B.; CHAVES-KIRSTEN, G. P.; CHAIBLE, L. M. SILVA, A. C.; MARTINS, D. O.; BRITTO, L. R.; DAGLI, M. L.; TORRÃO, A. S.; PALERMO-NETO, J.; BERNARDI, M.M. Hypoactivity of the central dopaminergic system and autistic-like behavior induced by a single early prenatal exposure to lipopolysaccharide. **Journal of neuroscience research**, v. 90, n. 10, p. 1903–12, 2012.

KOHM, A. P.; SANDERS, V. M. Norepinephrine: a messenger from the brain to the immune system. **Immunology Today**, v. 5699, n. 11, p. 539–542, 2000.

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

LIGEIRO DE OLIVEIRA, A. P.; LAZZARINI, R.; CAVRIANI, G.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; TAVARES DE LIMA, W.; PALERMO-NETO, J. Effects of single or repeated amphetamine treatment and withdrawal on lung allergic inflammation in rats. **International immunopharmacology**, v. 8, n. 9, p. 1164–71, 2008.

LIGEIRO-OLIVEIRA, A. P.; FIALHO DE ARAÚJO, A. M.; LAZZARINI, R.; SILVA, Z. L.; DE NUCCI, G.; MUSCARA, M. N.; TAVARES DE LIMA, W.; PALERMO-NETO. Effects of amphetamine on immune-mediated lung inflammatory response in rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 11, n. 3, p. 181–90, 2004.

MADDEN, K. S.; FELTEN, D. Physiological reviews. **Physiological Reviews**, v. 75, n. 1, p. 77–106, 1995.

MOOLENBEEK, C.; RUITENBERG, E. J. The “Swiss roll”: a simple technique for histological studies of the rodent intestine. **Laboratory animals**, v. 15, n. 1, p. 57–9, 1981.

PALERMO-NETO, J.; FONSECA, E. S. M.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; CORREIA, C. S. C.; SAKAI, M. Effects of individual housing on behavior and resistance to Ehrlich tumor growth in mice. **Physiology & behavior**, v. 95, n. 3, p. 435–40, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18664370>>. Acesso em: 6jun.2013.

PALERMO-NETO, J.; OLIVEIRA MASSOCO, C.; ROBESPIERRE DE SOUZA, W. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain, behavior, and immunity**, v. 17, n. 1, p. 43–54, 2003.

PAPKE, R. L.; MEYER, E.; NUTTER, T.; UTESHEV, V. V. Alpha7 Receptor-Selective Agonists and Modes of Alpha7 Receptor Activation. **European journal of pharmacology**, v. 393, n. 1-3, p. 179–95, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10771012>>. Acesso em 30maio2012.

PAULA, V. F. DE. **Avaliação dos efeitos do N-metil-3-4 metilenodioximetanfetamina (MDMA - Ecstasy) sobre parâmetros comportamentais, neuroendócrinos e de atividade de neutrófilos em camundongos**, 2007. 151f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

PINHEIRO, M. **Ativação de receptores nicotínicos modula a atividade de células dendríticas OVA sensibilizadas**. 2012. 105f. Tese (Doutorado em Ciências) Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. Rio de Janeiro. Elsevier, 2004.

RAYBOULD, H. E. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. I. Sensing of lipid by the intestinal mucosa. **American Journal of Physiology**, v. 277, n. 4, p. 751-5, 1999.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Sympathetic nervous system-immune interactions in autoimmune lymphoproliferative diseases. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, n. 1, p. 29–36, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18667797>>. Acesso em: 30maio2012.

ROSAS-BALLINA, M.; OCHANI, M.; PARRISH, W. R.; OCHANI, K.; HARRIS, Y. T.; HUSTON, J. M.; CHAVAN, S.; TRACEY, K. J. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 31, p. 11008–13, 2008a.

ROSAS-BALLINA, M.; OCHANI, M.; PARRISH, W. R.; OCHANI, K.; HARRIS, Y. T.; HUSTON, J. M.; CHAVAN, S.; TRACEY, K. J. Splenic nerve is required for

cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 31, p. 11008–13, 2008b.

ROSAS-BALLINA, M.; TRACEY, K. J. The neurology of the immune system: neural reflexes regulate immunity. **Neuron**, v. 64, n. 1, p. 28–32, 2009. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19840545>>. Acesso em: 5mar.2012.

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

SAMPSON, H. A. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. **Journal of Allergy Clinical Immunology Disorders**. v. 103, p. 717–728, 1999.

SÁ-ROCHA, V. M.; SÁ-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Variations in behavior, innate immunity and host resistance to B16F10 melanoma growth in mice that present social stable hierarchical ranks. **Physiology & Behavior**, v. 88, n. 1-2, p. 108–15, 2006.

SICHERER, S. H.; SAMPSON, H. A. Food allergy. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. 116–25, 2010. Supplement, 2. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042231>>. Acesso em: 19jun.2013.

STANKEVICIUS, D.; RODRIGUES-COSTA, E. C.; CAMILO FLÓRIO, J.; PALERMO-NETO, J. Neuroendocrine, behavioral and macrophage activity changes induced by picrotoxin effects in mice. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 2, p. 300–8, 2008.

STRAUB, R. H.; WIEST, R.; STRAUCH, U. G.; HÄRLE, P.; SCHÖLMERICH, J. The role of the sympathetic nervous system in intestinal inflammation. **Gut**, v. 55, n. 11, p. 1640–9, 2006.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853–9, 2002.

TRACEY, K. J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. **Health** (San Francisco), v. 117, n. 2, p. 289-96, 2007.

VLAJKOVIĆ, S.; DUGANDZIJA-NOVAKOVIĆ, S.; MILANOVIĆ, S.; JANKOVIĆ B.D. Brain self-stimulation and immunity: effect on humoral and cell-mediated immune responses. **The International Journal of neuroscience**, v. 69, n. 1-4, p. 235–250, 1993.

WANG, HONG; YU, M.; OCHANI, M. et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 384–8, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12508119>>. .

ZARZANA, E. C.; BASSO, A. S.; COSTA-PINTO, F. A.; PALERMO-NETO, J.
Pharmacological manipulation of immune-induced food aversion in rats.
Neuroimmunomodulation, v. 16, n. 1, p. 19–27, 2009.