ALEXANDRE SALGADO BASSO

Percepção neural da alergia alimentar: envolvimento de mecanismos dependentes de IgE e das fibras nervosas do tipo C

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. João Palermo Neto

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.1386
FMVZ

Basso, Alexandre Salgado
Percepção neural da alergia alimentar: envolvimento de mecanismos dependentes de IgE e das fibras nervosas do tipo C / Alexandre Salgado Basso. – São Paulo : A. S. Basso, 2004.
151 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2004.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. João Palermo Neto.

1. Hipersensibilidade. 2. Comportamento. 3. Ansiedade. 4. Alimentos. I. Título.

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Alteração de preferência ao sabor: uma análise da resposta imune envolvida e das interações com o Sistema Nervoso Central", Protocolo nº 56/2002, sob a responsabilidade do Prof.Dr. João Palermo Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado pela referida Comissão, em sessão de 17/04/2002.

(We certify that the Research "Immune-induced flavor aversion: interactions betwen the immune reponse and the central nervous system" protocol number 56/2002, under the responsability of Prof.Dr. João Palermo Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 04/17/2002 meeting.

São Paulo, 17 de abril de 2002

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

Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87 - 05508-900 - Cid. Univ. "Armando de Salles Oliveira"
Fone/Fax: (011) 3032-2224 / 3818-7672 / 3818-7678

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BASSO, Alexandre Salgado

Título: Percepção neural da alergia alimentar: envolvimento de mecanismos dependentes de IgE e das fibras nervosas do tipo C

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:_____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Admir e Itacy

Dos quais sempre recebo apoio irrestrito e incondicional, sejam quais forem os caminhos escolhidos por mim.

AGRADECIMENTOS

À minha família; em essência, um tanto de italianos reunidos. Rimos juntos, choramos juntos, brigamos um bocado e, acima de tudo, nos gostamos muito e vibramos pela conquista de cada um como se fosse a nossa própria.

À Rita, de quem, desde que nos encontramos, recebo carinho, amor, amizade e companheirismo. Caminhar ao seu lado torna as coisas mais fáceis e mais prazerosas.

Ao Prof. Dr. João Palermo-Neto, pela orientação, dedicação, confiança, autonomia e liberdade durante todas as fases de execução deste trabalho. Condições e atributos que considero fundamentais, não só na realização deste trabalho, como também na minha formação. Obrigado, João.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Sá-Rocha, ou como acredito que seja da sua preferência, ao grande Lu. Os meus agradecimentos a quem, apostando em mim juntamente com o João, foi o responsável direto pelos meus primeiros passos dentro de um laboratório de pesquisa. Valeu, chefia!

Ao Prof. Dr. Benjamin Eurico Malucelli, grande Bijo, pelas inúmeras conversas regadas a boa música que aconteceram em ambiente onde se cultivam os amigos, a ciência e um sax bem tocado. Acho que nesse ambiente, sem perceber, fui infectado pelo tal vírus da ciência. Valeu, Bijo!

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto G. Britto, ao Adilson Alves e a todos do laboratório de Neurobiologia Celular do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. A participação de vocês foi fundamental na realização do trabalho, mas além disso, e acho que mais importante, considero especial o convívio e os laços cultivados com todos ao longo destes anos. Sempre fui muitíssimo bem recebido por aí. Obrigado a todos!

Ao Prof. Dr. Momtchilo Russo, que além de colaborador é também um amigo de algum tempo. O seu jeito peculiar e único de pensar e encarar as questões científicas, e não só as científicas, favorece o desenvolvimento da curiosidade, da criatividade ao questionar. As conversas são sempre ótimas. Valeu, Momtchilo! Agradeço também à Eliane Gomes, Dúnia, Daniel e Alex, seja pela colaboração ou pelos bate-papos sempre animados.

À Prof. Dra. Carol F. Elias, ao Prof. Dr. Jackson C. Bittencourt, à Jô e aos demais do Laboratório de Neuroanatomia Química do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Cheguei aí com o intuito de aprender e realizar a metodologia de hibridização *in situ* e também fui muito bem recebido por todos no laboratório. Apesar de conviver com vocês há menos tempo, tenho certeza de que este convívio já rendeu e ainda renderá bons frutos. Obrigado pela ajuda e cooperação de vocês.

À Erika e ao Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela estimada cooperação na dosagem sérica de corticosterona.

À Rosana Pagano, pela não menos estimada ajuda na execução do teste utilizado para avaliar a eficiência do tratamento neonatal com capsaicina.

À todos os funcionários do Biotério e dos demais setores do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sem os quais a realização deste trabalho seria impossível.

Às funcionárias do setor de Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela atenção concedida sempre que solicitada.

Aos funcionários das Bibliotecas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela colaboração durante toda a elaboração deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado (00/07126-0) e pelo apoio financeiro ao Projeto Temático na área de Neuroimunomodulação (99/04228-7).

À todos os colegas de Pós-graduação, especialmente aqueles que compõem o grupo de neuroimuno, não só pelo convívio, como também pela contribuição direta ou indireta na realização deste trabalho.

A alguns amigos da 57ª turma da Veterinária/USP: Zé Jensen, Cassiano, Pavan, Jegão, Marco (Vaca) e, especialmente, Fredão, companheiro no exercício diário de pensar e fazer ciência ao longo de todos esses anos.

RESUMO

BASSO, A. S. **Percepção neural da alergia alimentar**: envolvimento de mecanismos dependentes de IgE e das fibras nervosas do tipo C. [Neural correlates of food allergy: role of IgE-dependent mechanisms and sensory C-fibers]. 2004. 151 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Embora alguns estudos tenham considerado a possibilidade da existência de uma relação direta entre alergia alimentar e alterações de comportamento, são escassas as evidências que sustentem esta hipótese. Relatamos neste trabalho que, após desafio oral com o antígeno, camundongos sensibilizados com ovalbumina (OVA) apresentaram maiores níveis de ansiedade, maiores níveis séricos de corticosterona e aumento da imunorreatividade para Fos no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e no núcleo central da amígdala (CeA), áreas cerebrais relacionadas com emotividade. Os neurônios ativados pela alergia alimentar no PVN e no CeA são capazes de produzir fator liberador de corticotrofina (CRF). Os dados também demonstraram que a alergia alimentar leva à ativação do núcleo do trato solitário (NTS). Além disso, observamos que animais imunizados com OVA desenvolveram aversão à ingestão de uma solução contendo clara de ovo. Um tratamento com anticorpo anti-IgE ou a indução de tolerância oral bloquearam tanto o desenvolvimento da aversão à dieta contendo o antígeno quanto a expressão de *c-fos* no sistema nervoso central (SNC). Para investigar o modo pelo qual se dá a comunicação entre o cérebro e o intestino de animais com alergia alimentar, tratamos camundongos neonatalmente com capsaicina visando a destruição de fibras sensoriais do tipo C. O tratamento com capsaicina, embora não tenha impedido o desenvolvimento da aversão, diminuiu a sua magnitude. Ademais, este tratamento bloqueou completamente a ativação do PVN e diminuiu a expressão de *c-fos* induzida pela alergia alimentar no núcleo do trato solitário (NTS). Contudo, o tratamento com capsaicina não

modificou a imunorreatividade para Fos no CeA de animais imunizados desafiados por via oral com o antígeno. Estes resultados demonstram claramente que a alergia alimentar influencia a atividade do SNC e o comportamento animal. Além disso, os dados obtidos evidenciam a participação de mecanismos dependentes de IgE e das fibras do tipo C na comunicação entre cérebro e o intestino de animais com alergia alimentar. De modo geral, além de enfatizar a relevância da integração entre os sistemas imune e nervoso na elaboração de respostas adaptativas, este estudo fornece subsídios para uma melhor compreensão de possíveis desordens de natureza psicológica em pacientes alérgicos.

Palavras-chave: Hipersensibilidade. Alimentos. Comportamento. Ansiedade.

ABSTRACT

BASSO, A. S. **Neural correlates of food allergy**: role of IgE-dependent mechanisms and sensory C-fibers. [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.

Although many authors have considered the possibility of a direct interaction between food allergy and behavioral changes, the evidence supporting this hypothesis is elusive. Here we show that after oral OVA challenge allergic mice present higher levels of anxiety, increased serum corticosterone, and increased Fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) and in the central nucleus of the amygdala (CeA), which are both emotionality-related brain areas. Food allergy-activated neurons in the PVN and in the CeA are able to produce CRF. We found that food allergy also induced enhanced Fos immunoreactivity in the nucleus of tractus solitarii (NTS) of OVA-immunized animals. Besides that, OVA-immunized animals developed aversion to an antigen-containing solution. Treatment with anti-IgE antibody, or induction of oral tolerance abrogated both food aversion and the expression of *c-fos* in the central nervous system. In order to investigate the brain-gut communication in allergic animals, we have employed destruction of sensory C fibers by neonatal capsaicin treatment. Although this treatment did not block development of food aversion, it decreased the magnitude of such aversion. Moreover, we observed that while the degree of Fos staining in the NTS of allergic mice was only diminished by neonatal capsaicin, it was completely blocked in the PVN. However, capsaicin did not modify food alergy-induced *c-fos* expression in the CeA. Besides establishing a direct relationship between brain function and food allergy, our findings provide evidence showing that IgE-dependent mechanisms and the sensory C fibers play an important role in food allergy signaling to the

mouse brain. Finally, this study creates a solid ground for understanding the etiology of psychological disorders in allergic patients.

Key words: Food allergy. Capsaicin. IgE. Behavior. c-fos. Anxiety. C-fibers. PVN. CeA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Disposição dos neurônios aferentes primários intrínsecos e relação com os neurônios aferentes primários espinhais e vagais que inervam o intestino..... 44

Figura 2 - Esquema explicativo do delineamento experimental..... 51

Figura 3 - Desenvolvimento de aversão à dieta contendo o antígeno em camundongos alérgicos..... 62

Figura 4 - Camundongos com alergia alimentar apresentam maiores níveis de ansiedade..... 64

Figura 5 - Expressão de *c-fos* em regiões específicas do cérebro de camundongos com alergia alimentar..... 66

Figura 6 - Representação gráfica de corte de cérebro de camundongo ilustrando região que corresponde ao núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN)..... 66

Figura 7 - Alergia alimentar leva à expressão de *c-fos* no PVN..... 67

Figura 8 - Representação gráfica de corte de cérebro de camundongo ilustrando região que corresponde ao núcleo central da amígdala (CeA)..... 68

Figura 9 - Corte histológico de cérebro de camundongo que corresponde à FIGURA 7..... 68

Figura 10 - Alergia alimentar leva à expressão de *c-fos* no CeA..... 69

Figura 11 - Neurônios ativados pela alergia alimentar no PVN e no CeA são capazes de produzir fator liberador de corticotrofina (CRF)..... 70

Figura 12 - Alergia alimentar leva à ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA)..... 71

Figura 13 - Tolerância oral impede o desenvolvimento de aversão à dieta contendo o antígeno em camundongos alérgicos..... 73

Figura 14 - Tolerância oral impede a ativação do PVN e do CeA em camundongos alérgicos..... 73

Figura 15 - Tolerância oral impede a ativação do PVN..... 74

Figura 16 - Tolerância oral impede a ativação do CeA..... 74

Figura 17 - Níveis séricos de IgG1 e IgE específicas para OVA após indução de tolerância oral..... 75

Figura 18 - IgE é essencial para o desenvolvimento de aversão à dieta contendo o antígeno em animais alérgicos..... 76

Figura 19 - IgE é essencial para a ativação do PVN e do CeA em camundongos alérgicos..... 77

Figura 20 - IgE é essencial para a ativação do PVN e do CeA em camundongos alérgicos. Seções coronais de cérebro..... 77

Figura 21 - Níveis séricos de IgG1 e IgE específicas para OVA após tratamento com anticorpo anti-IgE..... 78

Figura 22 - Tratamento neonatal com capsaicina diminui a magnitude da aversão à dieta contendo o antígeno em camundongos alérgicos, mas não impede o seu desenvolvimento..... 80

Figura 23 - Tratamento neonatal com capsaicina diminui a magnitude da aversão à dieta contendo o antígeno em camundongos alérgicos..... 81

Figura 24 - Tratamento neonatal com capsaicina diminui sensibilidade à dor visceral..... 81

Figura 25 - Efeito do tratamento neonatal com capsaicina sobre a expressão de *c-fos* no cérebro de camundongos com alergia alimentar..... 83

Figura 26 - Efeitos do tratamento neonatal com capsaicina sobre a expressão de *c-fos* induzida pela alergia alimentar no NTS..... 84

Figura 27 - Efeitos do tratamento neonatal com capsaicina sobre a expressão de *c-fos* induzida pela alergia alimentar no PVN..... 85

Figura 28 - Efeitos do tratamento neonatal com capsaicina sobre a expressão de *c-fos* induzida pela alergia alimentar no CeA..... 86

Figura 29 - Áreas do cérebro contendo neurônios que expressam fator liberador de corticotrofina (CRF)..... 92

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	serotonina
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
BGG	gama globulina bovina
BSA	albumina bovina sérica
CCK	colecistoquinina
CeA	núcleo central da amígdala
CRF	fator liberador de corticotrofina
EDTA	ácido dietilenodiaminotetracético
ELISA	*enzime linked immunosorbent assay*
HPA	hipotálamo-hipófise-adrenal
IBS	síndrome inflamatória do intestino
ICV	intracerebroventricular
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
IP	intraperitoneal
LCE	labirinto em cruz elevado
LPS	lipopolissacarídeo de parede bacteriana
NDGA	ácido nor-dihidroguaarético
NE	noradrenalina
NTS	núcleo do trato solitário
OPD	ortofenileno-diamino
OVA	ovalbumina
PAF	fator de agregação plaquetária
PB	tampão fosfato
PBS	salina tamponada
PVN	núcleo paraventricular do hipotálamo
SNC	sistema nervoso central
TSH	hormônio tireotrófico

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO**..... 19

2 **REVISÃO DE LITERATURA**..... 20

2.1 **Interações entre os sistemas imune e nervoso**..... 20

2.2 **Alergia alimentar**..... 30

2.3 **Vias sensoriais do trato gastrointestinal**..... 38

3 **OBJETIVOS**..... 49

3.1 **Objetivos específicos**..... 49

4 **MATERIAL E MÉTODOS**..... 50

4.1 **Animais**..... 50

4.2 **Procedimentos**..... 50

4.2.1 *Imunização com ovalbumina (OVA)*..... 50

4.2.2 *Teste de preferência*..... 51

4.2.3 *Protocolo de indução de tolerância oral*..... 52

4.2.4 *Tratamento neonatal com capsaicina para destruição das fibras do tipo C*..... 52

4.2.5 *Teste de contorção abdominal para a avaliação da eficiência do tratamento neonatal com capsaicina*..... 52

4.2.6 *Tratamento com o anticorpo anti-IgE*..... 53

4.2.7 *Análise Comportamental*..... 54

4.2.8 *Marcação de ativação celular em núcleos específicos do SNC por meio da avaliação da expressão de c-fos*..... 55

4.2.9 *Hibridização in situ para o Fator Liberador de Corticotrofina (CRF)*..... 57

4.2.10 *Dosagem de corticosterona no soro*..... 58

4.2.11 *Determinação dos níveis de IgG1 específica para OVA no soro*..... 59

4.2.12 *Determinação dos níveis de IgE específica para OVA no soro*..... 60

4.2.13 *Análise Estatística*..... 61

5 **RESULTADOS**..... 62

5.1 *Qual é o comportamento de animais alérgicos frente à possibilidade de ingerir um alimento contendo o antígeno (alérgeno)?*..... 62

5.2 *Outras e quais outras alterações de comportamento poderiam ser ocasionadas pela alergia alimentar?*..... 63

5.3 *Que alterações no sistema nervoso central (SNC) acompanham as mudanças de comportamento observadas em camundongos com alergia alimentar?*..... 65

5.4 *O desenvolvimento da aversão e a ativação do SNC podem ser bloqueados pela indução de tolerância oral?*..... 72

5.5 *Qual o envolvimento da IgE no desenvolvimento da aversão e na ativação do SNC em animais com alergia alimentar?*..... 75

5.6 *De que modo a informação gerada a partir da reação alérgica chega ao SNC? Participação das fibras do tipo C*..... 79

6 **DISCUSSÃO**..... 87

7 **CONCLUSÕES**..... 111

REFERÊNCIAS..... 112

ANEXO..... 127

1 INTRODUÇÃO

A entrada de macromoléculas no organismo através do tubo digestivo pode ter várias repercussões imunológicas. O estudo realizado por Cara (1995) utilizando antígenos presentes na dieta mostrou, de forma interessante, que o sistema imune interfere com o comportamento animal induzindo o desenvolvimento de aversão a uma dieta contendo o antígeno. Desta forma, frente à opção de ingerir água ou uma solução adocicada de clara de ovo, animais não imunizados preferem beber a solução doce, enquanto animais imunizados com ovalbumina (OVA) passam a preterir a solução doce que contém o antígeno, ingerindo preferencialmente água.

Trabalhos como esse remetem, naturalmente, a algumas perguntas: de que forma uma resposta imune desencadeada por antígenos presentes na dieta é capaz de modular o comportamento de um animal? Que tipo de informação é gerada por essa resposta imune? Uma vez gerada esta informação, de que modo ela chega ao sistema nervoso central (SNC) e o que lá ocorre para alterar o comportamento do animal?

O modelo experimental utilizado por Cara (1995) e respostas às perguntas acima formuladas permitem uma discussão conceitual não apenas do papel do sistema imune na fisiologia animal como, também, da relevância da integração dos diferentes sistemas orgânicos na elaboração de respostas adaptativas frente a estímulos provenientes do meio externo. O presente trabalho privilegiará uma abordagem com ênfase nas interações entre os sistemas imune e nervoso com o objetivo de investigar os efeitos da alergia alimentar no sistema nervoso central (SNC) e, deste modo, avançar na tentativa de responder às questões acima delineadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Interações entre os sistemas imune e nervoso

As interações entre mecanismos endócrinos e nervosos e a conseqüente regulação/modulação de várias funções orgânicas são bem conhecidas e amplamente estudadas. Maior atenção tem sido concentrada nos últimos anos à análise das complexas relações existentes entre o sistema imune e o sistema neuro-endócrino. Na verdade, desde o trabalho pioneiro de Selye (1936) sabe-se que o SNC, pela mediação que exerce sobre funções neurovegetativas durante o estresse, é capaz de influenciar respostas orquestradas pelo sistema imune. Este autor, como se sabe, analisou as alterações ocasionadas durante o estresse, entre outras, no tamanho do timo, do baço e dos linfonodos, sabiamente chamadas por ele de síndrome de adaptação geral. No entanto, segundo Ursin (1994), apenas em 1977 surgiu o primeiro trabalho mostrando, de forma inequívoca, que uma situação de estresse de natureza psicológica é capaz de produzir alterações da função imune de maneira independente de hormônios (BARTROP et al., 1977). Nesse trabalho, os autores reportaram a ocorrência de uma redução na função de linfócitos após uma situação de luto (BARTROP et al., 1977). Nesse sentido, em 1979, um grupo de cientistas responsáveis por grande parte dos avanços de conhecimento na área de neuroimunologia, liderado por Branislav D. Jankovic, demonstrou a existência de uma correlação antigênica entre timócitos, linfócitos B e vesículas sinápticas do cérebro de ratos. Especificamente, os autores mostraram nesse trabalho, por intermédio do uso de um soro produzido em coelhos contra vesículas sinápticas de ratos, que este reagia contra timócitos e linfócitos B em ensaios de citotoxicidade e imunofluorescência (JANKOVIC; HORVAT; MITROVIC, 1979). Segundo Blalock (1984) há uma razão bioquímica lógica para

que haja interações entre os sistemas imune e neuro-endócrino. De fato, os sistemas nervoso, endócrino e imune compartilham de receptores para citocinas, neurotransmissores, hormônios e neuropeptídeos. Além disso, produtos originalmente tidos como específicos de cada um destes sistemas coexistem em tecidos linfóide, endócrino e nervoso. Assim, por exemplo, há citocinas sendo produzidas no SNC e também hormônios, tais como ACTH e TSH, sendo sintetizados em células linfóides (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996). A partir destas observações, começa-se a delinear o conceito de que há comunicação e relações entre os sistemas neuro-endócrino e imune que ocorrem em dois sentidos, isto é, tanto mecanismos neuro-endócrinos podem modular a atividade do sistema imune, quanto este pode influenciar a atividade do sistema neuro-endócrino (MADDEN; FELTEN, 1995).

É de se acreditar, portanto, que estímulos elétricos aplicados em áreas específicas do SNC interfiram com diversas respostas do sistema imune. Seguindo essa linha de raciocínio, ratos com eletrodos implantados no hipotálamo lateral e na área tegmental ventral, condicionados à aplicação de uma corrente elétrica por meio do ato de pressionar uma barra, e que tiveram essas áreas do cérebro estimuladas por quatro dias antes da imunização, apresentaram um incremento na resposta humoral específica a hemácias de carneiro (VLAJKOVIC et al., 1993). Esse parâmetro também foi analisado em animais imunizados com albumina sérica bovina (BSA) que tiveram eletrodos implantados nas mesmas regiões do cérebro, as quais foram estimuladas por 21 dias (3 vezes por semana) após a imunização; estes ratos também apresentaram maiores títulos de anticorpos contra BSA do que aqueles observados nos grupos controle e falso estimulado (VLAJKOVIC et al., 1993).

Outra forma de abordagem usada para o estudo das relações entre o SNC e o sistema imune se vale de modelos que envolvem lesões de estruturas específicas do SNC e da avaliação das alterações ocasionadas por estas lesões em parâmetros ligados à atividade do sistema imune (para revisão veja FELTEN et al., 1991). Dessa forma, ratos que tiveram o

locus ceruleus lesionado apresentaram uma menor produção de anticorpos contra BSA e uma redução no tamanho do timo e da população de linfócitos $CD4^+$ no sangue periférico (NIKOLIC; JOVANOVA-NESIC; JANKOVIC, 1993). Além disso, em animais com lesão nessa mesma região verificou-se uma supressão das reações de hipersensibilidade tardia e de Arthus à BSA (JOVANOVA-NESIC; NIKOLIC; JANKOVIC, 1993). Lembra-se, nesse momento, de que o *locus ceruleus* é o núcleo onde se encontra a maior concentração de corpos celulares dos neurônios noradrenérgicos do SNC, situando-se no assoalho do IV ventrículo (FRANKLIN; PAXINOS, 1996). As alterações observadas em fenômenos relacionados à ativação do sistema imune após a lesão deste núcleo sugerem uma estreita relação entre o sistema nervoso simpático e o funcionamento do sistema imune. De fato, há dados anatômicos que sustentam esta sugestão; já se verificou, por exemplo, que órgãos linfóides tais como timo, baço e linfonodos são intensamente inervados por fibras simpáticas (FELTEN, 1993).

Dados obtidos em nosso laboratório também fortalecem a noção de que o SNC influencia parâmetros relacionados ao sistema imune. Assim sendo, foi demonstrado que não apenas estímulos estressores de natureza psicológica (MORGULIS et al., 2004; PALERMO-NETO; DE OLIVEIRA MASSOCO; ROBESPIERRE DE SOUZA, 2003), mas também aqueles de natureza física (PALERMO-NETO; DE OLIVEIRA MASSOCO; ROBESPIERRE DE SOUZA, 2003), são capazes de promover uma redução da fagocitose realizada por macrófagos e de tornar camundongos mais susceptíveis ao desenvolvimento do tumor de Ehrlich. Já em estudo no qual utilizou-se uma reação alérgica pulmonar como modelo experimental, verificou-se que um estressor de natureza física foi capaz de aumentar o número total de células no lavado bronco-alveolar de ratos imunizados e desafiados com OVA (PORTELA et al., 2001). De modo interessante, também verificou-se que a aplicação de estímulos estressores de natureza física em fêmeas prenhes, além de diminuir a resistência da

prole ao tumor de Ehrlich (PALERMO NETO; MASSOCO; FAVARE, 2001), reduziu a capacidade de fagocitar de macrófagos obtidos destes animais (FONSECA; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2002; PALERMO NETO; MASSOCO; FAVARE, 2001).

Passaremos agora a explorar o outro sentido das relações entre o SNC e o sistema imune. Nesse aspecto, respostas imunes e modelos utilizados no estudo da inflamação são capazes de modular ou influenciar a atividade de áreas do sistema nervoso central e, dessa forma, o comportamento animal.

Em estudo conduzido no laboratório de Hugo Oscar Besedovsky, outro pesquisador de grande importância para o estabelecimento deste campo de estudo, demonstrou-se que após a imunização de ratos ocorria um aumento na atividade elétrica de neurônios do hipotálamo ventromedial que correspondia ao momento de pico da produção de anticorpos contra o antígeno (BESEDOVSKY et al., 1977). Posteriormente, outros estudos confirmaram estes achados, contribuindo para o conceito de que a atividade do sistema imune pode influenciar a atividade de áreas específicas do cérebro. Assim sendo, Saphier et al. (1987) realizaram um estudo no qual também avaliaram a atividade elétrica de determinadas regiões do SNC, tais como a área pré-óptica (hipotálamo anterior) e o núcleo paraventricular do hipotálamo, após a imunização de ratos com hemácias de carneiro. A atividade elétrica foi avaliada por meio da implantação de eletrodos nas áreas citadas. Na área pré-óptica registrou-se um aumento da atividade elétrica basal cujo pico ocorreu cinco dias após a imunização, de forma concomitante com o aparecimento de anticorpos específicos no soro. No terceiro e no oitavo dia após a imunização, os autores verificaram uma redução da atividade elétrica nessa área. Já no núcleo paraventricular, observou-se uma redução da atividade elétrica basal nos três primeiros dias após a imunização; a seguir, notou-se o restabelecimento da atividade basal e um aumento de atividade apenas no sexto dia após a imunização. Entre o nono e o décimo dia a atividade em ambas as regiões já se encontrava normal. Em uma re-exposição às hemácias,

verificou-se um aumento da atividade elétrica na área pré-óptica entre o quarto e o nono dia, com pico no sexto dia (SAPHIER et al., 1987).

Dados do grupo de Besedovsky parecem indicar que o aumento da atividade elétrica em áreas hipotalâmicas que se segue à imunização com hemácias de carneiro está relacionado à alterações no metabolismo de noradrenalina. Deste modo, observou-se que houve um decréscimo no conteúdo de noradrenalina no hipotálamo que, mais uma vez, ocorreu de modo concomitante ao pico da produção de anticorpos (BESEDOVSKY et al., 1983). De forma interessante, este trabalho também demonstrou que a redução no conteúdo de noradrenalina no hipotálamo podia ser reproduzida por mediadores solúveis liberados por células do sistema imune ativadas *in vitro* (BESEDOVSKY et al., 1983). Esta última observação fortaleceu o conceito de que alterações no cérebro podem ser provocadas pela ativação do sistema imune. O trabalho de Carlson et al. (1987) relatado pouco depois, além de confirmar os achados do grupo de Besedovsky, chamou a atenção para alterações em um núcleo específico do hipotálamo: o paraventricular. Os resultados demonstraram uma redução na quantidade de noradrenalina, apenas e tão somente no núcleo paraventricular do hipotálamo, no quarto dia após a imunização com hemácias de carneiro. De fato, dois dias antes e oito dias após a imunização não foram verificadas quaisquer alterações no conteúdo deste neurotransmissor. (CARLSON et al., 1987).

Desde 1975, o grupo de Besedovsky já tinha o conhecimento do fato de ser uma resposta imune capaz de alterar os níveis séricos de determinados hormônios, especialmente dos glicocorticóides. Nesse sentido, havia demonstrado que a imunização de ratos e de camundongos com diferentes antígenos levava a um aumento de até três vezes na concentração de corticosterona no sangue (BESEDOVSKY et al., 1975). Dados obtidos um pouco mais adiante reforçaram esta idéia ao mostrar que mediadores solúveis liberados por

células do sistema imune ativadas *in vitro* também eram capazes de aumentar os níveis séricos de corticosterona de ratos (BESEDOVSKY; DEL REY; SORKIN, 1981).

O conjunto de evidências obtidas pelo grupo de Besedovsky levava a crer que a ativação do sistema imune e a conseqüente produção de mediadores solúveis provocavam uma resposta endócrina desencadeada pelas ações destes mediadores no SNC. Talvez, a última peça para que este quebra-cabeça fosse definitivamente resolvido tenha surgido com a descoberta, pelo grupo de Wylie Vale, do fator liberador de corticotrofina (CRF) e da sua importância na ativação do eixo hipotálamo-pituitária(hipófise)-adrenal (HPA), que leva à produção de glicocorticóides (RIVIER et al., 1982; VALE et al., 1981). De fato, alguns anos depois, foi demonstrado pelo próprio grupo do Besedovsky que a injeção de interleucina 1 (IL-1), substância liberada, por exemplo, por macrófagos ativados, é capaz de promover um aumento dos níveis plasmáticos de ACTH e, também, de corticosterona via ativação do eixo HPA de ratos e camundongos (BESEDOVSKY et al., 1986). Também demonstrou-se que a ação da IL-1 se fazia por meio da ativação de neurônios produtores de CRF (BERKENBOSCH et al., 1987).

Posteriormente, foi descoberto que a injeção intraperitoneal (IP) de IL-1 também era capaz de provocar um decréscimo no conteúdo de noradrenalina (NE) no hipotálamo de ratos (KABIERSCH et al., 1988). Estes autores avaliaram também um metabólito da noradrenalina, o MHPG; não só o conteúdo deste metabólito no hipotálamo, como também a razão MHPG/NE estavam aumentados após a injeção de IL-1. Este dado sugere que a redução observada no conteúdo de NE seja conseqüência de um efeito estimulante da IL-1 sobre o metabolismo desse neurotransmissor. Outros trabalhos (CHULUYAN et al., 1992; DUNN, 1988) correlacionaram alterações no metabolismo de noradrenalina (NE) com a ativação do eixo HPA, mostrando que o mecanismo pelo qual a IL-1 ativa tal eixo envolve modificações no metabolismo da NE hipotalâmica.

A ativação do eixo HPA é entendida como um mecanismo de regulação no qual os hormônios liberados exercem um papel modulador de diversas funções orgânicas, entre as quais aquela de controlar um processo inflamatório e/ou infeccioso em curso, inibindo a produção da mesma IL-1 (DUNN, 1995).

A ativação do eixo HPA e a conseqüente liberação de ACTH e de glicocorticóides fazem parte das respostas neurovegetativas ligadas às situações de estresse e de ansiedade (RIVIER; VALE, 1983). A ativação do mesmo eixo pela IL-1, que pode ser produzida durante um processo inflamatório ou infeccioso, passa então, a ser considerada como parte de uma situação de estresse ou ansiedade, de forma semelhante àquela desencadeada por estímulos ambientais ou físicos (DUNN, 1995).

De fato, a administração de IL-1 em camundongos e ratos é capaz de promover diversas alterações comportamentais. Spadaro e Dunn (1990) verificaram que após 20 minutos da administração intracerebroventricular (ICV) de IL-1 camundongos tiveram a atividade exploratória diminuída. Nestas condições, os parâmetros relativos à atividade geral e *grooming* não sofreram qualquer alteração (SPADARO; DUNN, 1990). Outra alteração comportamental observada após a injeção de IL-1 foi a presença de anorexia (HELLERSTEIN et al., 1989). De fato, a administração IP ou ICV de IL-1 em ratos foi capaz de suprimir um comportamento operante recompensado com alimento. Observou-se que essa ação dependia tanto da ativação de receptores para IL-1 presentes no SNC quanto daqueles presentes na periferia. Assim, quando um antagonista de receptores de IL-1 era injetado pela mesma via e antes da IL-1, os efeitos da interleucina eram bloqueados. Por outro lado, observou-se que quando a via de administração do antagonista era diferente da utilizada para a injeção de IL-1, o bloqueio era parcial ou não ocorria (KENT et al., 1996).

O conjunto das alterações comportamentais observadas em animais após a injeção de IL-1 ou LPS foi denominado de comportamento doentio (*sickness behavior*) (KENT et al.,

1992). Importante salientar, neste momento, que o comportamento doentio não deve ser compreendido como um estado de depressão inespecífico e/ou generalizado do SNC, um efeito indesejável da doença, mas sim como uma estratégia altamente organizada que visa a adaptação do animal ao estímulo (no caso, uma infecção) e que, em última instância, pode ser crítico para a sua sobrevivência (HART, 1988).

A forma exata pela qual a IL-1 modula o comportamento animal não está totalmente esclarecida. Os dados de literatura são um tanto quanto contraditórios em alguns aspectos. Assim, há trabalhos mostrando que as alterações comportamentais são dependentes do CRF produzido no hipotálamo (DUNN; ANTOON; CHAPMAN, 1991) e outros negando tal fato (BLUTHE et al., 1992; SPADARO; DUNN, 1990). Há, também, trabalhos demonstrando a participação das prostaglandinas nas alterações comportamentais ocasionadas pela injeção de IL-1 (BLUTHE et al., 1992; HELLERSTEIN et al., 1989). Ademais, mostrou-se que as administrações de LPS e de alguns vírus, como o da doença de *newcastle*, mimetizam as alterações comportamentais, neuroquímicas e hormonais observadas após a administração IP ou ICV de IL-1 (BESEDOVSKY; DEL REY, 1989). É muito provável que, nessas situações, diversos componentes atuem em conjunto na mediação dos eventos aqui abordados.

Além da administração de IL-1 ou LPS, outros modelos têm sido utilizados para o estudo das influências exercidas pelo sistema imune sobre o SNC. O condicionamento de eventos relacionados à resposta imune é um deles (para revisão veja ADER; COHEN, 1991). Devido à sua ação imunossupressora e/ou devido ao desconforto que causa no trato gastrointestinal, animais “normais” evitam consumir soluções contendo ciclofosfamida bem como soluções doces que tenham sido associadas a essa droga. Entretanto, animais de uma linhagem de camundongos selecionada para manifestar uma doença autoimune, o lupus sistêmico, ingerem voluntariamente maiores quantidades de uma solução de leite achocolatado com ciclofosfamida do que os seus controles congênicos sadios. Além disso,

mostrou-se que esses animais bebem dessa solução a quantidade suficiente para reverter a linfoadenopatia que possuem e, também, para reduzir o alto título de anticorpos apresentado por eles (ADER, 1990). Esses achados são compatíveis com dados anteriores do mesmo autor, nos quais se observou não ser possível condicionar os animais que apresentam o lupus a ingerirem menores quantidades de soluções com sacarina após esse estímulo ter sido pareado com o outro, não condicionado: a injeção de ciclofosfamida. Exatamente o inverso do que ocorre com animais normais (ADER; GROTA; COHEN, 1987). É importante salientar que esses dados não têm relação com uma possível deficiência de aprendizado nos animais dessa linhagem, já que eles passam a evitar a solução doce caso ela seja associada ao cloreto de lítio. Com relação ao maior consumo da solução achocolatada com ciclofosfamida e a ausência da resposta condicionada nos animais que apresentam o lupus, o autor sugere haver, por parte desses camundongos, a capacidade de reconhecer os efeitos imunossupressivos exercidos pela droga. Assim, tendo associado o sabor da solução achocolatada aos efeitos imunossupressivos da ciclofosfamida, os animais se comportam de modo a corrigir as alterações imunológicas que apresentam. O autor sugere, então, que o SNC é capaz de receber e processar as informações de um sistema imune “desregulado” de tal forma a modular o comportamento dos camundongos.

Em trabalho publicado em 1988, Markovic e colaboradores, por intermédio de outro modelo, também apresentaram resultados que, segundo os mesmos, demonstram a capacidade de uma resposta imune atuar como aferência do SNC, o qual, a partir daí, modularia o comportamento dos animais. Assim, animais imunizados com OVA foram submetidos a um esquema de condicionamento no qual o estímulo não condicionado - uma injeção de OVA capaz de induzir choque anafilático - era apresentado juntamente com um estímulo condicionado - a ingestão de uma solução adocicada com sacarina. Vinte e quatro horas depois, os animais eram submetidos a um teste de preferência com dois bebedouros, um

contendo água e o outro contendo a mesma solução adocicada com sacarina. Os animais imunizados submetidos ao condicionamento passaram a rejeitar a solução com sacarina, enquanto os do grupo controle preferiram ingerir a solução adocicada (MARKOVIC et al., 1988). O condicionamento da resposta foi mantido durante os seis dias consecutivos em que os animais passaram pelo teste de preferência. Em trabalho realizado pelo mesmo grupo, foi demonstrado que a dose de antígeno utilizada para provocar o choque anafilático e os sinais clínicos do mesmo (hematócrito e temperatura retal) correlacionaram-se de modo positivo com a porcentagem de preferência à solução com sacarina, ou seja, a maior dose de antígeno, que provocou os sinais clínicos mais evidentes, foi a dose que levou à menor porcentagem de preferência pela solução com sacarina (DJURIC et al., 1988).

Estudos envolvendo respostas condicionadas também exploraram o sentido inverso das relações entre os sistemas imune e nervoso, ou seja, já se demonstrou também que respostas imunes podem ser condicionadas. Talvez, o estudo pioneiro nesta área tenha sido aquele relatado por Ader e Cohen em 1975. Neste trabalho os autores demonstraram, em ratos imunizados com hemácias de carneiro, uma supressão condicionada da produção de anticorpos após a associação de ciclofosfamida (estímulo não condicionado que de fato causa imunossupressão) com uma solução adocicada com sacarina (ADER; COHEN, 1975). De modo muito interessante, outros trabalhos têm demonstrado que também é possível o condicionamento da produção de anticorpos. Assim sendo, a re-exposição à sacarina, anteriormente associada ao antígeno no momento da primeira imunização, foi capaz de induzir um aumento na produção de anticorpos específicos em ratos (ALVAREZ-BORDA et al., 1995). A magnitude da resposta foi semelhante àquela apresentada pelos animais que foram de fato submetidos à uma segunda imunização (*booster*) (ALVAREZ-BORDA et al., 1995). Este experimento foi replicado por outro grupo, reforçando a idéia de que o condicionamento pode levar à produção de anticorpos específicos independentemente da

presença do antígeno (MADDEN et al., 2001). Ademais, foi relatado que a lesão do córtex insular ou da amígdala impede a produção condicionada de anticorpos (RAMIREZ-AMAYA; BERMUDEZ-RATTONI, 1999). Por fim, já foi demonstrado que a desgranulação de mastócitos também pode ocorrer de modo condicionado. Assim, em ratos sensibilizados com OVA e re-expostos a um sinal visual anteriormente associado ao desafio antigênico verificou-se uma quantidade de protease de mastócitos no soro semelhante àquela apresentada por animais que de fato receberam o desafio com o antígeno (MACQUEEN et al., 1989). A desgranulação condicionada de mastócitos pode ser elemento chave para explicar a ocorrência do condicionamento de comportamentos associados a uma reação alérgica pulmonar (PALERMO-NETO; GUIMARAES, 2000).

Os dados de literatura levantam, assim, sólidas evidências comportamentais e bioquímicas que suportam a hipótese de haver uma comunicação direta e bidirecional entre o SNC e o sistema imune; contribuindo deste modo, para o melhor entendimento da regulação/modulação das respostas adaptativas aos estímulos com os quais os animais se deparam constantemente.

2.2 Alergia alimentar

Reações adversas ocasionadas por ingestão de alimentos são descritas desde os primeiros séculos da era cristã (COHEN; SAAVEDRA-DELGADO, 1989). Nos dias de hoje, entende-se que as reações adversas ocasionadas pela ingestão de alimentos consistem uma série ampla de fenômenos que nem sempre compartilham dos mecanismos pelos quais geram a sintomatologia associada a eles. Entre esses fenômenos está a alergia alimentar ou hipersensibilidade alimentar, cujos mecanismos fisiopatológicos envolvem o sistema imune.

Segundo Sampson (1999), as primeiras descrições de reações adversas causadas pela alergia em indivíduos que ingeriram ovos e peixes datam do século XVI e XVII, respectivamente. Desde então, a medicina vem se esforçando para aprimorar os métodos usados para o diagnóstico da alergia alimentar.

Curiosamente, nas últimas duas ou três décadas, devido ao enorme aumento da sua prevalência, a alergia alimentar (e as doenças alérgicas de modo geral) transformou-se em relevante problema de saúde pública. Hoje em dia estima-se que a prevalência da alergia alimentar seja de até 8% em crianças e de até 2% em adultos (SAMPSON, 1999; SAMPSON; BURKS, 1996). Além disso, nos últimos anos, a resposta alérgica a alimentos tem sido apontada como a principal causa de reações anafiláticas atendidas nos setores de emergência de hospitais dos EUA e do Reino Unido (SAMPSON, 2000; WUTHRICH; BALLMER-WEBER, 2001).

As reações de hipersensibilidade imediata ou do tipo I, também ditas reações alérgicas, são em última instância conseqüência da exposição a um antígeno que acaba por gerar uma resposta imune orquestrada fundamentalmente por células Th2. As células Th2 são responsáveis pela produção de citocinas tais como IL-4, IL-5, IL-13 e também determinam a produção de IgE pelas células B. A IgE, assim como a IgG1 em camundongos e a IgG4 em humanos, é dita um anticorpo anafilático e liga-se à membrana dos mastócitos por meio do seu receptor de alta afinidade (FcεRI). Quando um indivíduo que desenvolveu uma resposta deste tipo é exposto pela segunda vez ao mesmo antígeno, ocorre uma ligação cruzada entre este antígeno e duas moléculas de IgE presas à membrana do mastócito e, como conseqüência, há a desgranulação desta célula. É o que chamamos de fase imediata da reação de hipersensibilidade, portanto, fundamentalmente mediada pelos mastócitos e pela IgE. A desgranulação dos mastócitos leva à síntese e/ou liberação de mediadores ditos pré-formados (histamina, serotonina), mediadores lipídicos (prostaglandinas e leucotrienos) e diversas

citocinas. Além da fase imediata, há também a fase tardia da reação de hipersensibilidade, mediada basicamente pelos eosinófilos e por citocinas do padrão Th2 (SENGOKU et al., 2001). Do ponto de vista das reações alérgicas que ocorrem no trato gastrointestinal (GI) em decorrência da ingestão de alimentos faz-se, tradicionalmente, uma divisão das doenças cuja fisiopatologia depende mais ou menos da presença de IgE (ROTHENBERG et al., 2001; SAMPSON, 1999). Aqui, daremos ênfase àquelas que são mais dependentes de IgE e nas quais há menor participação dos eosinófilos.

Reações alérgicas provocadas por alimentos podem ser responsáveis por uma série de sintomas envolvendo a pele (prurido, eczema), o trato gastrointestinal (diarréia, dor abdominal, náusea) e as vias aéreas (rinite, coriza) (CROWE; PERDUE, 1992b; SAMPSON, 1999). Boa parte dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos na sintomatologia que decorre da alergia alimentar é bastante estudada e bem conhecida. Nesse sentido, a desgranulação de mastócitos - que no intestino estão presentes principalmente na lâmina própria e na submucosa - 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 diminução da integridade da barreira epitelial (BISCHOFF; MAYER; MANNS, 2000; YU; PERDUE, 2001). De fato, em ratos alérgicos à OVA, observou-se edema dos vilos intestinais, além de uma redução da absorção de íons (Na^+, K^+) e de água quarenta minutos depois do desafio com OVA feito por infusão em uma porção isolada do intestino (PERDUE; CHUNG; GALL, 1984). Essas alterações estavam associadas à redução da concentração de histamina na mucosa do intestino e ao aumento da concentração desse mediador na luz intestinal (PERDUE; CHUNG; GALL, 1984). O uso de doxantrazole – que impede a desgranulação de mastócitos de mucosa e de serosa – mas não o uso de cromoglicato de sódio – que impede apenas a desgranulação dos mastócitos de serosa – bloqueou as alterações provocadas pelo desafio antigênico, evidenciando-se assim, a

participação dos mastócitos de mucosa (CROWE; PERDUE, 1992a; PERDUE; GALL, 1985). Além das alterações relacionadas à absorção, também verificou-se em animais alérgicos desafiados com o antígeno um aumento da secreção de íons cloreto pelo epitélio intestinal que foi prevenido por meio do tratamento com antagonistas de receptores de serotonina e histamina, inibidores da cicloxigenase e estabilizadores de mastócitos (CATTO-SMITH et al., 1989; STENTON; VLIAGOFTIS; BEFUS, 1998). A integridade da barreira epitelial também parece estar comprometida em animais com hipersensibilidade alimentar, fato que pode facilitar a penetração de outros antígenos. Desse modo, por meio da análise do trânsito de moléculas marcadas (tais como ^{51}Cr-EDTA), observou-se uma maior penetração de partículas pelo epitélio intestinal após o desafio com o antígeno (CROWE; PERDUE, 1992b). Este fato vem acompanhado de altas concentrações de protease de mastócito (RMCP II) no soro (CROWE; PERDUE, 1992b). Por fim, sabe-se também que o desafio antigênico no estômago de animais sensibilizados com OVA leva a um aumento da secreção de ácido gástrico, fato este revertido com o uso de cimetidina (antagonista do receptor de histamina H2) e de cromoglicato de sódio (STENTON; VLIAGOFTIS; BEFUS, 1998).

Outros pesquisadores procuraram entender os sintomas observados na pele em decorrência de reações alérgicas oriundas da ingestão de alimentos. Desta forma, verificou-se que pelo menos um terço dos camundongos sensibilizados por via oral com leite bovino ou amendoim apresentou erupções na pele (eczema) após consumir o antígeno com o qual foram imunizados (LI et al., 2001). A análise histológica das lesões de pele revelou a presença de linfócitos T CD4^{+}, eosinófilos e grande número de mastócitos, além de maior porcentagem de mastócitos desgranulados. Ademais, constatou-se a presença de RNAm para IL-5 e IL-13 somente na pele dos animais que desenvolveram a dermatite atópica; os quais também apresentaram altos níveis de IgE no soro (LI et al., 2001).

Apesar do conhecimento acumulado a respeito dos mecanismos que envolvem diferentes aspectos da sintomatologia decorrente das reações alérgicas após a ingestão do antígeno, pouco se sabe a respeito dos efeitos da alergia alimentar sobre o funcionamento do sistema nervoso central (SNC). Alguns autores discutiram a possibilidade de ser a resposta alérgica a alimentos capaz de levar a mudanças de comportamento (ATKINS, 1986; CRAYTON, 1986; GETTIS, 1989). A maior parte desses artigos consiste em pequenas coleções de relatos de casos clínicos nos quais o médico responsável por um paciente ou um pequeno grupo de pacientes argumenta em favor da ocorrência de um tipo de distúrbio de comportamento em função da ingestão de certos alimentos. O principal argumento utilizado para fundamentar esse tipo de sugestão é a remissão da alteração comportamental frente à retirada do alimento da dieta. Como bem apontado em um dos artigos (ATKINS, 1986), os sintomas relatados são subjetivos e o diagnóstico de alergia alimentar, quando presente, é questionável. Um estudo que buscou correlacionar o diagnóstico de desordens psiquiátricas em pacientes humanos com alergia alimentar identificou maior prevalência de ansiedade e depressão nestes pacientes do que naqueles controles ditos não saudáveis com intolerância à lactose ou naqueles controles saudáveis (ADDOLORATO et al., 1998). No entanto, diversos autores argumentam que a associação entre desordens psiquiátricas e doenças alérgicas se deveria mais a um artefato, apontando dados por meio dos quais não foi possível verificar tal associação (PEARSON; RIX; BENTLEY, 1983; PEVELER et al., 1996). Neste contexto, a falta de evidências claras de que uma reação alérgica seja capaz de afetar diretamente a função do SNC e/ou o comportamento tem sido um dos principais argumentos usados para contestar a existência de associações entre doenças alérgicas e sintomas de caráter psicológico (PEARSON, 1988).

Uma abordagem que privilegie as interações entre os sistemas imune e nervoso utilizando um modelo de alergia alimentar poderia, assim, fornecer o elo que falta na

investigação da ocorrência de sintomas psicológicos em pacientes alérgicos. Nesse sentido, o modelo proposto por Cara, Conde e Vaz (1994) para investigar o papel do sistema imune na seleção de dietas em camundongos quer parecer-nos apropriado. Como já mencionado na introdução, os dados obtidos por Cara, Conde e Vaz (1994) mostram que uma resposta imune decorrente de um antígeno presente na dieta pode alterar a preferência alimentar de animais imunizados com esse antígeno. Dessa forma, enquanto animais não imunizados têm uma preferência natural por uma solução adocicada de clara de ovo, os imunizados apresentam uma alteração de preferência ao sabor, passando a ingerir preferencialmente água, isto é, preterindo a solução adocicada que contém o antígeno com o qual foram imunizados.

O trabalho de Cara (1995) procurou caracterizar essa mudança de comportamento e estudar os possíveis mecanismos imunológicos envolvidos com o desenvolvimento da aversão ao antígeno presente na dieta. Os resultados mostraram que há especificidade nesta aversão à ingestão de antígenos por animais imunizados. Assim, enquanto camundongos imunizados com ovalbumina (OVA) apresentaram altos títulos de anticorpos específicos para a OVA e rejeitaram consumir a solução adocicada de clara, os animais imunizados com gama globulina bovina (BGG), que apresentaram altos títulos de anticorpos anti-BGG, não produziram anticorpos específicos para a OVA e não rejeitaram consumir a solução adocicada de clara de ovo. Ainda, em consenso com relação à especificidade na aversão, animais imunizados com DNP_2OVA (dinitrofenil-OVA contendo, em média, dois radicais dinitrofenil por molécula) produziram anticorpos específicos para a OVA em títulos semelhantes a de animais imunizados com OVA nativa e apresentaram a mesma aversão à solução adocicada de clara de ovo. Por outro lado, camundongos imunizados com $DNP_{12}OVA$ (conjugado, contendo em média, 12 radicais dinitrofenil por molécula) não produziram anticorpos específicos para a OVA e também não apresentaram aversão à solução adocicada de clara de ovo.

Como se pode notar, parece haver uma estreita relação entre a produção de anticorpos específicos ao antígeno e a aversão que se estabelece. De fato, o trabalho de Cara, Conde e Vaz (1994) demonstrou que a aversão surgiu concomitantemente ao aparecimento dos anticorpos específicos no soro dos animais imunizados, ou seja, 14 dias após a imunização primária. Confirmando a importância dos anticorpos específicos para o desenvolvimento da aversão à solução adocicada, Cara, Conde e Vaz (1994) observaram que animais não imunizados apresentaram uma rejeição à ingestão de clara adocicada 3 horas após receberem um *pool* de soro proveniente de animais imunizados com 100 μg de OVA.

Investigando as conseqüências gastrointestinais da ingestão do antígeno por animais imunizados, Cara (1995) demonstrou que durante as três primeiras horas em que esses animais ingeriam a solução de clara de ovo ocorria, na mucosa das porções iniciais do intestino, um aumento de permeabilidade vascular detectado pelo extravasamento de azul de Evans. Esse aumento de permeabilidade no intestino era semelhante ao que ocorria em animais que recebiam 10 mg de OVA por gavagem.

Tratamentos farmacológicos com 70 mg/Kg de NDGA (um inibidor da cicloxigenase e lipoxigenase) ou com a associação de 3 mg/Kg de mepiramina (antagonista de receptores H1) e 2,5 mg/Kg de metisergide (antagonista de receptores 1 e 2 de serotonina) foram capazes de evitar o aumento de permeabilidade vascular observado nos animais imunizados que ingeriram o antígeno. Contudo, os mesmos tratamentos não foram capazes de fazer com que os animais imunizados voltassem a ingerir preferencialmente a solução adocicada de clara de ovo (CARA ,1995).

Buscando avaliar o envolvimento de fenômenos tais como dor ou náusea no desenvolvimento da alteração de preferência ao sabor, Cara (1995) também tratou os animais imunizados com 2 mg/Kg de indometacina (inibidor da cicloxigenase), com 10 mg/kg de dipirona (antiálgico) ou com 0,2 mg/Kg de ondansetron (antagonista de receptores 5-HT_3).

Nenhum desses tratamentos foi capaz de fazer com que os camundongos imunizados ingerissem maiores quantidades de solução adocicada de clara de ovo. Nesse sentido, o único tratamento capaz de evitar a alteração de preferência ao sabor foi aquele realizado com 0,4 mg/kg de dexametasona. No entanto, este efeito foi observado apenas até a sexta hora do teste de preferência (CARA; CONDE; VAZ, 1997).

Em trabalho de mestrado realizado pelo mesmo grupo em Belo Horizonte, Andrade (1999) pesquisou o papel dos mastócitos e dos mediadores liberados por eles na formação do edema em baço, rim, pulmão, estômago e intestino delgado (duodeno e jejuno) de animais *germ free* imunizados com OVA. Para tanto, avaliou o extravasamento do corante azul de Evans após a injeção intravenosa do antígeno e do corante. Os resultados mostraram um aumento de permeabilidade vascular apenas no duodeno e no jejuno proximal de animais imunizados. Nenhuma alteração na permeabilidade vascular foi verificada nos animais não imunizados. No caso de camundongos convencionais, verificou-se nos animais imunizados um padrão muito semelhante, isto é, um aumento de permeabilidade vascular apenas no estômago e no duodeno. A autora chama a atenção para o fato de que, mesmo com a injeção sistêmica do antígeno, observou-se aumento de permeabilidade vascular apenas nas porções iniciais do trato gastrointestinal.

A presença do edema nos animais que rejeitaram a solução adocicada de clara de ovo levou Andrade (1999) a pesquisar, também, possíveis alterações histológicas que eventualmente acompanhassem o desenvolvimento de aversão à dieta contendo o antígeno em camundongos sensibilizados com OVA. No entanto, não foi possível detectar quaisquer alterações na altura dos vilos, na espessura total da mucosa e na profundidade das criptas, tanto no duodeno como no jejuno, após 2 ou 24 horas em que os animais convencionais tiveram a opção de ingerir água ou solução adocicada de clara. Também não se observaram alterações histológicas dignas de nota na língua dos animais que rejeitaram a solução de clara.

Apenas foi possível notar uma diminuição da altura dos vilos intestinais nos animais convencionais imunizados que não tiveram outra opção de ingestão líquida que não fosse a solução de clara por dez dias.

Importante citar que os animais consumiram a mesma quantidade de clara quando havia opção pela água e quando não havia qualquer outra fonte líquida disponível para ingestão (Andrade 1999); em outras palavras, os camundongos reduziram a quantidade de líquido ingerido em 70 ou 80% mas não beberam da solução contendo o antígeno.

Cara (1995) também mostrou que esta resposta pode ser condicionada. Desse modo, os animais imunizados submetidos ao teste de preferência passam a evitar a solução adocicada mesmo na ausência do antígeno. No entanto, o condicionamento era transitório, mantendo-se por apenas um dia.

2.3 Vias sensoriais do trato gastrointestinal

Os livros texto de fisiologia e farmacologia costumam dividir o sistema nervoso autônomo em dois subgrupos: simpático e parassimpático. A esse sistema deve-se o controle do comportamento motor da musculatura lisa das vísceras e dos vasos sanguíneos, além do coração e de glândulas. No entanto, Langley, pesquisador inglês que primeiro conceituou o sistema nervoso autônomo, não propôs uma divisão do sistema nervoso autônomo em apenas dois subgrupos. De fato, além do simpático e do parassimpático, ele propõe um terceiro componente: o sistema nervoso entérico (LANGLEY, 1921). Langley tinha razões de cunho anatômico e funcional para propor tal divisão. As razões anatômicas diziam respeito à enorme diferença numérica entre as fibras provenientes do SNC que chegam ao intestino (fibras pré-ganglionares que constituem ramificações do nervo vago) e as fibras nervosas que podem ser

encontradas no intestino. Estima-se haver algo em torno de duas mil fibras pré-ganglionares do nervo vago na região em que ocorre a inervação do intestino. Enquanto isso, as estimativas apontam a presença de cerca de cem milhões de células nervosas no instestino delgado de seres humanos (GERSHON, 1998). Langley já suspeitava ser improvável associar tal número de células nervosas presentes no intestino às ramificações das fibras provenientes do nervo vago. Mais plausível seria considerar a possibilidade de haver um sistema nervoso intrínseco ao intestino. As razões de cunho funcional vinham de experimentos realizados por Trendelenburg em 1917. Nestes estudos, ele investigou a reação do intestino a partir de estímulos que eram provocados no lúmen do mesmo - uma tentativa elegante de simular os efeitos causados pelo conteúdo intestinal em sua parede. Deste modo, o pesquisador aumentou a pressão interna da porção isolada do intestino e, em seguida, observou uma resposta motora cuja reprodutibilidade chamava a atenção. O intestino exibia contrações musculares muito bem coordenadas e em forma de ondas; contração oral ao estímulo e relaxamento anal que tinham, como claro intuito, promover a propulsão do conteúdo intestinal em sentido único e em direção ao ânus. O surpreendente é que este reflexo podia ser observado em um segmento de intestino totalmente isolado do corpo do animal. Ele trabalhava com preparações de órgãos isolados. Trendelenburg[1] (1917 apud GERSHON, 1998) foi quem introduziu o termo reflexo peristáltico, e que é utilizado até hoje. Começava então, a surgir a idéia de que o trato gastrointestinal possuia um sistema nervoso intrínseco capaz de executar funções independentes de sinais ou comandos provenientes do SNC. Mais do que isto, esses experimentos já esboçavam o fato de que o sistema nervoso entérico era capaz de perceber estímulos sensoriais e, a partir deles, elaborar uma resposta motora sem o auxílio de qualquer tipo de processamento de informações por parte do SNC.

[1] TRENDELEMBURG, P. Physiologische und pharmakologische versuche über die dünndarmperistaltik. Naunyn-Schmiedeberg's. **Arch. Pharmac.,** v. 81, p. 55-129, 1917.

Os conceitos propostos por Langley, no entanto, parecem não ter ganho muita atenção do meio acadêmico. O neurocientista Michael D. Gershon, ao publicar em 1998 um livro entitulado *The second brain "gut instinct"*, é um dos responsáveis por tentar resgatar estes conceitos e também a relevância do sistema nervoso entérico. Segundo ele, o sistema nervoso entérico é composto basicamente por dois plexos. O primeiro a ser descoberto, e o maior deles, é o plexo mioentérico (plexo de Auerbach), situado entre as duas camadas musculares que fazem parte do intestino. O segundo, é o plexo submucoso (plexo de Meissner) que se situa, obviamente, na camada submucosa do intestino. Ambos plexos possuem corpos de células nervosas que se organizam em gânglios e possuem neurônios sensitivos, motores, secretomotores e interneurônios (GERSHON, 1998). Em função da sua importância para este trabalho, serão mais analisadas as informações referentes aos neurônios aferentes intrínsecos, os sensitivos.

O reflexo peristáltico que ocorre quando se submete a parede do intestino à determinada pressão mais uma vez teve papel importante na descoberta de nervos sensitivos intrínsecos na submucosa desse órgão. Nesse sentido, o trabalho realizado em 1958 por Edith Bülbring e Lin foi determinante. A idéia lançada por eles era de que a serotonina liberada por células enterocromafins, as quais funcionariam como sensores de pressão, estimulava nervos sensitivos presentes no intestino, permitindo a ocorrência do reflexo peristáltico (BULBRING; LIN, 1958).

Bem mais tarde, o gupo liderado por Gershon voltou a estudar a participação dos neurônios aferentes intrínsecos nas respostas que seguiam a aplicação de um estímulo na mucosa intestinal. Esses estudos demonstraram que após a aplicação do estímulo à mucosa, havia uma intensa ativação de neurônios presentes tanto no plexo submucoso quanto no plexo mioentérico (KIRCHGESSNER; GERSHON, 1988). Essa ativação também foi avaliada por meio da expressão do gene *c-fos* (KIRCHGESSNER; TAMIR; GERSHON, 1992). Os

resultados do grupo de Gershon também mostraram que, quando era realizado um bloqueio da transmissão sináptica, a ativação ficava restrita aos corpos celulares de neurônios localizados no plexo submucoso e apenas nas proximidades da região que havia recebido o estímulo (GERSHON, 1998). Os dados sugeriam ser o bloqueio da transmissão sináptica capaz de evitar que a informação captada pelos nervos presentes no plexo submucoso passasse adiante e chegasse até os neurônios do plexo mioentérico. A hipótese lançada por Edith Bülbring, ainda antes dos anos 60, parece estar correta; não só quanto à presença de neurônios sensitivos intrínsecos mas, também, como veremos adiante, quanto à participação da serotonina na percepção de estímulos aplicados à mucosa.

Nos últimos anos, vários estudos têm sido realizados na tentativa de melhor caracterizar a natureza dos neurônios aferentes primários intrínsecos, incluindo-se aqui seu modo de atuação. Esses estudos envolveram análises morfológicas, eletrofisiológicas e técnicas de imunoistoquímica (CLERC et al., 1998; FURNESS et al., 1998; KIRCHGESSNER; TAMIR; GERSHON, 1992). Em trabalho realizado em 1992, Kirchgessner, Tamir e Gershon (1992) demonstraram que os neurônios da camada submucosa, os quais expressam *c-fos* quando há estímulo mecânico da mucosa, apresentam imunorreatividade para a substância P. Em estudos com traçadores anterógrados observou-se que esses neurônios apresentam projeções que se dirigem à mucosa e também ao plexo mioentérico (KIRCHGESSNER; GERSHON, 1988). Tais neurônios foram observados tanto no íleo quanto no duodeno (CLERC et al., 1998). Os neurônios aferentes primários intrínsecos também estão presentes no plexo mioentérico de duodeno e íleo. Essas células apresentam projeções que correm em direção a outras células nervosas no próprio plexo mioentérico, além de estarem presentes no plexo submucoso e na mucosa. No íleo, grande parte desses neurônios também apresenta imunorreatividade para a substância P e para a

colina acetiltransferase. Já no duodeno, quase não se observou presença de imunorreatividade para a substância P (CLERC et al., 1998).

Morfologicamente, os neurônios aferentes primários intrínsecos são classificados como neurônios tipo II de Dogiel (FURNESS et al., 1998). Em 1899, quando propôs essa classificação, Dogiel descreveu os neurônios do tipo II como sendo aqueles em que se encontrava a característica particular de possuir múltiplos axônios. É exatamente por esse motivo que, em estudos utilizando transporte axonal anterógrado, pode-se observar diversas projeções partindo dessas células. Essa particularidade morfológica permite aos neurônios aferentes primários intrínsecos constituírem uma imensa rede de transmissão de informações ao longo do intestino.

Eletrofisiologicamente, os neurônios aferentes primários intrínsecos são classificados como sendo do tipo AH. Esses neurônios caracterizam-se por apresentar um amplo potencial de ação com uma inflexão na fase de repolarização, seguido de dois potenciais hiperpolarizantes: um imediato e um tardio. O tardio é a característica eletrofisiológica que de fato determina a classificação dos neurônios aferentes primários intrínsecos em neurônios do tipo AH. Esse potencial hiperpolarizante tardio ocorre, principalmente, devido à saída de íons potássio através de um canal de potássio dependente de cálcio (gK_{CA}) (FURNESS et al., 1998).

A transmissão sináptica excitatória realizada por esses neurônios pode ocorrer de duas formas: potenciais pós-sinápticos rápidos ou lentos. Os potenciais excitatórios pós-sinápticos lentos ocorrem pela inibição da condutância de potássio através de canais entre os quais estão aqueles envolvidos com o potencial hiperpolarizante tardio. Essas correntes de potássio reduzem a excitabilidade dos neurônios, restringindo os disparos dos potenciais de ação em resposta à despolarização da membrana neuronal. Neurônios, nesse estado, são ditos de rápida acomodação. A inibição da abertura desses canais liberta os neurônios dessa restrição e os

coloca em um estado de lenta acomodação (KUNZE et al., 1997). A transmissão mediada pelos potenciais lentos parece ocorrer devido à ligação de acetilcolina em receptores muscarínicos e, também, pela ligação de substância P nos receptores NK1 ou NK3 (FURNESS et al., 1998). O potencial rápido parece ser mediado pela ligação de acetilcolina nos receptores nicotínicos. Enquanto o potencial rápido dura de 20 a 50 milisegundos, o potencial lento permite que os impulsos durem mais de dois segundos.

Sem dúvida alguma, no intestino, além das fibras aferentes primárias intrínsecas, há também fibras aferentes extrínsecas. Estas fibras são responsáveis por levar informações percebidas no intestino (e em outras vísceras) até o sistema nervoso central. Assim, existem fibras aferentes derivadas do nervo vago e há também fibras aferentes espinhais. Os corpos celulares das fibras aferentes vagais localizam-se no gânglio nodoso ou inferior, próximo ao crânio (CERVERO, 1994). A informação levada por essas fibras entra no SNC por meio de conexões com o núcleo do trato solitário (NTS). Os corpos celulares dos neurônios aferentes espinhais encontram-se no gânglio da raiz dorsal e seus processos terminam no corno dorsal da medula espinhal, onde fazem conexão com neurônios de segunda ordem, os quais, por sua vez, emitem axônios em direção ao cérebro (CERVERO, 1994). As fibras aferentes desses neurônios passam pelo gânglio simpático e chegam ao intestino delgado (incluindo-se aqui a mucosa) através dos nervos esplênico e mesentérico, os quais apresentam ramos colaterais que seguem pelos plexos submucoso e mioentérico. As fibras oriundas dos neurônios aferentes vagais também estão presentes na mucosa do intestino, bem como nos plexos submucoso e mioentérico (FURNESS et al., 1998) (Figura 1). Apesar dos neurônios aferentes intrínsecos e extrínsecos diferirem quanto às suas origens, eles compartilham de uma série de características. Assim sendo, ambos estão presentes em regiões semelhantes na mucosa e nas camadas musculares do intestino, ambos respondem a estímulos químicos e mecânicos aplicados à mucosa e, por fim, compartilham qualidades referentes ao código neuroquímico,

tais como a substância P. Como podemos notar, existe uma estreita relação entre as fibras aferentes intrínsecas e as extrínsecas; este fato sugere a existência de uma interação funcional entre elas. Nesse aspecto, apesar de ainda serem necessários estudos mais aprofundados, há algumas evidências de que estímulos captados por fibras intrínsecas podem ser transmitidos a fibras extrínsecas (HOLZER, 2002).

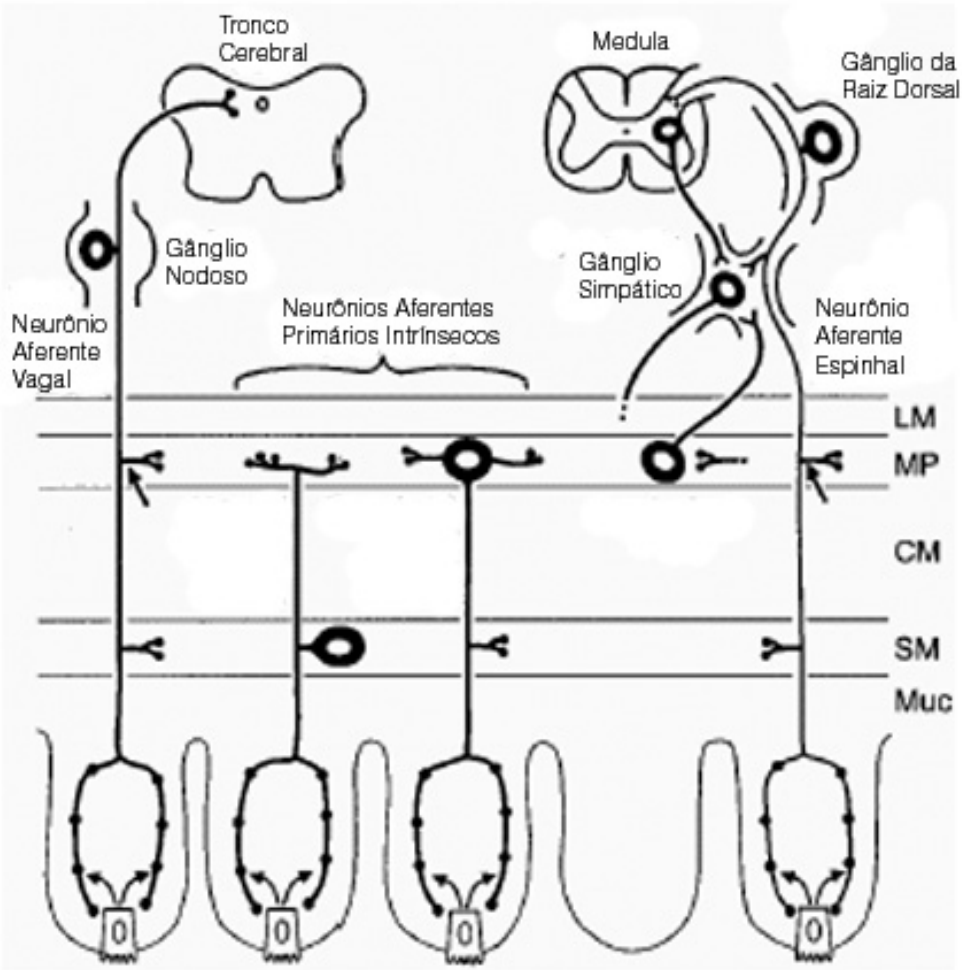

Figura 1 – Disposição dos neurônios aferentes primários intrínsecos e relação com os neurônios aferentes primários espinhais e vagais que inervam o intestino. Os neurônios aferentes primários espinhais e vagais são pseudounipolares e possuem ramos colaterais que se dirigem aos gânglios entéricos (setas). Os neurônios aferentes primários vagais são morfologicamente semelhantes a outros neurônios aferentes primários craniais e possuem seus corpos celulares próximos à região cranial. Estes corpos celulares se encontram no gânglio nodoso e suas projeções ascendentes se dirigem ao núcleo do trato solitário. Os corpos celulares dos neurônios aferentes primários espinhais se localizam nos gânglios da raiz dorsal e seus processos atingem o corno dorsal da medula espinhal. Os neurônios aferentes primários intrínsecos são multipolares e seus terminais se encontram exclusivamente na parede intestinal. Muc, mucosa; SM, Submucosa; CM, músculo circular; MP, plexo mioentérico; LM, músculo longitudinal. Fonte: adaptado de Furness et al., 1998.

Do que foi exposto, depreende-se que o trato gastrointestinal possui uma rica e ampla rede de fibras nervosas. Contudo, além desta rede de fibras e de células nervosas, há no intestino uma enorme coleção de células do sistema imune (cerca de 70 a 80% do total (CASTRO; ARNTZEN, 1993)) e de células epiteliais especializadas (FURNESS; KUNZE; CLERC, 1999; HOLZER, 2002; SHARKEY; MAWE, 2002). Atualmente, a capacidade do intestino em executar determinadas tarefas, que as vezes parecem ser conflitantes, é atribuída à estreita relação anatômica e ao funcionamento em conjunto destes três componentes: fibras nervosas, células do sistema imune e células epiteliais especializadas (FURNESS; KUNZE; CLERC, 1999; HOLZER, 2002).

O intestino, ao mesmo tempo em que é responsável pela absorção de nutrientes e pela digestão dos alimentos, também deve perceber substâncias potencialmente nocivas e elaborar a resposta adequada à presença deste material. Nesse sentido, tem sido demonstrado que a presença de nutrientes (lipídeos, carboidratos e proteínas) na luz intestinal leva a uma diminuição da motilidade do estômago e a uma redução da secreção de ácido gástrico; ao mesmo tempo modula-se o comportamento alimentar havendo diminuição da ingestão de novos alimentos (HOLZER et al., 1994; RAYBOULD, 1998, 1999). A presença dos nutrientes na luz do intestino faz com que as células endócrinas (enterocromafins) presentes no epitélio intestinal liberem colecistoquinina (CCK) e/ou serotonina (5-HT), as quais são capazes de ativar as terminações nervosas das fibras vagais e espinhais (RAYBOULD, 1998, 1999; RAYBOULD; HOLZER, 1992). Deste modo, a informação chega ao SNC, ocorrendo então a modulação da motilidade intestinal e do comportamento alimentar (diminuição da ingestão ou saciedade). De fato, o uso de antagonistas de receptores de CCK e de 5-HT bloqueou a inibição do esvaziamento gástrico induzida por nutrientes (lipídeos e glicose) em ratos. Antagonistas de receptores CCK_A também bloquearam a diminuição da secreção gástrica e o comportamento de saciedade (HOLZER et al., 1994; RAYBOULD, 1998, 1999).

Além disso, a administração de CCK exógena produziu alterações semelhantes àquelas observas quando da presença de nutrientes na luz do intestino (RAYBOULD, 1998). Neste momento, vale dizer que as alterações provocadas pela CCK endógena no padrão de motilidade do intestino parecem ser dependentes dos mastócitos. Deste modo, em animais tratados com estabilizador de membrana de mastócitos de mucosa não mais observou-se as ações da CCK na motilidade do intestino (JUANOLA et al., 1998).

A CCK e a serotonina também participam do modo como as informação são transmitidas pelas fibras extrínsecas do intestino ao SNC (GRUNDY et al., 1998). Assim, receptores de CCK e de 5-HT foram identificados em terminações nervosas de fibras vagais, espinhais e, também, intrínsecas. Também já foi demonstrado que a administração IV de serotonina estimula fibras aferentes vagais por meio de receptores 5 HT_3. Essa estimulação deixa de ocorrer quando a mucosa intestinal é anestesiada e não é possível bloqueá-la quando se faz uso de bloqueadores da transmissão sináptica. Esses dados sugerem que a ativação ocorre diretamente em terminais presentes na mucosa do órgão. Ademais, a injeção de uma solução ácida na mucosa provoca o mesmo padrão de estimulação das aferências vagais (HILLSLEY; GRUNDY, 1998a, b).

Quando uma porção do intestino delgado sofre distensão por intermédio da injeção de solução salina no seu interior, há um outro padrão de estimulação ocorrendo em outras fibras aferentes e que também é observado quando da aplicação intravenosa de serotonina. Essa estimulação inicia-se depois daquela mediada pelos receptores 5 HT_3 e é menos intensa e mais prolongada. Verificou-se que esse último padrão de estimulação é mediado pelos receptores 5 HT_2 e não é bloqueado quando os animais são submetidos à vagotomia. Os autores sugerem, então, que as fibras que apresentam esse padrão de estimulação são aferências espinhais (HILLSLEY; GRUNDY, 1998a).

A CCK também é capaz de estimular aferências vagais presentes na mucosa do intestino. Essa estimulação parece ser mediada pelos receptores CCK_A (RICHARDS et al., 1996) presentes em fibras diferentes das que possuem receptores 5 HT_3. Portanto, há fibras aferentes vagais distintas transmitindo as informações que partem da mucosa em função da liberação de serotonina e CCK (HILLSLEY; GRUNDY, 1998b).

Por fim, o tratamento de ratos com capsaicina mostrou que as fibras do tipo C também são importantes na sinalização a partir de nutrientes no intestino. A destruição as fibras C bloqueia o comportamento de saciedade, a inibição da secreção de ácido gástrico e do esvaziamento do estômago induzidos por lipídeos e carboidratos (HOLZER et al., 1994; LLOYD et al., 1993; RAYBOULD; HOLZER, 1992; SCHWARTZ, 2000).

Vários estudos têm proposto que além de controlarem as respostas motoras e secretórias que se seguem à ingestão de alimentos, as interações entre os sistemas imune e nervoso no intestino contribuem de modo determinante para o desenvolvimento de sintomas tais como hiperalgesia e alterações motoras do trato GI, os quais são observados em pacientes com síndrome inflamatória do intestino (IBS) (FURNESS; KUNZE; CLERC, 1999; HOLZER, 2002; HOLZER et al., 2001). Esses sintomas têm sido relacionados com a sensibilização de vias sensoriais que estabelecem a comunicação entre o intestino e o cérebro, as quais, como vimos, são importantes na fisiologia da digestão. A sensibilização é um fenômeno associado à plasticidade e depende da ativação por determinados estímulos. Esta ativação acaba por aumentar a magnitude da resposta das fibras sensitivas e/ou por diminuir o limite para que a mesma ocorra. De fato, demonstrou-se que mediadores (tais como serotonina, citocinas e PGE_2) liberados por células do sistema imune durante uma resposta inflamatória no intestino podem alterar a função e promover um aumento do número de receptores e canais iônicos presentes em fibras nervosas responsáveis pela informação sensorial de vísceras (GRUNDY, 2002; HOLZER, 2002). Além da sensibilização de fibras

aferentes, há ainda indícios de que a sensibilização de áreas específicas no cérebro esteja também envolvida com o aumento da sensação de dor observada em pacientes com IBS (CERVERO, 2000; GEBHART, 2000).

Em conjunto, os dados de literatura sustentam a noção de que o melhor entendimento das interações entre o sistema imune, as vias nervosas aferentes e áreas específicas do cérebro – especialmente aquelas responsáveis pela integração de informações sensoriais e elaboração de respostas endócrinas e autonômicas – é crucial para a elucidação da fisiopatologia associada a algumas doenças do trato gastrointestinal.

O modelo proposto originalmente por Cara, Conde e Vaz (1994) parece ideal para abordar a estas questões, uma vez que envolve uma reação imune no intestino que, como vimos, é capaz de promover diversas alterações tanto na fisiologia do intestino quanto no comportamento, ou seja, o desenvolvimento de aversão à dieta contendo o antígeno.

Fazendo uso deste modelo, privilegiaremos neste trabalho uma abordagem que ao contemplar a área da neuroimunomodulação buscará o entendimento dos efeitos da alergia alimentar no SNC.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da alergia alimentar no sistema nervoso central (SNC). Assim, formulamos as seguintes questões: que tipo de alterações comportamentais poderiam ocorrer em animais com alergia alimentar? A que áreas do SNC essas alterações comportamentais estariam associadas? Como a reação alérgica gera a informação a ser transmitida para o SNC? Uma vez gerada esta informação, de que modo ela chega ao SNC?

3.1 Objetivos específicos

Investigar a natureza das alterações de comportamento observadas em animais com alergia alimentar.

Investigar, por meio da avaliação da expressão de *c-fos*, que áreas do SNC estão associadas ou envolvidas com as alterações de comportamento observadas em animais alérgicos.

Investigar, por meio da indução de tolerância oral e do tratamento com um anticorpo anti-IgE, quais mecanismos efetores da reação alérgica são importantes para que ocorram as alterações no cérebro e no comportamento dos animais.

Investigar, por meio do tratamento neonatal com capsaicina, a participação das fibras do tipo C na transmissão para o cérebro da informação gerada pela reação alérgica no intestino.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem isogênica BALB/c (6 a 8 semanas de idade) provenientes do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram alojados em salas destinadas exclusivamente à manutenção dessa espécie de animal de experimentação. Durante todo o período experimental os camundongos receberam ração e água *"ad libitum"* e foram mantidos em ambiente com temperatura (entre 22 e 25 ºC) e umidade (60 a 75 %) controladas, e em um ciclo de 12 horas claro-escuro com luz ligada às 7 horas. Os animais foram alojados e utilizados de acordo com as normas e protocolos do Comitê de Manutenção e Uso de Animais de Laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. (Autorização: Processo n° 56/2002).

4.2 Procedimentos

4.2.1 Imunização com ovalbumina (OVA)

Os animais (6-8 semanas de idade) foram imunizados por meio de duas injeções aplicadas por via intraperitoneal. O intervalo entre as duas injeções foi de 14 dias. Nas duas injeções, aplicadas nos dias 0 e 14 (D0 e D14), os animais receberam 4 μg de OVA grau V

(Sigma, St. Louis, MO) mais 1,6 mg de $Al(OH_3)$ diluídos em 0,4 ml de salina em tampão fosfato (PBS) (Figura 2).

4.2.2 Teste de preferência

Decorridos 7 dias da segunda injeção com OVA (imunização), os animais foram submetidos a um teste de preferência pela solução contendo o antígeno (D21) (Figura 2). Para tanto, foram isolados em gaiolas individuais 3 dias antes do início do teste. Dois bebedouros de mesma forma, cor e tamanho contendo água foram dispostos um de cada lado da gaiola. No dia do teste (D21), um deles foi preenchido com uma solução de clara de ovo a 20% em água adocicada com 0,5% de sacarina e o outro com água. Os bebedouros foram pesados imediatamente antes do início do teste e 24 horas depois. O consumo total foi expresso em gramas (g) de solução (água + clara) ingerida. A preferência pela solução adocicada contendo o antígeno foi indicada pela porcentagem do consumo da mesma: (consumo de clara / consumo total (água + clara)) X 100.

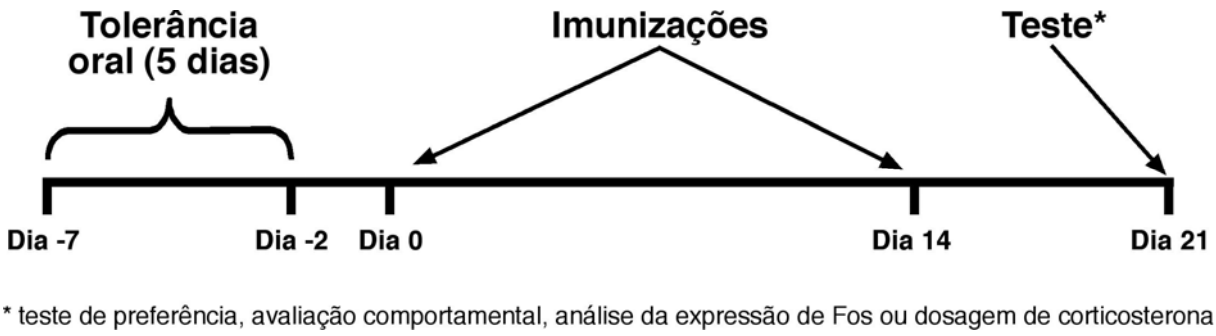

Figura 2 – Esquema explicativo do delineamento experimental. A indução de tolerância foi realizada entre os dias –7 e –2. A imunização consistiu de duas injeções de OVA, uma no dia 0 e outra no dia 14. O teste de preferência, a avaliação comportamenal, a análise da expressão de Fos ou a dosagem de corticosterona foram realizados no dia 21.

4.2.3 Protocolo de indução de tolerância oral

Por cinco dias antes da imunização (D-7 até D-2), os animais que fizeram parte do grupo tolerante, tiveram como única opção de bebida uma solução de ovalbumina (grau II, Sigma) a 1% em água (Figura 2). A indução de tolerância oral envolveu, portanto, a ingestão espontânea e prévia do antígeno com o qual estes camundongos foram imunizados no dia 0 (D0). Durante os cinco dias, a solução de ovalbumina a 1% foi preparada e trocada a cada 24 horas.

4.2.4 Tratamento neonatal com capsaicina para destruição das fibras do tipo C

O tratamento foi realizado segundo descrito anteriormente (JANCSO; KIRALY; JANCSO-GABOR, 1977). Os animais com 2 dias de idade receberam uma única injeção de capsaicina (Sigma, St. Louis, MO) (50 mg/Kg) por via subcutânea. Os camundongos do grupo controle receberam o mesmo volume de veículo (10% álcool, 10% Tween, 80% salina tamponada). A seguir, quando adultos (6 a 8 semanas), animais provenientes de ninhadas diferentes foram divididos nos diversos grupos experimentais.

4.2.5 Teste de contorção abdominal para a avaliação da eficiência do tratamento neonatal com capsaicina

A eficiência do tratamento neonatal com capsaicina foi avaliada por meio de um teste largamente empregado no estudo da sensibilidade visceral frente a estímulos químicos

presentes durante a resposta inflamatória, entre os quais estão aqueles dependentes da desgranulação de mastócitos (RIBEIRO et al., 2000). O teste de contorções abdominais consiste em avaliar e quantificar a sensibilidade visceral após a injeção intraperitoneal (IP) (0,1 ml/10 g de peso) de ácido acético 0,6%. Para tanto, após a administração do ácido acético, os animais foram colocados em uma caixa de observação transparente e durante vinte minutos o número de contorções abdominais foi contabilizado. A contorção se caracteriza pela contração da musculatura abdominal acompanhada de estiramento do corpo e extensão dos membros posteriores. Já havia sido demonstrado que o tratamento com capsaicina é capaz de diminuir o número de contorções abdominais após uma injeção intraperitoneal de fenilquinona (BRET-DIBAT et al., 1997). Apenas os animais que tiveram uma redução de pelo menos 50% no número de contorções abdominais foram utilizados no experimento que avaliou a participação das fibras do tipo C na expressão de *c-fos* no SNC induzida pela alergia alimentar. Estes animais foram imunizados pelo menos uma semana depois de passarem pelo teste de contorções abdominais.

4.2.6 Tratamento com o anticorpo anti-IgE

Os animais receberam uma injeção intravenosa contendo 0,25 mg de IgG1 de rato anti-IgE de camundongo (clone R35-92, Pharmingen, San Diego, CA) em um volume total de 0,25 ml. Esta injeção foi feita no mesmo dia (D14) em que eles receberam a segunda injeção referente ao protocolo de imunização descrito acima. Os camundongos do grupo controle receberam idêntico volume com igual concentração de um anticorpo controle (IgG de rato, Sigma). Já foi demonstrado anteriormente que este esquema de tratamento é eficiente em

reduzir os níveis séricos de IgE em camundongos imunizados (HAAK-FRENDSCHO et al., 1998).

4.2.7 Análise Comportamental

Os animais foram submetidos à ingestão forçada de água (gavagem) por 3 dias consecutivos antes do dia 21 (D18, D19, D20). Este procedimento permitiu a habituação e evitou possíveis alterações comportamentais oriundas da manipulação ou da ingestão forçada em si. No dia 21 os camundongos, imunizados (D0 e D14) ou não, foram desafiados por via oral (gavagem) com 0,5 ml de uma solução contendo 60% de clara de ovo em água ou apenas com água (Figura 2). Uma hora depois os animais foram avaliados quanto à sua atividade geral por meio da observação direta no campo aberto. Este aparelho consiste, basicamente, em uma arena circular de madeira (45 cm de diâmetro, paredes de 20 cm de altura), pintada de branco e com o piso dividido em diversos compartimentos de tamanhos iguais. Cada camundongo, colocado individualmente no centro da arena, foi observado por cinco minutos quanto à sua freqüência de locomoção (número total de entradas nos compartimentos). Logo em seguida, os animais foram observados no labirinto em cruz elevado (LCE). Este modelo, descrito por Pellow et al. (1985) e validado para camundongos por Lister (1987), é amplamente utilizado para o estudo dos níveis de ansiedade em roedores e baseia-se na aversão natural que estes animais apresentam por espaços abertos (LISTER, 1987). A validação deste método envolveu estudos que fizeram uso tanto de fármacos ansiolíticos do tipo benzodiazepínico (PELLOW et al., 1985) como de fármacos tidos como ansiogênicos para o homem tais como a cafeína, o pentilenotetrazol e a anfetamina (PELLOW et al., 1985). Por outro lado, foi também validado por meio da apresentação de estímulos aversivos que

fazem parte da história natural dos roedores, tais como estressores sociais (RODGERS; COLE, 1993), exposição única a um predador (ADAMEC; SHALLOW, 1993) ou ao odor de um predador (ZANGROSSI; FILE, 1992). O labirinto em cruz elevado é composto por dois braços abertos (15 X 5 cm) e dois braços fechados do mesmo tamanho, mas com paredes de 15 cm de altura. O labirinto fica a 100 cm do chão e é construído de tal modo que os braços abertos e fechados se contrapõem, formando a figura de uma cruz. Cada camundongo foi colocado na área central do labirinto (interseção dos braços fechados e abertos) e observado por cinco minutos. O número de entradas nos braços fechados foi computado e o tempo gasto na exploração dos braços abertos e fechados foi registrado com o auxílio de um cronômetro. Neste teste, a porcentagem de tempo gasto na exploração dos braços abertos é inversamente proporcional aos níveis de ansiedade. Os animais dos diversos grupos experimentais foram sempre intercalados entre si para as observações que foram feitas sempre no período de 8:00 a 12:00 horas. Entre as observações de cada camundongo, o campo aberto e o labirinto em cruz elevado foram limpos com uma solução de água-álcool 5.0%.

4.2.8 Marcação de ativação celular em núcleos específicos do SNC por meio da avaliação da expressão de c-fos

A expressão do gene *c-fos* tem se revelado eficiente como um marcador de ativação neuronal e sua avaliação vem sendo amplamente utilizada na descrição de conexões neuroanatômicas, locais de ação de drogas no sistema nervoso central e mapeamento da atividade cerebral após desafios imunológicos ou estímulos psicológicos (DRAGUNOW; FAULL, 1989; SAGAR; SHARP; CURRAN, 1988).

Como descrito na seção correspondente à análise do comportamento, os animais foram submetidos à ingestão forçada de água (gavagem) por 3 dias consecutivos antes do dia 21. Este procedimento permitiu a habituação e evitou possíveis alterações na expressão de *c-fos* oriundas da manipulação ou da ingestão forçada em si. No dia 21 os camundongos, imunizados (D0 e D14) ou não, foram desafiados por via oral (gavagem) com 0,5 ml de uma solução contendo 60% de clara de ovo em água ou com apenas água (Figura 2). A imunoistoquímica para a proteína Fos foi efetuada em material coletado 90 minutos após o desafio oral com OVA. Os camundongos foram profundamente anestesiados com uma associação de quetamina e xilazina para a realização de perfusão sistêmica com 100 ml de salina tamponada (PBS 0,1 M) e, em seguida, com 300 ml de fixador (paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PB) 0,1 M) bombeados através de uma cânula introduzida no ventrículo esquerdo. Imediatamente após, foi realizada a retirada dos encéfalos, os quais permaneceram no mesmo fixador por no mínimo 5 horas sendo, em seguida, "crioprotegidos" por 24 horas em solução de sacarose a 30% em tampão fosfato. Os cérebros foram cortados por congelação (30 μm) e os cortes foram coletados em tampão fosfato. A seguir, os cortes foram lavados em PB 0,1 M (3 vezes por 10 minutos) e incubados por 12 horas com anticorpo anti-Fos (Ab-5, Calbiochem, San Diego, CA) na diluição de 1:1000 em PB com 0,3% de Triton X-100 e 5% de soro normal de cabra. Antes da incubação por 1 hora com o anticorpo secundário biotinilado (diluição de 1:200), os cortes foram novamente lavados (3 vezes por 10 minutos). À incubação com o anticorpo secundário (Jackson, West Grove, PA), seguiu-se a incubação com avidina (1:100) e complexo biotina-peroxidase (Vectastain Kit, Vector, Burlingame, CA) (1:100) por 1 hora. Em seguida, procedeu-se a revelação com H_2O_2 utilizando-se diaminobenzidina como cromógeno. Como controles negativos da reação, algumas seções de cérebro foram incubadas ou com soro normal de coelho ou na ausência do anticorpo primário. Ambos os procedimentos aboliram completamente a marcação para Fos. Após terminada a

reação, os cortes foram montados em lâminas cobertas com uma camada de gelatina e desidratados. A localização dos corpos celulares contendo a proteína Fos em regiões específicas do SNC foi realizada em microscopia convencional de luz e sua quantificação realizada por meio de análise de imagens auxiliada por computador. Em alguns casos, a contra coloração com Giemsa proporcionou a avaliação da porcentagem de neurônios Fos positivos. A análise de imagens foi feita por meio do programa *Image-Pro® Plus* (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). 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 estereotáxicas. As coordenadas estereotáxicas aproximadas das seções utilizadas na contagem de células Fos positivas foram: núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) bregma –0,82 mm; núcleo central da amígdala (CeA) bregma –1,22 mm; núcleo do trato solitário (NTS) bregma –7,08 mm (FRANKLIN; PAXINOS, 1996). A média do número de células marcadas dos dois lados foi utilizada para representar o número de neurônios positivos para Fos em cada corte, e os animais de cada grupo experimental foram comparados usando-se a média do número de células marcadas em todas as seções analisadas de cada região.

4.2.9 Hibridização in situ para o Fator Liberador de Corticotrofina (CRF)

A hibridização *in situ* para o CRF foi realizada segundo adaptação de um protocolo descrito anteriormente (KUSNECOV; LIANG; SHURIN, 1999). Os animais foram anestesiados, submetidos a perfusão e tiveram o cérebro processado de modo exatamente igual ao descrito acima. Os cortes de 30 μm foram então montados em lâminas carregadas, fixados em solução de paraformaldeído 4% em PB 0,1M e desidratados em soluções de álcool

com concentrações crescentes (50, 70 e 95%, por 1 minuto em cada uma). Para reduzir a ligação não específica da sonda, os cortes foram tratados por 10 minutos em uma solução de anidro acético 0,25% contendo 0,1M de trietolamina. A seguir, as seções foram banhadas em 0,2X SSC, novamente desidratas e secas em temperatura ambiente. A detecção do RNAm para CRF foi feita por meio de sonda complementar (*riboprobe*) marcada com [S^{35}]UTP (AmershamPharmaciaBiotech®). Após a transcrição da sonda por métodos convencionais (SP6 RNA polimerase), os cortes foram hibridizados por 12 horas a 55°C. Aproximadamente 100 μl de sonda foram aplicados por lâmina. Após a hibridização as seções foram tratadas com RNAse A (200 μg/ml) por 1h a 37°C e colocadas em uma série de banhos por 1 hora cada (2X SSC a 50°C; 0,2X SSC a 55°C e 0,2X SSC a 55°C). Após serem desidratas e secas, as seções foram expostas a um filme de raio-X por 2 dias e, em seguida, mergulhadas em emulsão fotográfica. Depois de 10 dias a 4°C a emulsão foi revelada e as lâminas foram desidratadas, cobertas e observadas em campo escuro e/ou claro para identificação das áreas marcadas.

4.2.10 Dosagem de corticosterona no soro

Os animais foram submetidos à ingestão forçada de água (gavagem) por 3 dias consecutivos antes do dia 21. Este procedimento permitiu a habituação e evitou possíveis alterações na concentração hormonal oriunda da manipulação ou da ingestão forçada em si. No dia 21 os camundongos, imunizados (D0 e D14) ou não, foram desafiados por via oral (gavagem) com 0,5 ml de uma solução contendo 60% de clara de ovo em água ou apenas com água (Figura 2). Os níveis séricos de corticosterona foram avaliados uma hora depois do desafio. A dosagem foi realizada por meio de radioimunoensaio de fase sólida. Para tanto,

utilizou-se um contador de radiação gama (Packard Instrument Company, Meriden, CT). Foi empregado também, um conjunto (Coat-a-Count®, DPC, Los Angeles, CA) de reagentes comerciais especialmente desenvolvido para a avaliação quantitativa dos níveis séricos de corticosterona em roedores sem qualquer tipo de extração química ou processo de purificação, valendo-se do hormônio marcado com I^{125} (elemento radioativo traçador). O conjunto consiste de tubos de polipropileno revestidos internamente com anticorpo contra corticosterona de camundongo, frasco de hormônio marcado (I^{125}-corticosterona) na forma líquida, frascos contendo padrões de corticosterona nas seguintes concentrações: 0, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 e 2000 ng de hormônio por ml de soro sanguíneo. Quanto maior a concentração de corticosterona na amostra testada, menor a radiação detectada pelo contador de radiação gama. Isto ocorre porque a corticosterona marcada com I^{125} liga-se em menor concentração aos anticorpos que estão nos tubos do Kit.

Os animais foram eutanasiados por decaptação e o sangue coletado em tubos de ensaio. A seguir, os tubos foram centrifugados a 4000g por 15 minutos para a extração do soro, o qual foi conservado a - 20 °C até a realização das dosagens. A sensibilidade do ensaio foi de 1,65 ng/ml e os coeficientes de variação intra-teste baixo e alto foram de 29,1% e 3,24%, respectivamente.

4.2.11 Determinação dos níveis de IgG1 específica para OVA no soro

A concentração de IgG1 anti-OVA foi determinada como descrito anteriormente (RUSSO et al., 2001). Basicamente, placas Nunc-Immuno Maxi-Sorb (Inter-Med, São Paulo, Brasil) foram incubadas por 12 horas a 4 °C com 2 μg de OVA por poço, lavadas com PBS-Tween 0,05% e bloqueadas com 0,25% de caseína em PBS. Após lavagem, as amostras de

soro foram adicionadas e incubadas por 1 h. Em seguida, procedeu-se incubação por 1 hora com anticorpo de cabra anti-IgG1 de camundongo na concentração de 1 μg/ml. Novas lavagens foram realizadas e logo após acrescentou-se anticorpo de coelho anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) por 1 h. Após lavagem, a reação desenvolveu-se na presença de 100 μl/poço do substrato contendo 0,5 mg/ml de OPD (Sigma) e 0,0015% de H_2O_2 em tampão citrato/ácido cítrico 0,1 M, pH 5,0. A reação foi bloqueada por meio da adição de H_2SO_4 a 4 M e a absorbância das amostras foi determinada em um leitor Multiskan EX (Thermo Labsystems, Vantaa, Finlândia), filtro para 490 nm. A concentração de anticorpos IgG1 no soro foi estimada por meio de uma curva padrão construída com diluições conhecidas de IgG1 (Southern Biotechnology) aplicadas à mesma placa contendo as amostras.

4.2.12 Determinação dos níveis de IgE específica para OVA no soro

Para a determinação da quantidade de IgE anti-OVA no soro, as placas foram incubadas por 12 horas a 4 °C com 2 μg/ml de anticorpo de cabra anti-IgE de camundongo (Southern Biotechnology). Após a adição das amostras de soro, acrescentou-se OVA marcada com biotina. A ligação da OVA marcada com os anticorpos das amostras foi revelada por meio da adição de extrAvidin conjugada com peroxidase (Sigma) e, em seguida, de 100 μl/poço do substrato como descrito acima. A leitura de cada amostra foi correlacionada com um padrão interno obtido do soro de animais hiperimunes. Este padrão foi arbitrado como contendo 1000 U.

4.2.13 Análise Estatística

Foram realizados diferentes tratamentos estatísticos de acordo com a natureza dos dados obtidos em cada situação experimental. Inicialmente, os dados foram submetidos ao teste de Bartlett para avaliar se deveríamos aplicar testes paramétricos ou não paramétricos. Quando o resultado desse teste apontava a necessidade de utilizar-se testes paramétricos, os dados foram analisados por meio do teste *t* de Student ou ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer como *post-hoc*. Quando o teste de Bartlett apontava a necessidade de utilizar-se testes não paramétricos, os dados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney ou pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Kolmogorov-Smirnov como *post-hoc*. Os testes foram realizados por intermédio dos programas *GraphPad InStat*® ou SPSS®SYSTAT. A condição estabelecida para que os resultados fossem considerados significantes foi sempre de $p<0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Qual é o comportamento de animais alérgicos frente à possibilidade de ingerir um alimento contendo o antígeno (alérgeno)?

Ao submeter camundongos imunizados com OVA (dias 0 e 14) ao teste de preferência (dia 21), constatamos que uma reação mediada pelo sistema imune (alergia) é capaz de modular o comportamento alimentar. Assim sendo, confirmando dados anteriores (CARA; CONDE; VAZ, 1994), observamos que os camundongos sensibilizados com OVA, frente à opção de ingerir água ou uma solução adocicada de clara de ovo, desenvolveram uma aversão ao antígeno presente na dieta. Ou seja, enquanto animais não imunizados (NI) apresentaram alta preferência pela solução adocicada, os camundongos imunizados (I), apesar de atraídos pelo seu sabor doce, passaram a preteri-la, ingerindo preferencialmente água (Figura 3A).

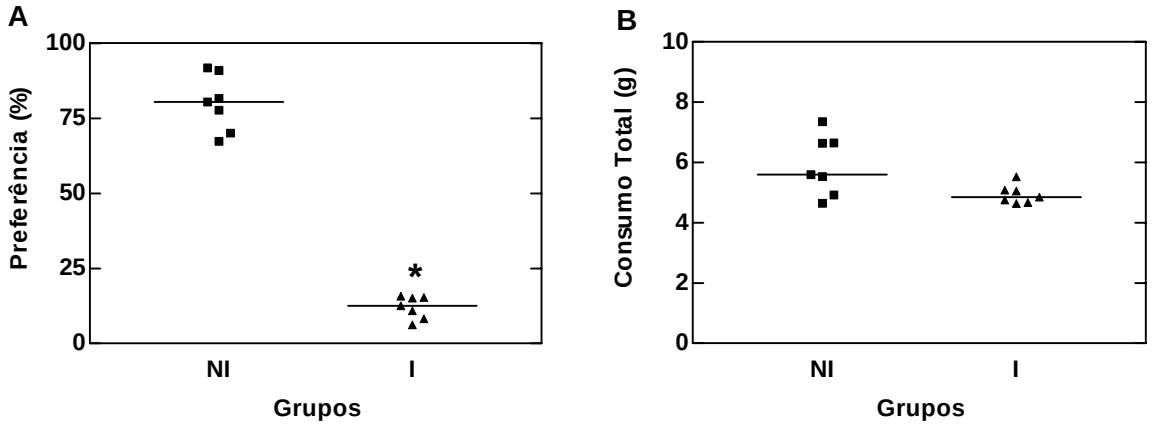

Figura 3 –Desenvolvimento de aversão à dieta contendo o antígeno em camundongos alérgicos. **(A)** A preferência pela solução adocicada de clara de ovo de cada animal mostra que enquanto animais não imunizados (NI) preferiram ingerir a solução contendo OVA, os camundongos imunizados (I) desenvolveram aversão à dieta que contém o antígeno, preferindo água à solução adocicada de clara de ovo. As barras horizontais representam as medianas. *n*=7 em cada grupo. * Diminuição em relação ao grupo NI, teste de Mann-Whitney, $p < 0{,}05$. **(B)** O consumo total de cada animal mostra uma distribuição de valores muito semelhante entre os grupos NI e I. As barras horizontais representam as medianas.

Vale notar que o consumo total (solução adocicada de clara de ovo + água) não foi diferente entre os dois grupos experimentais (Figura 3B).

5.2 Outras e quais outras alterações de comportamento poderiam ser ocasionadas pela alergia alimentar?

Para abordar a esta questão, uma hora após serem desafiados com o antígeno por via oral (dia 21), o comportamento de animais imunizados com OVA (dias 0 e 14) foi estudado por meio do campo aberto, visando análise da atividade geral, e logo em seguida do labirinto em cruz elevado (LCE), visando análise dos níveis de ansiedade. Os resultados demonstram que a reação alérgica decorrente da ingestão do antígeno exerceu claro efeito ansiogênico em camundongos sensibilizados. Assim sendo, observamos que os animais sensibilizados que ingeriram o antígeno (I+O) passaram menos tempo explorando os braços abertos do labirinto em cruz elevado do que aqueles imunizados que ingeriram água (I+A), aqueles não imunizados que beberam a solução de clara de ovo (NI+O) e aqueles não manipulados (naive) (Figura 4A). Não houve diferença no tempo gasto na exploração dos braços abertos entre os animais não manipulados (naive) e aqueles dos grupos I+A e NI+O (Figura 4A), fato este que descarta a possibilidade de que o efeito ansiogênico observado seja decorrente da ingestão forçada em si. Além disso, o desafio antigênico por via oral de camundongos sensibilizados não alterou o número de entradas nos braços fechados do LCE (Figura 4B) e a freqüência de locomoção observada no campo aberto (Figura 4C), o que indica que a atividade geral nestes animais (I+O) não foi diferente daquela dos animais dos demais grupos experimentais (I+A, NI+O e naive).

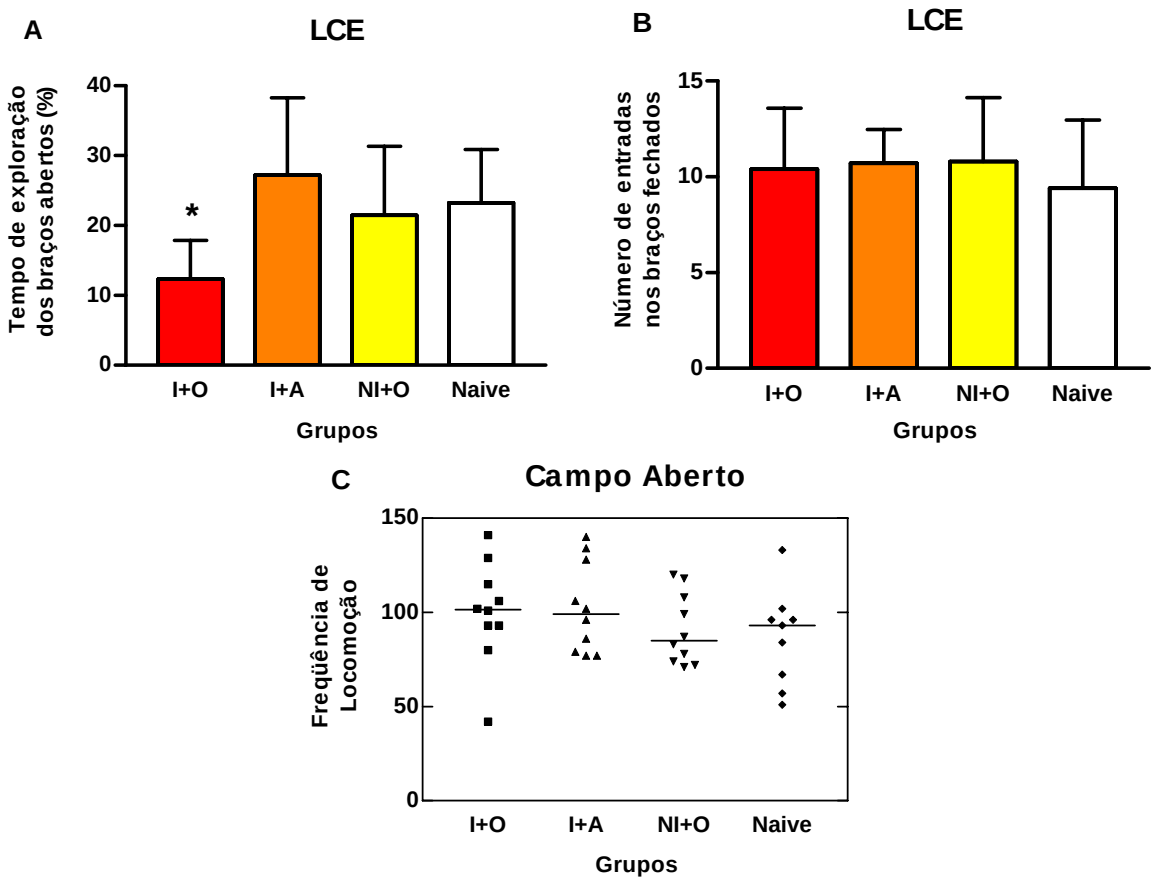

Figura 4 – Camundongos com alergia alimentar apresentam maiores níveis de ansiedade. **(A)** Labirinto em cruz elevado (LCE). Uma hora após desafio por via oral, os animais imunizados que receberam OVA (I+O) exploraram os braços abertos por menos tempo, apresentando portanto maiores níveis de ansiedade quando comparados àqueles imunizados que receberam água (I+A), não imunizados desafiados com OVA (NI+O) e camundongos não manipulados (naive). *n*=10 em cada grupo. * Diminuição em relação aos demais grupos, ANOVA seguido do teste de Student-Newman-Keuls. Dados representados como média±desvio padrão. $F(3,36)=5,17$; $p<0,05$. **(B)** A observação dos animais no LCE uma hora após o desafio oral mostrou que não houve diferença no número de entradas nos braços fechados entre os grupos experimentais. *n*=10 em cada grupo. Dados representados como média±desvio padrão. **(C)** Campo Aberto. A freqüência de locomoção de cada animal mostra que não houve diferença na atividade geral entre os grupos experimentais. *n*=10 em cada grupo. As barras horizontais representam as medianas.

5.3 Que alterações no sistema nervoso central (SNC) acompanham as mudanças de comportamento observadas em camundongos com alergia alimentar?

Observadas as alterações de comportamento acima descritas (maiores níveis de ansiedade e desenvolvimento de aversão à dieta contendo o antígeno), tornou-se natural investigar que áreas do SNC estariam a elas relacionadas. Uma vez bem estabelecido que a expressão de *c-fos* pode ser empregada como marcador da ativação neuronal (DRAGUNOW; FAULL, 1989; SAGAR; SHARP; CURRAN, 1988), decidimos avaliar o número de neurônios positivos para Fos em diferentes áreas do cérebro de camundongos imunizados (dias 0 e 14) e desafiados com o antígeno por via oral (dia 21). Observamos que nos camundongos sensibilizados, a reação alérgica decorrente da ingestão do antígeno provocou a ativação do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e do núcleo central da amígdala (CeA). Assim sendo, noventa minutos após o desafio oral com a solução de clara de ovo, pudemos verificar tanto no PVN (Figura 5A) quanto no CeA (Figura 5B), grande número de células positivas para Fos nos animais sensibilizados (I+O). Ao contrário, a marcação para Fos foi bem menor em ambas as áreas nos animais imunizados que receberam água (I+A), naqueles não imunizados que ingeriram clara de ovo (NI+O) e nos camundongos não manipulados (naive) (Figuras 5A e 5B).

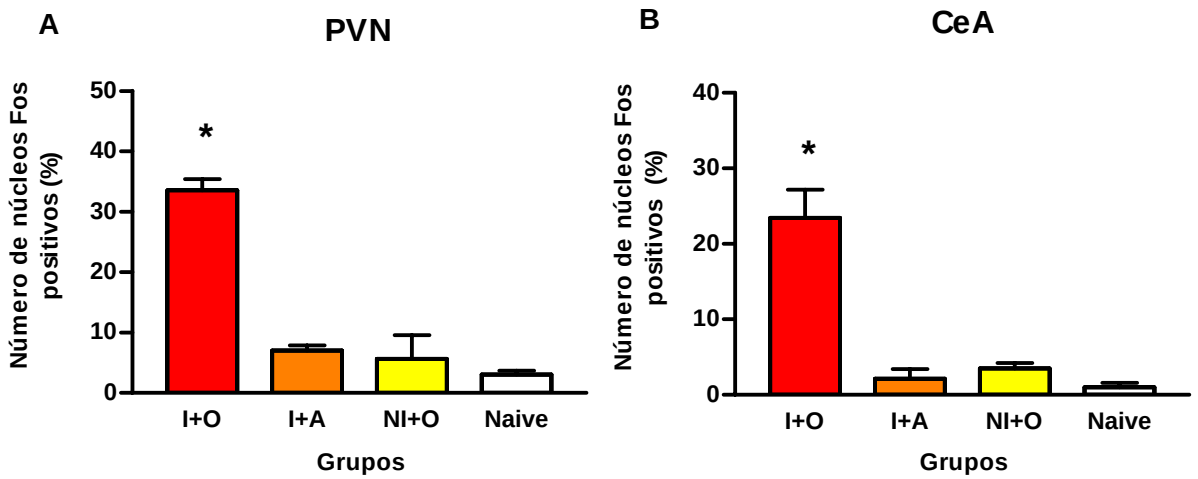

Figura 5 – Expressão de *c-fos* em regiões específicas do cérebro de camundongos com alergia alimentar. Os animais imunizados e desafiados com o antígeno por via oral (I+O) apresentaram maior número de núcleos positivos para a proteína Fos do que aquele verificado nos camundongos imunizados que receberam água (I+A), nos animais não imunizados desafiados com OVA (NI+O) e nos camundongos não manipulados (naive). A expressão de *c-fos* foi avaliada 90 minutos após o desafio por via oral. **(A)** Núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). *n*=3-4 em cada grupo. * Aumento em relação aos demais grupos, ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer. Dados representados como média±desvio padrão. $F(3,9)=86,3$; $p<0,05$. **(B)** Núcleo central da amígdala (CeA). *n*=3-4 em cada grupo. * Aumento em relação aos demais grupos, ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer. Dados representados como média±desvio padrão. $F(3,9)=81,95$; $p<0,05$

A figura 6 ilustra um corte transversal de cérebro de camundongo onde podemos ver, ao redor do terceiro ventrículo, a região em forma de asa de borboleta que corresponde ao núcleo paraventricular do hipotálamo (área preenchida em vermelho).

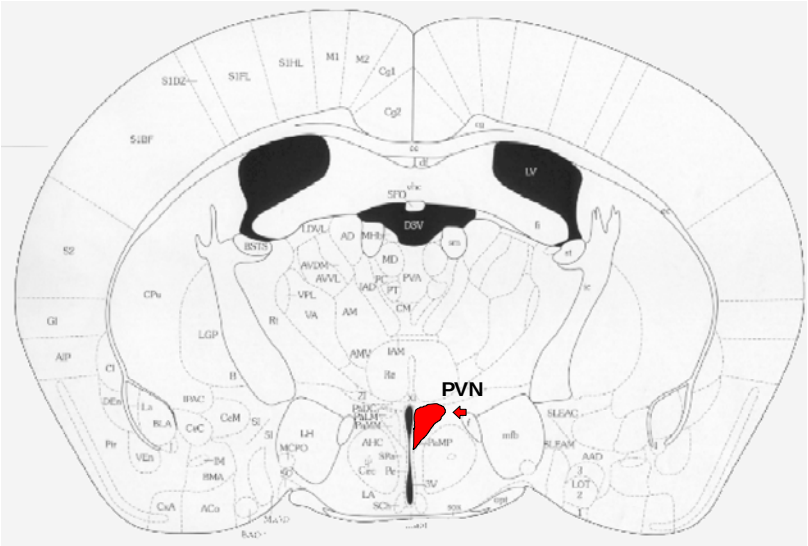

Figura 6 - Representação gráfica de corte de cérebro de camundongo ilustrando região que corresponde ao núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). Área preenchida indicada pela seta vermelha ao redor do terceiro ventrículo. Coordenada estereotáxica aproximada: bregma –0,82 mm. Adaptado de Franklin e Paxinos (1996)

A figura 7 mostra quatro cortes transversais de cérebros que correspondem à área destacada na figura 6. Nela podemos observar que há grande quantidade de células marcadas para Fos no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) do animal que representa o grupo imunizado e desafiado com OVA (I+O) (Figura 7A). Em contraste, quase não verificamos marcação no PVN do animal também imunizado que recebeu água (I+A) (Figura 7B), do não imunizado desafiado com OVA (NI+O) (Figura 7C) e do não manipulado (naive) (Figura 7D).

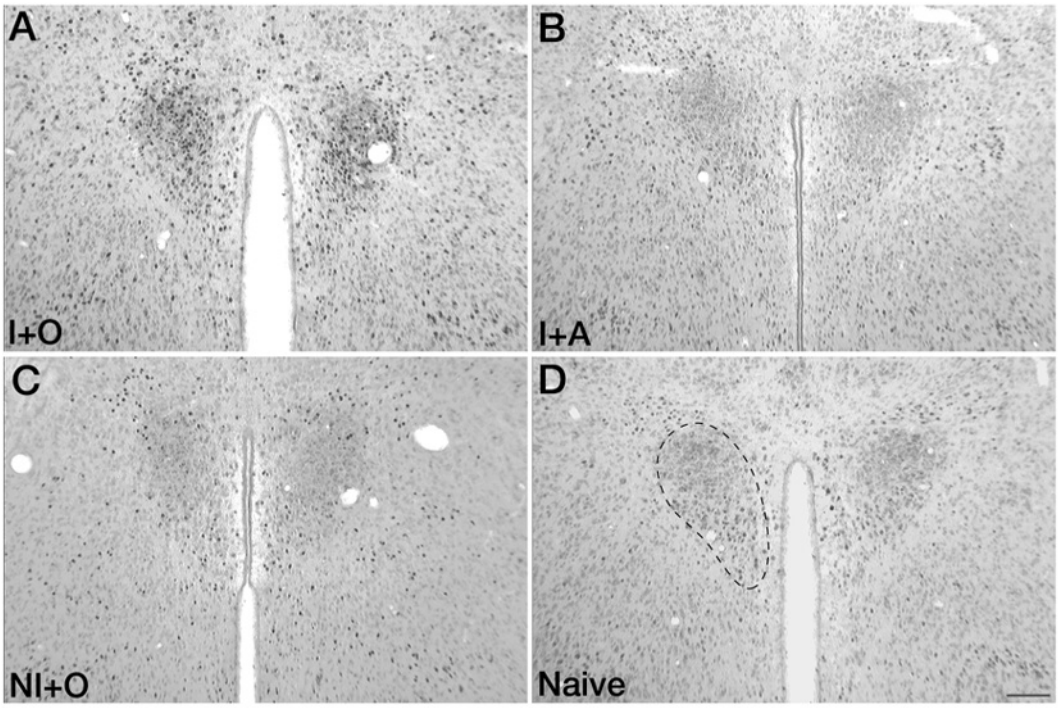

Figura 7 – Alergia alimentar leva à expressão de *c-fos* no PVN. Seções coronais de cérebro representando os quatro grupos experimentais mostram intensa marcação para a proteína Fos em neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) de camundongos imunizados e desafiados com o antígeno por via oral **(A)**. Em contraste, núcleos positivos para Fos praticamente não foram observados nos animais imunizados que receberam água **(B)**, nos não imunizados desafiados com OVA **(C)** e nos não manipulados (naive) **(D)**. Cortes contracorados com Giemsa. Barra de escala, 100 μm.

A figura 8 ilustra um corte transversal de cérebro de camundongo onde podemos ver, medialmente ao núcleo basolateral (BLA), o núcleo central da amígdala (CeA) preenchido em vermelho.

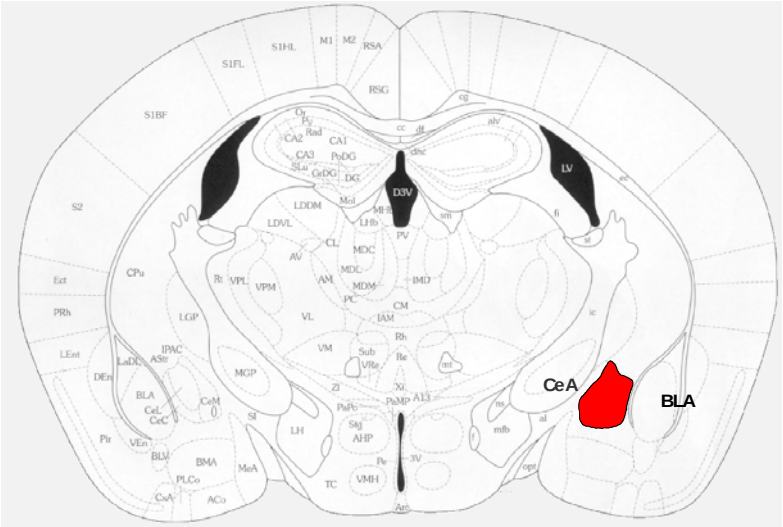

Figura 8 - Representação gráfica de corte de cérebro de camundongo ilustrando região que corresponde ao núcleo central da amígdala (CeA). Área preenchida em vermelho. BLA, núcleo basolateral. Coordenada estereotáxica aproximada: bregma –1,22 mm. Adaptado de Franklin e Paxinos (1996)

A figura 9 mostra um corte histológico de cérebro que corresponde à figura 8 e no qual podemos notar a cápsula externa (ce), o núcleo basolateral (BLA) (composto por células maiores) e, medialmente a este último, o núcleo central da amígdala (CeA).

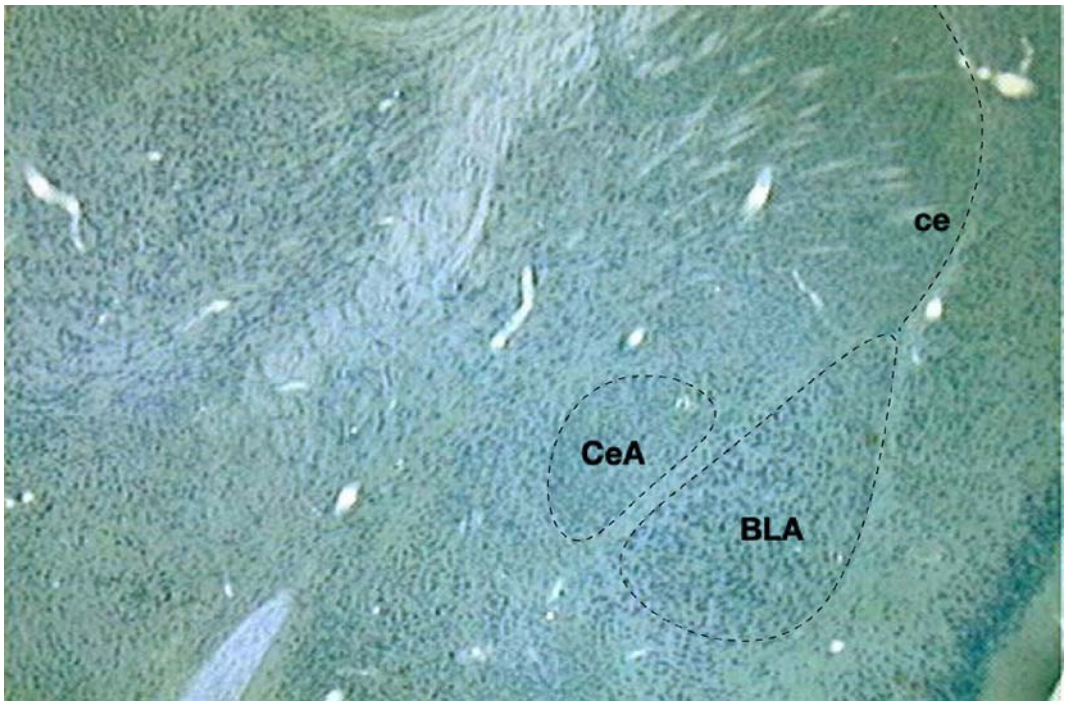

Figura 9 - Corte histológico de cérebro de camundongo que corresponde à figura 8. BLA, núcleo basolateral da amígdala; ce, cápsula externa; CeA, núcleo central da amígdala. Corte contracorado com Giemsa.

A figura 10 mostra quatro cortes transversais de cérebros nos quais podemos verificar que há intensa marcação para Fos no núcleo central da amígdala (CeA) do animal que representa o grupo imunizado e desafiado com OVA (I+O) (Figura 10A). Em contraste, quase não verificamos a presença de neurônios positivos para Fos no CeA do animal também imunizado que recebeu água (I+A) (Figura 10B), do não imunizado desafiado com OVA (NI+O) (Figura 10C) e do não manipulado (naive) (Figura 10D).

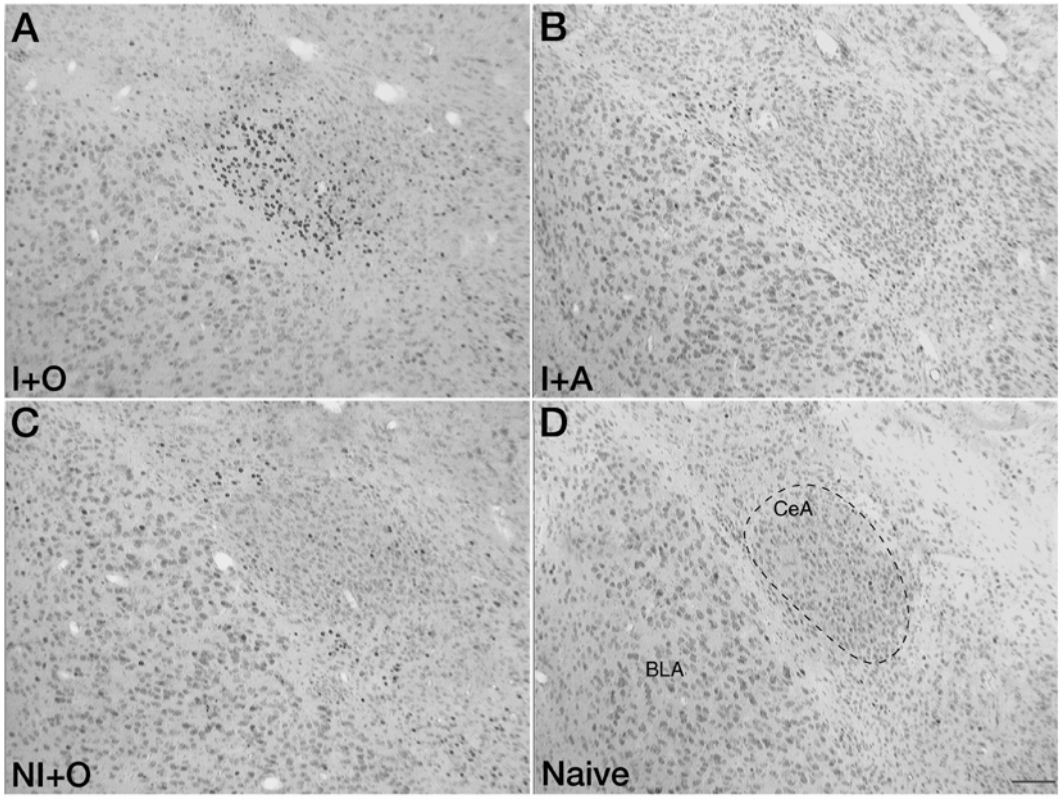

Figura 10 - Alergia alimentar leva à expressão de *c-fos* no CeA. Seções coronais de cérebro representando os quatro grupos experimentais mostram intensa marcação para a proteína Fos em neurônios do núcleo central da amígdala (CeA) de camundongos imunizados e desafiados com o antígeno por via oral **(A)**. Em contraste, núcleos positivos para Fos praticamente não foram observados nos animais imunizados que receberam água **(B)**, nos não imunizados desafiados com OVA **(C)** e nos não manipulados (naive) **(D)**. BLA, núcleo basolateral da amígdala. Cortes contracorados com Giemsa. Barra de escala, 100 μm.

A presença de nutrientes na luz intestinal, por si só, é capaz de ativar áreas específicas do SNC (RAYBOULD, 2002). A ativação por nós observada, poderia, portanto, ser fruto da simples ingestão da solução de clara de ovo. No entanto, esta possibilidade pode ser descartada pelo fato de que o número de células positivas para Fos nos animais não

imunizados que ingeriram a solução contendo o antígeno (NI+O) não foi diferente daquele evidenciado por nós nos animais não manipulados (naive) e nos imunizados que receberam água (I+A) (Figuras 5A e 5B).

Uma vez que o PVN e o CeA são duas das principais áreas do SNC contendo células que expressam o fator liberador de corticotrofina (CRF), hormônio considerado central na orquestração de respostas adaptativas relacionadas ao estresse (GRAY, 1993; GRAY; BINGAMAN, 1996; SWANSON et al., 1983), perguntamos se os neurônios destas áreas em que se verificou a expressão de *c-fos* em função da alergia alimentar seriam também capazes de produzir CRF. Para responder a tal pergunta, fizemos uso da hibridização *in situ* buscando avaliar a presença de transcritos de CRF (RNAm). A figura 11 mostra que em animais imunizados e desafiados por via oral com o antígeno, tanto os neurônios do PVN quanto os do CeA em que observamos ativação (expressão de *c-fos*) apresentam RNAm para o CRF. Observando com atenção, percebe-se que os núcleos marcados para a proteína Fos (coloração acastanhada) estão envoltos por grânulos de prata (aparecem em preto), os quais indicam a presença de RNAm para o CRF nestes neurônios.

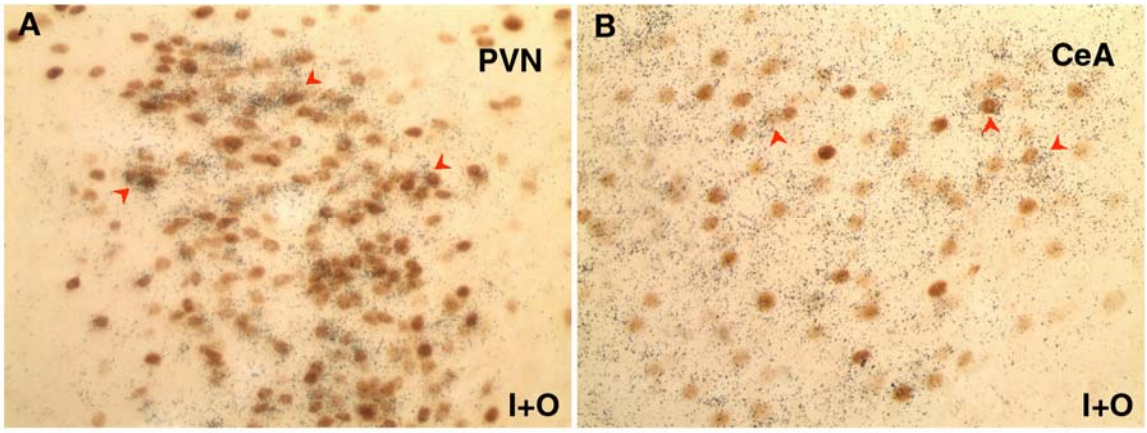

Figura 11 – Neurônios ativados pela alergia alimentar no PVN e no CeA são capazes de produzir fator liberador de corticotrofina (CRF). Seções coronais de cérebro mostram a colocalização de proteína Fos e RNAm para CRF no PVN **(A)** e no CeA **(B)** noventa minutos depois da ingestão do antígeno por animais imunizados (I+O). As setas indicam a presença de núcleos acastanhados (expressão de *c-fos*) envoltos por grânulos de prata (RNAm para o CRF)

Outra forma, utilizada por nós para investigar se a alergia alimentar provocaria alterações no SNC que envolvessem a participação do CRF, foi avaliar a atividade do eixo hipotálamo-pituitária(hipófise)-adrenal (HPA). Assim, uma hora após o desafio oral com o antígeno (dia 21), medimos a concentração sérica de corticosterona no soro de animais imunizados com OVA (dias 0 e 14). Constatamos que animais alérgicos desafiados com o antígeno (I+O) apresentaram maiores concentrações séricas de corticosterona do que aquelas observadas nos animais imunizados que ingeriram água (I+A), nos não imunizados desafiados com OVA (NI+O) e naqueles não manipulados (naive) (Figura12). Este dado corrobora com o anterior, que monstrou a colocalização de Fos e CRF no PVN de animais com alergia alimentar.

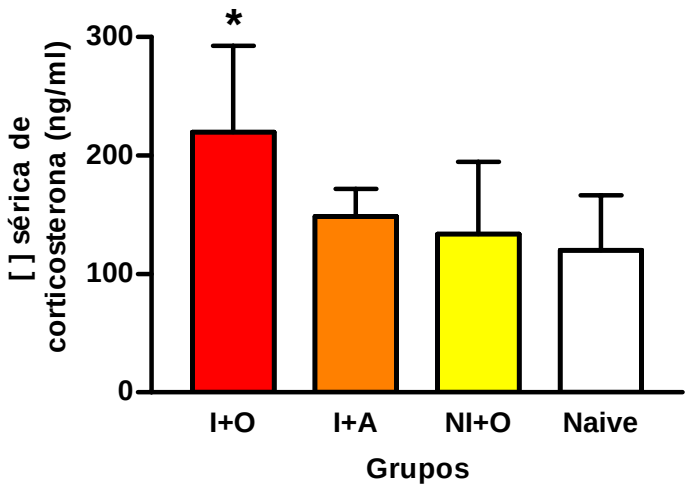

Figura 12 – Alergia alimentar leva à ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Uma hora após o desafio com o antígeno por via oral, camundongos imunizados (I+O) apresentaram maior concentração sérica (ng/ml) de corticosterona do que aquela verificada nos camundongos imunizados que receberam água (I+A), nos animais não imunizados desafiados com OVA (NI+O) e nos camundongos não manipulados (naive). *n*=7-9 em cada grupo. * Aumento em relação aos demais grupos, ANOVA seguido do teste de Student-Newman-Keuls. Dados representados como média±desvio padrão. $F(3,29)=5,87$; $p<0,05$

5.4 O desenvolvimento da aversão e a ativação do SNC podem ser bloqueados pela indução de tolerância oral?

O desenvolvimento da aversão a componentes da dieta parece estar ligado a anticorpos específicos contra a OVA (CARA; CONDE; VAZ, 1994). Sendo assim, investigamos se a indução de tolerância oral à OVA seria capaz de prevenir o desenvolvimento desta aversão. Já fora demonstrado anteriormente que a indução de tolerância oral em camundongos, por meio da ingestão (prévia à imunização) de uma solução de OVA a 1%, é capaz de suprimir respostas alérgicas associadas ao padrão Th2 (RUSSO et al., 2001). Observamos aqui que camundongos expostos, por cinco dias consecutivos antes da imunização, a uma solução de OVA a 1% na água de bebida não desenvolveram aversão à dieta contendo o antígeno. Ao contrário, os animais tolerantes (TOL), de modo semelhante aos camundongos não imunizados (NI), apresentaram forte preferência pela solução adocicada de clara de ovo (Figura 13A). O consumo total (solução adocicada de clara de ovo + água) não foi diferente entre animais imunizados (I), não imunizados (NI) e tolerantes (TOL) (Figura 13B), o que demonstra que a redução de preferência pela solução contendo o antígeno apresentada pelos camundongos imunizados ocorreu em função da menor ingestão de solução adocicada de clara de ovo e maior consumo de água.

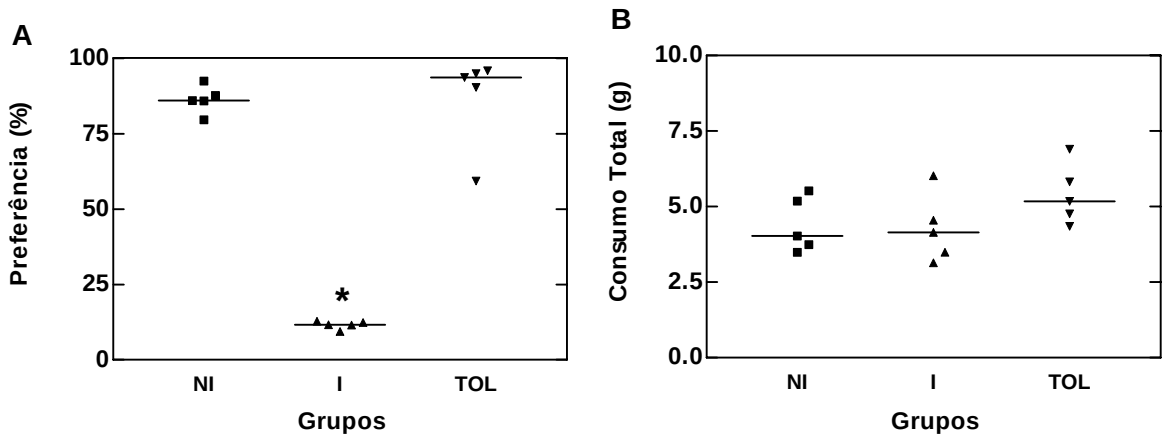

Figura 13 – Tolerância oral impede o desenvolvimento de aversão à dieta contendo o antígeno em camundongos alérgicos. **(A)** A preferência pela solução adocicada de clara de ovo de cada animal mostra que enquanto animais tolerantes (TOL) comportaram-se como os não imunizados (NI), preferindo ingerir a solução contendo OVA, os camundongos imunizados (I) desenvolveram aversão à dieta que contém o antígeno, preferindo água à solução adocicada de clara de ovo. As barras horizontais representam as medianas. *n*=5 em cada grupo. * Diminuição em relação aos demais grupos, teste de Kruskall-Wallis seguido do teste de Kolmogorov-Smirnov, p <0,05. **(B)** O consumo total de cada animal mostra uma distribuição de valores muito semelhante entre os grupos NI, I e TOL. As barras horizontais representam as medianas.

Além de evitar o desenvolvimento da aversão ao antígeno presente na dieta, a tolerância oral também foi capaz de bloquear a ativação do SNC em animais com alergia alimentar. Assim sendo, noventa minutos após desafio oral com OVA (dia 21), o número de neurônios positivos para Fos verificado no PVN (Figura 14A) e no CeA (Figura 14B) dos animais do grupo tolerante (TOL) foi bem menor do que aquele observado nos camundongos imunizados (I) (dias 0 e 14).

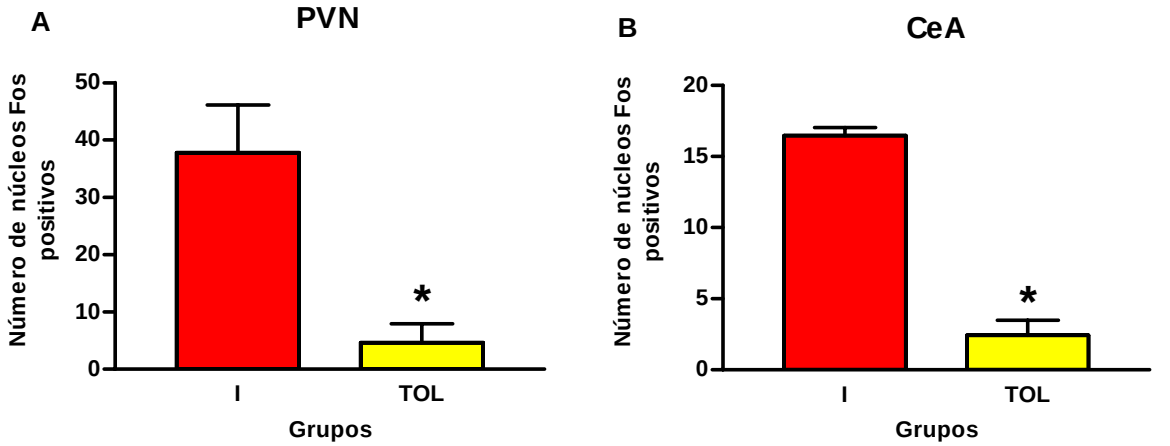

Figura 14 - Tolerância oral impede a ativação do PVN e do CeA em camundongos alérgicos. Enquanto os animais imunizados (I) apresentaram intensa marcação para a proteína Fos em neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) **(A)** e do núcleo central da amígdala (CeA) **(B)**, poucos núcleos positivos para Fos foram observados em ambas as áreas de animais tolerantes (TOL). A expressão de *c-fos* foi avaliada 90 minutos após o desafio oral com OVA. *n*=3-4 em cada grupo. * Diminuição em relação ao grupo I, teste *t* de Student, p <0,05. Dados representados como média±desvio padrão.

As figuras 15 e 16 mostram que enquanto a intensidade de marcação para Fos foi intensa no PVN (Figura 15A) e no CeA (Figura 16A) de animais imunizados desafiados com o antígeno por via oral, células positivas para Fos quase não foram observadas nas duas áreas de camundongos tolerantes (TOL) (Figuras 15B e 16B).

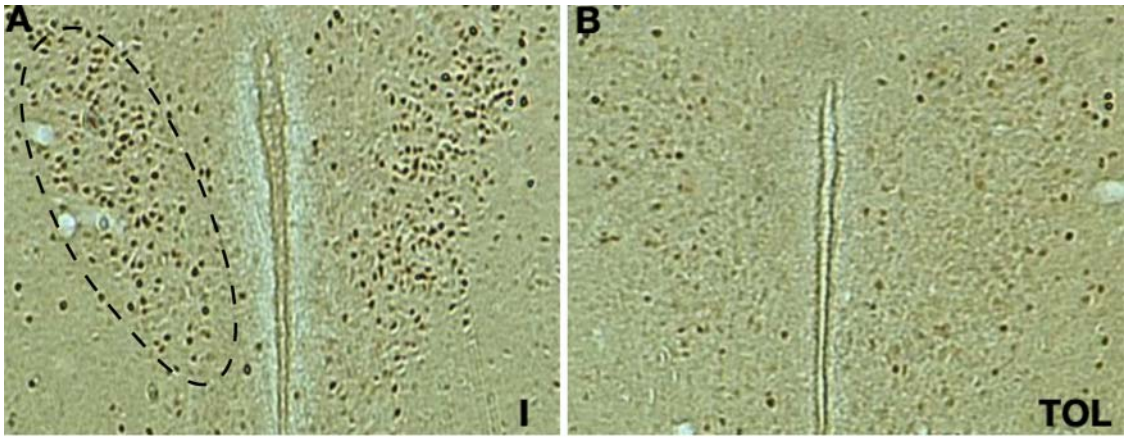

Figura 15 - Tolerância oral impede a ativação do PVN. Seções coronais de cérebro representando os dois grupos experimentais mostram intensa marcação para a proteína Fos em neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) de camundongos imunizados e desafiados com o antígeno por via oral **(A)**. Em contraste, núcleos positivos para Fos praticamente não foram observados nos animais tolerantes **(B)**

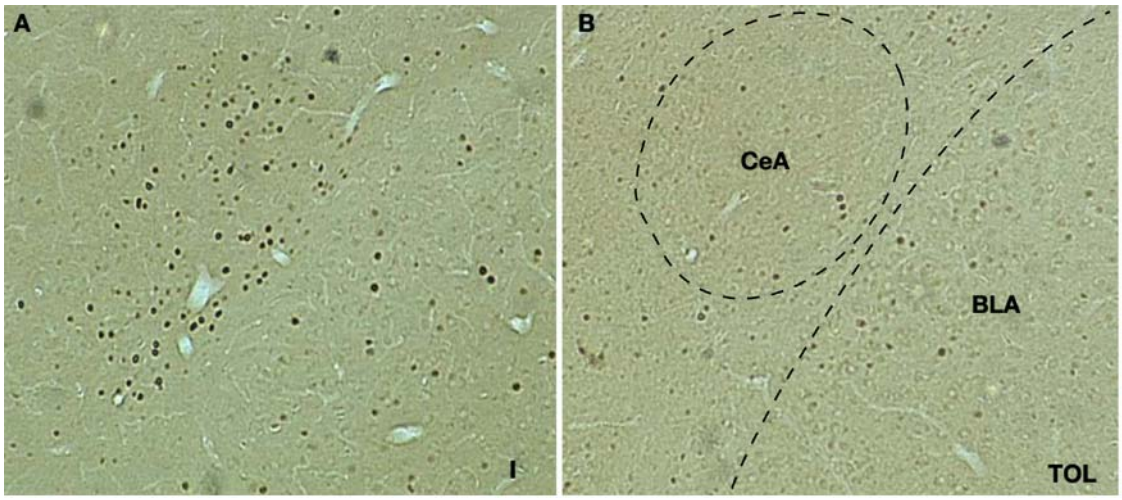

Figura 16 - Tolerância oral impede a ativação do CeA. Seções coronais de cérebro representando os dois grupos experimentais mostram intensa marcação para a proteína Fos em neurônios do núcleo central da amígdala (CeA) de camundongos imunizados e desafiados com o antígeno por via oral **(A)**. Em contraste, núcleos positivos para Fos praticamente não foram observados nos animais tolerantes **(B)**

O protocolo de indução de tolerância oral foi eficaz em promover redução nos níveis séricos de IgE e IgG1 específicas para OVA. Vê-se que os níveis séricos de ambos os isotipos nos animais tolerantes (TOL) se assemelham àqueles observados nos animais não imunizados (NI). Os camundongos imunizados (I) apresentaram maiores títulos de IgE (Figura 17A) e IgG1 (Figura 17B) do que aqueles medidos nos outros dois grupos experimentais.

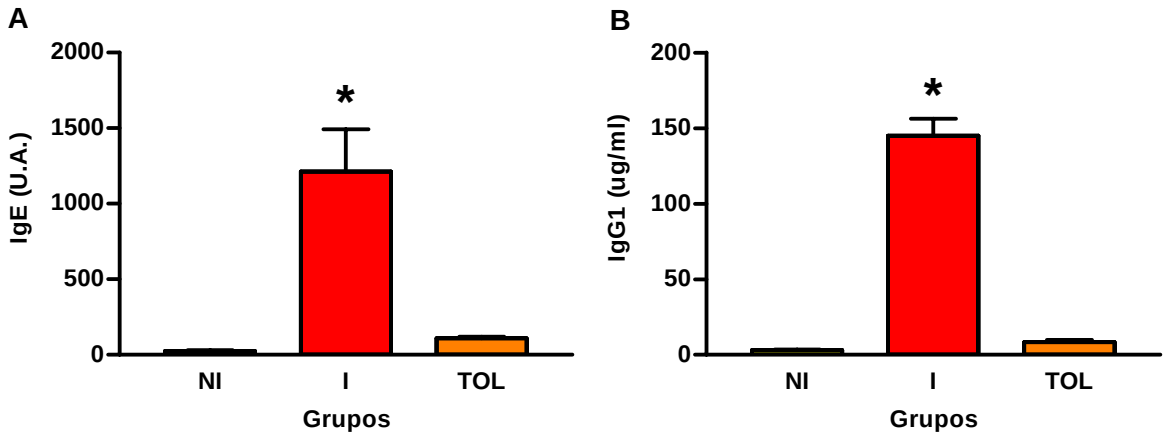

Figura 17 – Níveis séricos de IgG1 e IgE específicas para OVA após indução de tolerância oral. A indução de tolerância oral bloqueou o aparecimento de IgE **(A)** e IgG1 **(B)** específicas para OVA no soro de camundongos imunizados. Enquanto observamos altos títulos para IgE (A) e IgG1 (B) específicas para OVA no soro de animais imunizados (I), os títulos verificados em animais tolerantes (TOL) foram muito similares àqueles dos camundongos não imunizados (NI). *n*=5 em cada grupo. (A) * Aumento em relação aos demais grupos, ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer. Dados representados como média±desvio padrão. $F(2,12)=83,9$; $p<0,05$. (B) * Aumento em relação aos demais grupos, ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer. Dados representados como média±desvio padrão. $F(2,12)=760,8$; $p<0,05$

5.5 Qual o envolvimento da IgE no desenvolvimento da aversão e na ativação do SNC em animais com alergia alimentar?

Uma vez que a indução de tolerância oral preveniu o desenvolvimento da aversão, bloqueou a ativação do SNC e suprimiu a produção de IgE, buscamos saber se as alterações comportamentais e o aumento na expressão de Fos induzidos pela alergia alimentar poderiam ser atribuídos a IgE, o principal isotipo envolvido na fase imediata da reação alérgica. Para testar essa hipótese, tratamos camundongos previamente sensibilizados com um anticorpo não anafilático anti-IgE. Verificamos que o tratamento com o anticorpo anti-IgE, realizado sete

dias antes do desafio, impediu o desenvolvimento da aversão nos animais imunizados. Enquanto os camundongos tratados com o anticorpo controle (Ac controle) desenvolveram aversão à solução adocicada contendo o antígeno e beberam preferencialmente água, aqueles tratados com o anticorpo anti-IgE comportaram-se como os não imunizados (NI) e apresentaram grande preferência pela solução adocicada de clara de ovo (Figura 18A). Importante salientar que também neste caso não houve diferença no consumo total entre os camundongos sensibilizados tratados com o anticorpo controle ou o anticorpo anti-IgE (Figura 18B).

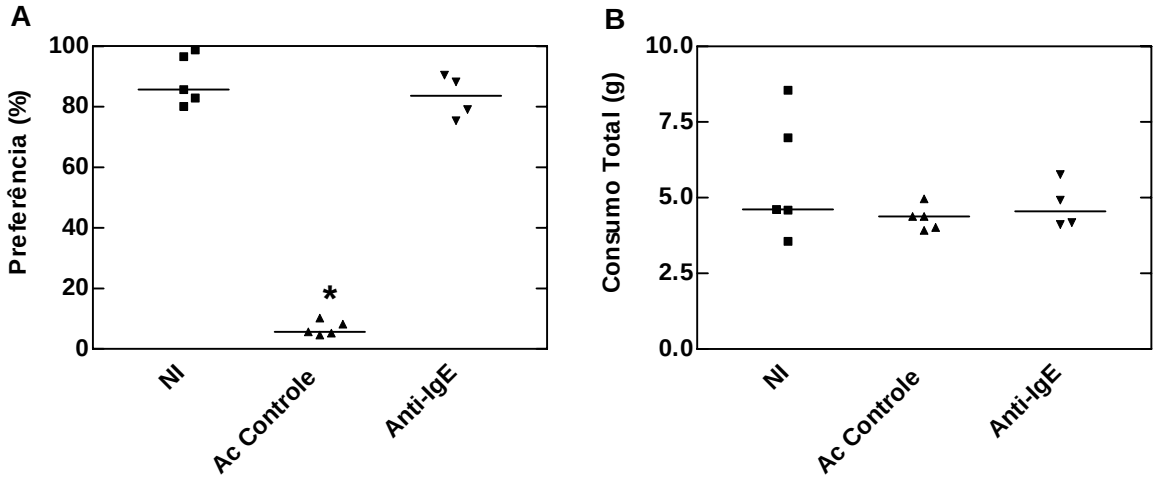

Figura 18 – IgE é essencial para o desenvolvimento de aversão à dieta contendo o antígeno em animais alérgicos. **(A)** A preferência pela solução adocicada de clara de ovo de cada animal mostra que enquanto animais tratados com o anticorpo anti-IgE (Anti-IgE) comportaram-se como os não imunizados (NI), preferindo ingerir a solução contendo OVA, os camundongos imunizados que receberam o anticorpo controle (Ac Controle) desenvolveram aversão à dieta que contém o antígeno, preferindo água à solução adocicada de clara de ovo. As barras horizontais representam as medianas. *n*=4-5 em cada grupo. * Diminuição em relação aos demais grupos, teste de Kruskall-Wallis seguido do teste de Kolmogorov-Smirnov, $p < 0,05$. **(B)** O consumo total de cada animal mostra uma distribuição de valores muito semelhante entre os grupos NI, Ac Controle e Anti-IgE. As barras horizontais representam as medianas.

Além de impedir o desenvolvimento da aversão, nos camundongos imunizados (dias 0 e 14) e desafiados com solução de clara de ovo por via oral (dia 21), o tratamento com o anticorpo anti-IgE também reduziu de modo marcante a ativação das áreas do cérebro. Sendo assim, enquanto verificamos intensa marcação para Fos no PVN (Figuras 19A e 20A) e no CeA (Figuras 19B e 20B) de animais que receberam o anticorpo controle (Ac controle), o

número de núcleos positivos para Fos observado em ambas as áreas dos camundongos tratados com o anticorpo anti-IgE foi muito pequeno (Figuras 19 e 20).

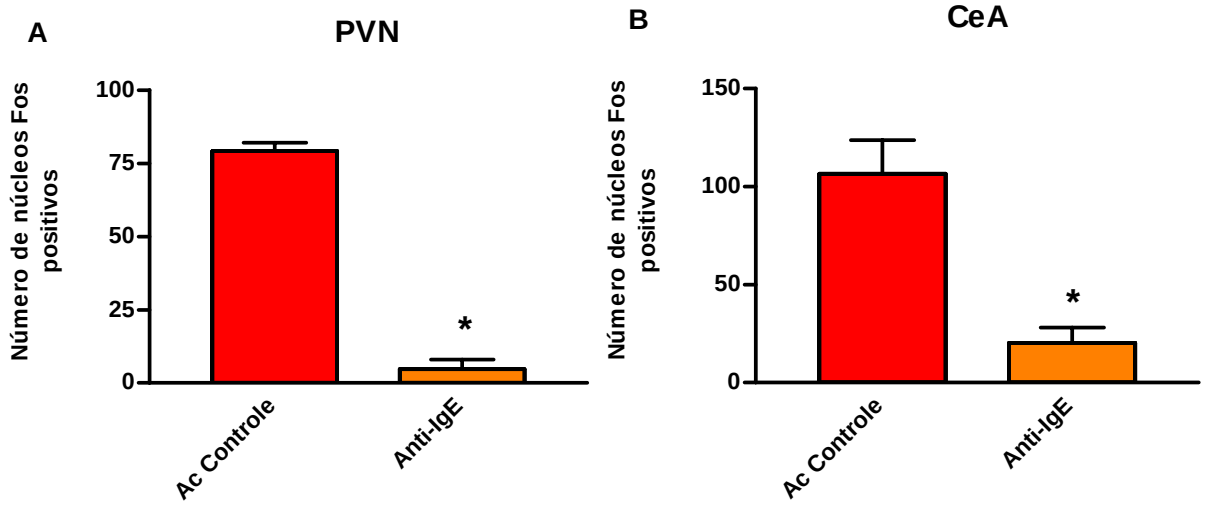

Figura 19 – IgE é essencial para a ativação do PVN e do CeA em camundongos alérgicos. Enquanto os animais imunizados tratados com o anticorpo controle (Ac Controle) apresentaram intensa marcação para a proteína Fos em neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) **(A)** e do núcleo central da amígdala (CeA) **(B)**, poucos núcleos positivos para Fos foram observados em ambas as áreas de animais imunizados que receberam o anticorpo anti-IgE (Anti-IgE). A expressão de *c-fos* foi avaliada 90 minutos após o desafio oral com OVA. *n*=3 em cada grupo. * Diminuição em relação ao grupo Ac Controle, teste *t* de Student, p <0,05. Dados representados como média±desvio padrão.

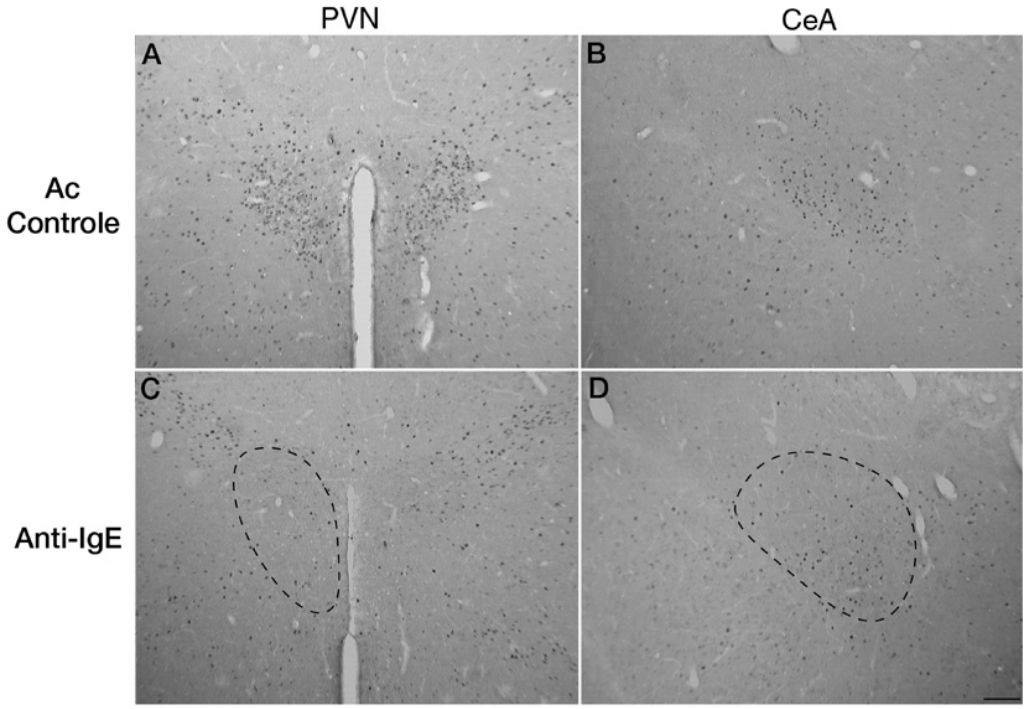

Figura 20 - IgE é essencial para a ativação do PVN e do CeA em camundongos alérgicos. Seções coronais de cérebro representando os dois grupos experimentais mostram intensa marcação para a proteína Fos em neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) **(A)** e do núcleo central da amígdala (CeA) **(B)** de animais imunizados tratados com o anticorpo controle (Ac Controle). Em contraste, núcleos positivos para Fos praticamente não foram observados no PVN **(C)** e no CeA **(D)** de animais imunizados que receberam o anticorpo anti-IgE (Anti-IgE). Barra de escala, 100 μm.

Confirmando as expectativas, o tratamento com anti-IgE foi capaz de reduzir os níveis séricos de IgE específica para OVA. Assim sendo, os níveis de IgE observados no grupo Anti-IgE foram semelhantes àqueles apresentados pelos animais não imunizados (NI), os quais são bem menores quando comparados àqueles verificados no grupo Ac controle (Figura 21A). Entretanto, pudemos observar que não houve diferença nos níveis séricos de IgG1 específica para OVA entre os animais imunizados tratados com anticorpo controle (Ac controle) e com anticorpo ani-IgE (Anti-IgE) (Figura 21B). O tratamento com o anticorpo anti-IgE, portanto, não interferiu com a produção de IgG1 específica para OVA.

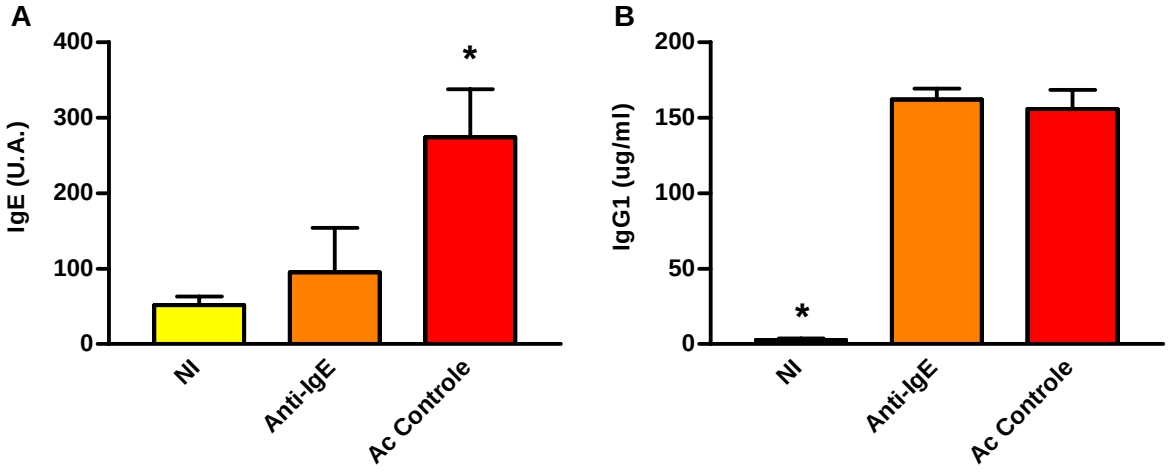

Figura 21 – Níveis séricos de IgG1 e IgE específicas para OVA após tratamento com anticorpo anti-IgE. **(A)** O tratamento de camundongos imunizados com o anticorpo anti-IgE bloqueou o aparecimento de IgE específica para OVA no soro. Enquanto os animais que receberam o anticorpo controle (Ac Controle) apresentaram altos títulos de IgE, naqueles tratados com o anticorpo anti-IgE verificamos títulos semelhantes àqueles observados nos camundongos não imunizados (NI). *n*=4-5 em cada grupo. * Diferença significante em relação aos demais grupos, ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer. Dados representados como média±desvio padrão. $F(2,10)=25,7$; $p<0,05$. **(B)** O tratamento com o anticorpo anti-IgE não interferiu com a produção de IgG1 específica para OVA. Animais tratados com o anticorpo anti-IgE apresentaram níveis séricos de IgG1 específica para OVA semelhantes àqueles verificados nos camundongos que receberam o anticorpo controle (Ac controle). * Diferença significante em relação aos demais grupos, ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer. Dados representados como média±desvio padrão. $F(2,10)=575,51$; $p<0,05$

5.6 De que modo a informação gerada a partir da reação alérgica chega ao SNC? Participação das fibras do tipo C.

Para investigar a participação das fibras do tipo C na transmissão da informação gerada pela reação alérgica até o SNC, fizemos uso do tratamento neonatal com capsaicina. A capsaicina é uma substância derivada da pimenta vermelha que sabidamente tem a capacidade de destruir as fibras do tipo C (HOLZER, 1991). Assim sendo, os animais foram tratados com capsaicina aos dois dias de idade e, posteriormente, quando adultos, foram imunizados (dias 0 e 14) e submetidos ao teste de preferência (dia 21). Já havíamos verificado que o tratamento neonatal com capsaicina, embora não tenha impedido o desenvolvimento da aversão à dieta contendo o antígeno, diminuiu a magnitude desta aversão (BASSO, 1999). Deste modo, apesar dos animais imunizados tratados com capsaicina (I+C) terem preferido água à solução doce contendo o antígeno, quando comparados com aqueles imunizados que receberam veículo (I+V), apresentaram um aumento da preferência pela solução de clara de ovo (Figura 22A). Este aumento ocorreu porque os camundongos imunizados tratados com capsaicina consumiram mais a solução contendo o antígeno, já que não houve diferença no consumo total entre os grupos I+C e I+V (Figura 22B). Os animais não imunizados tratados ou não com capsaicina apresentaram grande preferência pela solução adocicada de clara de ovo (Figura 22A).

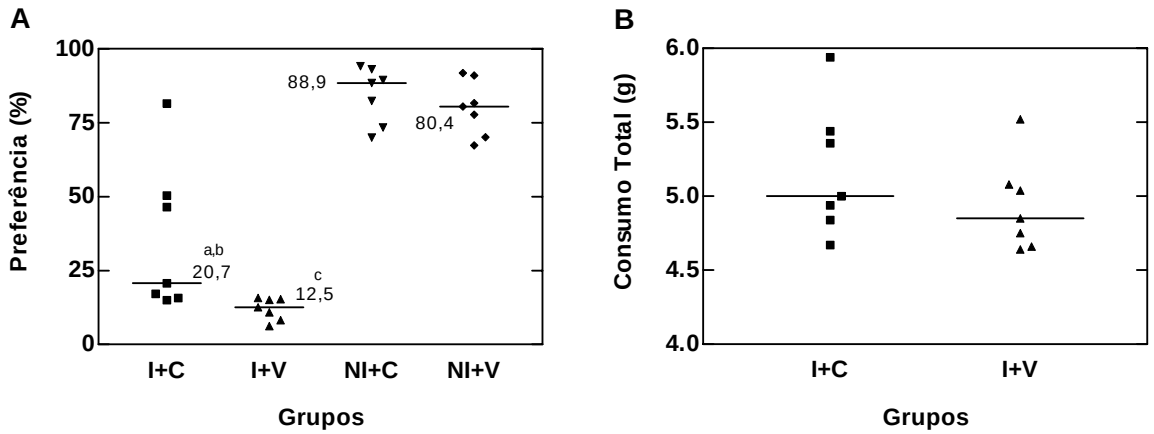

Figura 22 – Tratamento neonatal com capsaicina diminui a magnitude da aversão à dieta contendo o antígeno em camundongos alérgicos, mas não impede o seu desenvolvimento. **(A)** A preferência pela solução adocicada de clara de ovo de cada animal mostra que enquanto os camundongos não imunizados (NI+C e NI+V) preferiram ingerir a solução contendo OVA, os camundongos imunizados (I+C e I+V) desenvolveram aversão à dieta que contém o antígeno, preferindo água à solução adocicada de clara de ovo. Entretanto, o tratamento com capsaicina diminuiu a magnitude da aversão dos animais imunizados. Entre os camundongos imunizados, a preferência pela solução adocicada de clara de ovo foi maior naqueles tratados com capsaicina (I+C) do que naqueles que receberam o veículo (I+V). As barras horizontais representam as medianas. *n*=6-7 em cada grupo. ***a*** aumento em relação a I+V; ***b*** diminuição em relação a NI+C; ***c*** diminuição em relação a NI+V. Teste de Kruskall-Wallis seguido do teste de Kolmogorov-Smirnov, $p < 0,05$. **(B)** O consumo total de cada animal mostra uma distribuição de valores muito semelhante entre os grupos I+C e I+V . As barras horizontais representam as medianas. Adaptado de Basso (1999).

Esses dados foram agora replicados em um experimento totalmente independente, com maior número de animais em cada um dos grupos. Novamente, demonstramos que o tratamento neonatal com capsaicina foi capaz de promover um aumento da preferência de animais imunizados pela solução adocicada contendo o antígeno, diminuindo, portanto, a magnitude da aversão que ocorre em animais alérgicos (Figura 23A). Além disso, mais uma vez, não houve diferença no consumo total entre os grupos experimentais (Figura 23B).

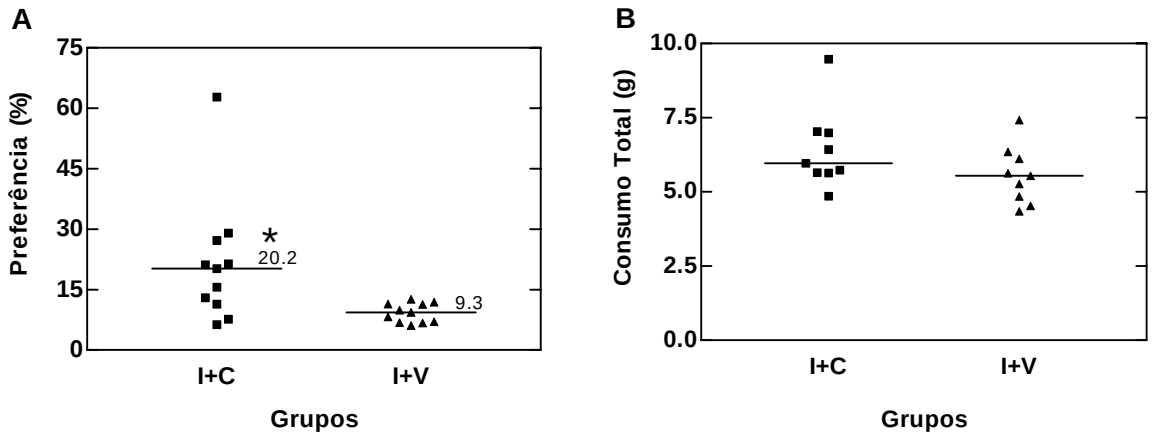

Figura 23 - Tratamento neonatal com capsaicina diminui a magnitude da aversão à dieta contendo o antígeno em camundongos alérgicos. **(A)** A preferência pela solução adocicada de clara de ovo de cada animal mostra que houve um aumento do consumo da solução contendo o antígeno quando comparamos os camundongos imunizados tratados com capsaicina (I+C) com aqueles imunizados que receberam apenas o veículo (I+V). As barras horizontais representam as medianas. *n*=11 em cada grupo. * Aumento em relação ao grupo I+V, teste de Mann-Whitney, p <0,05. **(B)** O consumo total de cada animal mostra uma distribuição de valores muito semelhante entre os grupos I+C e I+V. As barras horizontais representam as medianas.

Para avaliar a eficiência do tratamento neonatal com capsaicina em destruir as fibras do tipo C, imediatamente após o término do teste de preferência, os animais tiveram a sensibilidade visceral quantificada por meio do teste de contorções abdominais. Verificamos que, apesar da aparente grande diferença na susceptibilidade individual, o tratamento com capsaicina diminuiu a sensibilidade dolorosa dos animais injetados com ácido acético (IP) (Figura 24).

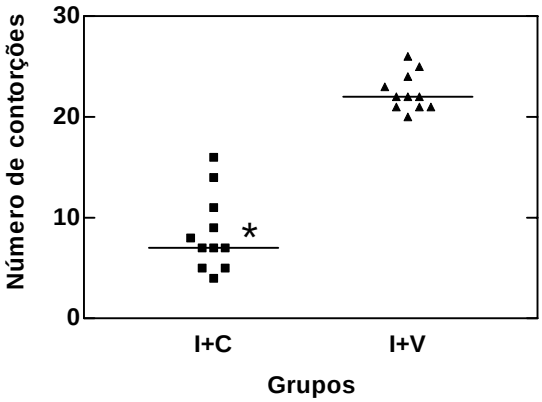

Figura 24 – Tratamento neonatal com capsaicina diminui sensibilidade à dor visceral. Após injeção de ácido acético, animais tratados com capsaicina (I+C) apresentaram menor número de contorções do que aqueles que receberam veículo (I+V). As barras horizontais representam as medianas. *n*=11 em cada grupo. * Diminuição em relação ao grupo I+V, teste de Mann-Whitney, p <0,05.

Fazendo uso do tratamento neonatal com capsaicina, além de evidenciarmos a participação das fibras do tipo C na manifestação da aversão à dieta contendo o antígeno, pudemos constatar que estas fibras também constituem parte das vias responsáveis pela ativação do SNC em animais com alergia alimentar. Observando a figura 25, em primeiro lugar, verificamos que a alergia alimentar, além de promover a ativação do PVN e do CeA, também provoca a ativação do núcleo do trato solitário (NTS). Assim sendo, o número de neurônios positivos para Fos no NTS de animais imunizados (dias 0 e 14) e desafiados com o antígeno por via oral (dia 21) (I+V) foi bem superior àquele contabilizado nos animais não imunizados (NI) e nos não manipulados (naive) (Figuras 25C e 26). O tratamento com capsaicina, apesar de diminuir a expressão de *c-fos* induzida pela alergia alimentar no NTS, não a bloqueou totalmente. Deste modo, embora o número de células marcadas para Fos no NTS de camundongos imunizados tratados com capsaicina (I+C) ter sido menor do que aquele verificado nos imunizados que receberam veículo (I+V), ele ainda foi maior do que o contabilizado nos animais não imunizados (NI) e nos não manipulados (naive) (Figuras 25C e 26). Além disso, vimos que o tratamento neonatal com capsaicina bloqueou completamente a ativação do PVN. Logo, enquanto evidenciamos uma intensa marcação para Fos no PVN de animais imunizados que receberam veículo, praticamente não observamos células positivas para Fos nesta região de animais imunizados tratados com capsaicina (I+C), de camundongos não imunizados (NI) e dos não manipulados (naive) (Figuras 25A e 27). Entretanto, o mesmo tratamento não modificou a expressão de *c-fos* induzida pela alergia alimentar no CeA. Não observamos diferenças no número de neurônios positivos para Fos presentes nesta região entre animais imunizados tratados com capsaicina (I+C) ou veículo (I+V) (Figuras 25B e 28). Os dados demonstram que, em parte, as fibras do tipo C são responsáveis pela transmissão da informação gerada pela alergia alimentar para o SNC, especialmente para o PVN e, em menor grau, para o NTS.

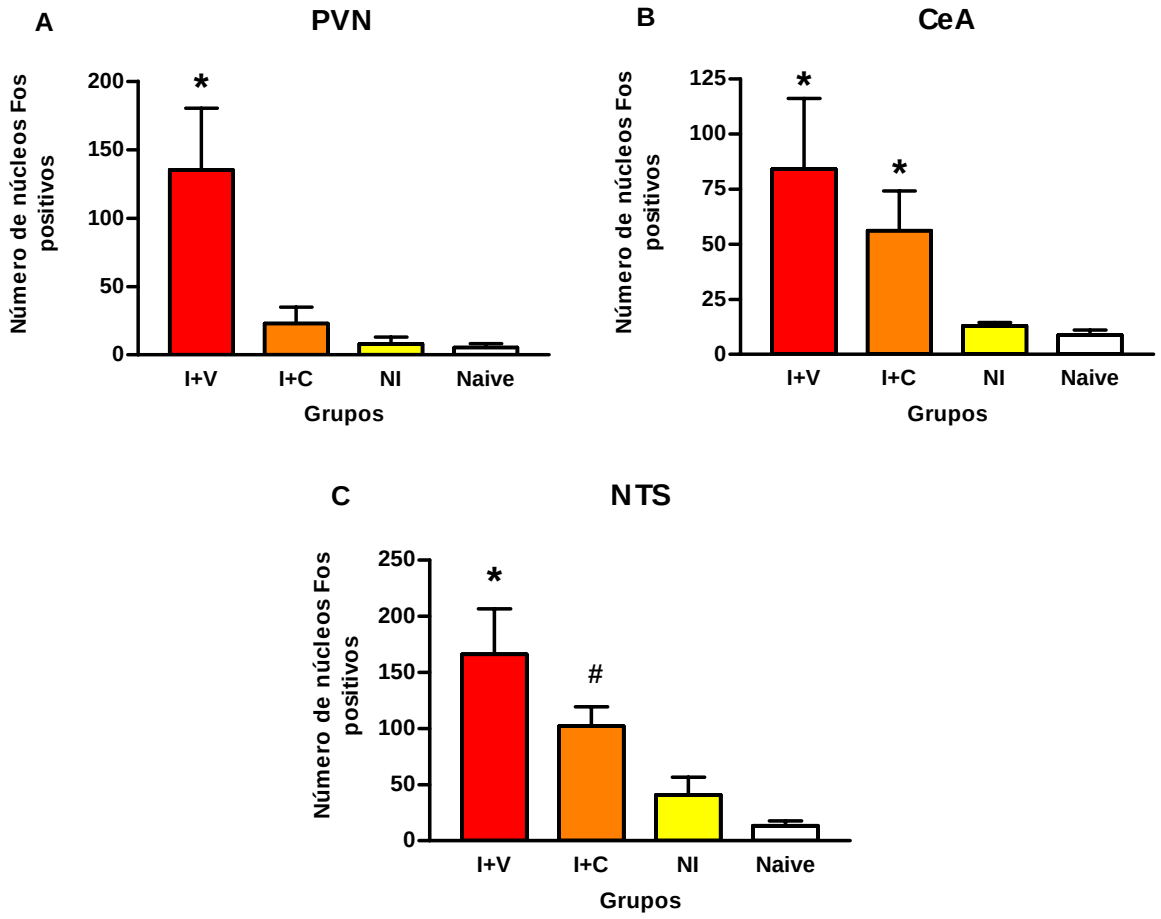

Figura 25 – Efeito do tratamento neonatal com capsaicina sobre a expressão de *c-fos* no cérebro de camundongos com alergia alimentar. **(A)** Tratamento neonatal com capsaicina aboliu a expressão de *c-fos* induzida pela alergia alimentar no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) de animais imunizados. Enquanto camundongos imunizados que receberam veículo (I+V) apresentaram um grande número de neurônios positivos para Fos após desafio oral com o antígeno, aqueles tratados com capsaicina (I+C) apresentaram poucos núcleos marcados para Fos, de modo semelhante ao observado nos camundongos não imunizados (NI) e nos não manipulados (naive). *n*=4 por grupo. * Diferença significante em relação aos demais grupos, ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer. Dados representados como média±desvio padrão. $F(3,12)=28,1$; $p<0,05$. **(B)** Tratamento com capsaicina não interfere com a expressão de *c-fos* no núcleo central da amígdala (CeA). O número de núcleos positivos para Fos não difere entre I+V e I+C. *n*=4 por grupo. * Aumento em relação aos grupos NI e naive, ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer. Dados representados como média±desvio padrão. $F(3,12)=15,4$; $p<0,05$. **(C)** Tratamento com capsaicina diminui, mas não bloqueia totalmente a expressão de *c-fos* induzida pela alergia alimentar no núcleo do trato solitário (NTS). A intensidade da marcação para Fos observada no grupo I+C é menor do que aquela verificada em I+V, mas ainda é maior quando comparada àquela apresentada pelos grupos NI e naive. *n*=4 por grupo. * Aumento em relação aos demais grupos. # Aumento em relação aos grupos NI e naive, ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer. Dados representados como média±desvio padrão. $F(3,12)=33,9$; $p<0,05$. A expressão de *c-fos* foi avaliada 90 minutos depois do desafio por via oral.

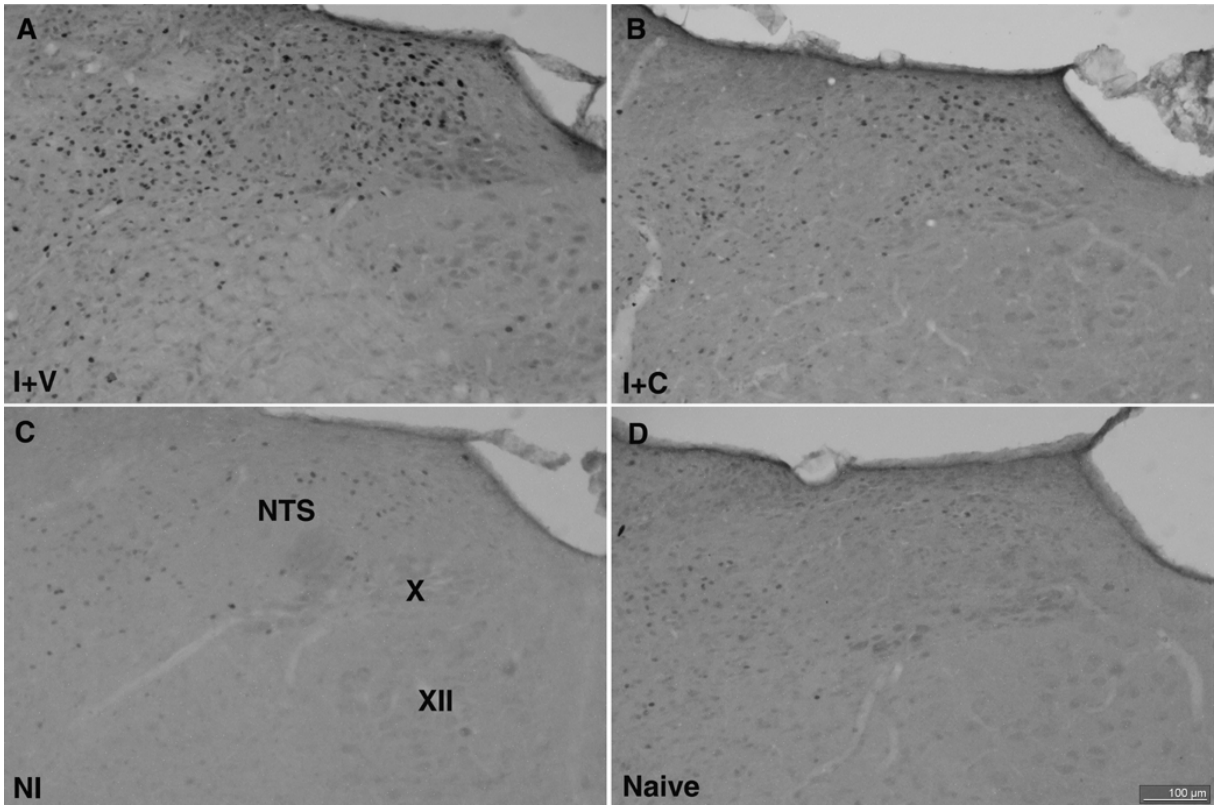

Figura 26 - Efeitos do tratamento neonatal com capsaicina sobre a expressão de *c-fos* induzida pela alergia alimentar no NTS. Seções coronais de cérebro representando os quatro grupos experimentais mostram que o tratamento com capsaicina, embora tenha diminuído, não bloqueou totalmente a expressão de *c-fos* no núcleo do trato solitário (NTS) de camundongos alérgicos. **(A)** animais imunizados que receberam veículo, **(B)** camundongos imunizados tratados com capsaicina, **(C)** animais não imunizados e **(D)** camundongos não manipulados (naive). X, núcleo motor do nervo vago; XII núcleo do hipoglosso.

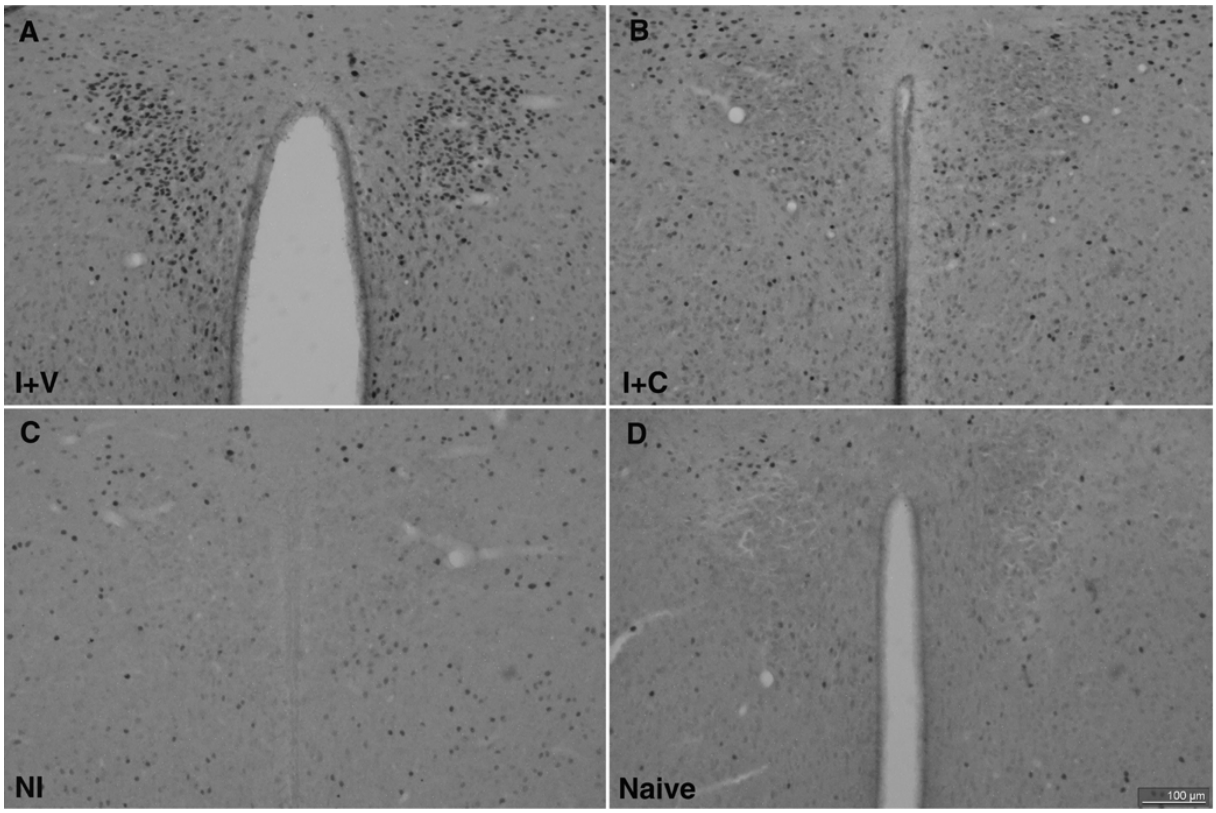

Figura 27 – Efeitos do tratamento neonatal com capsaicina sobre a expressão de *c-fos* induzida pela alergia alimentar no PVN. Seções coronais de cérebro representando os quatro grupos experimentais mostram intensa marcação para a proteína Fos em neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) de camundongos imunizados que receberam veículo **(A)**. Em contraste, núcleos positivos para Fos praticamente não foram observados nos animais imunizados tratados com capsaicina (I+C) **(B)**, nos não imunizados (NI) **(C)** e nos camundongos não manipulados (naive) **(D)**.

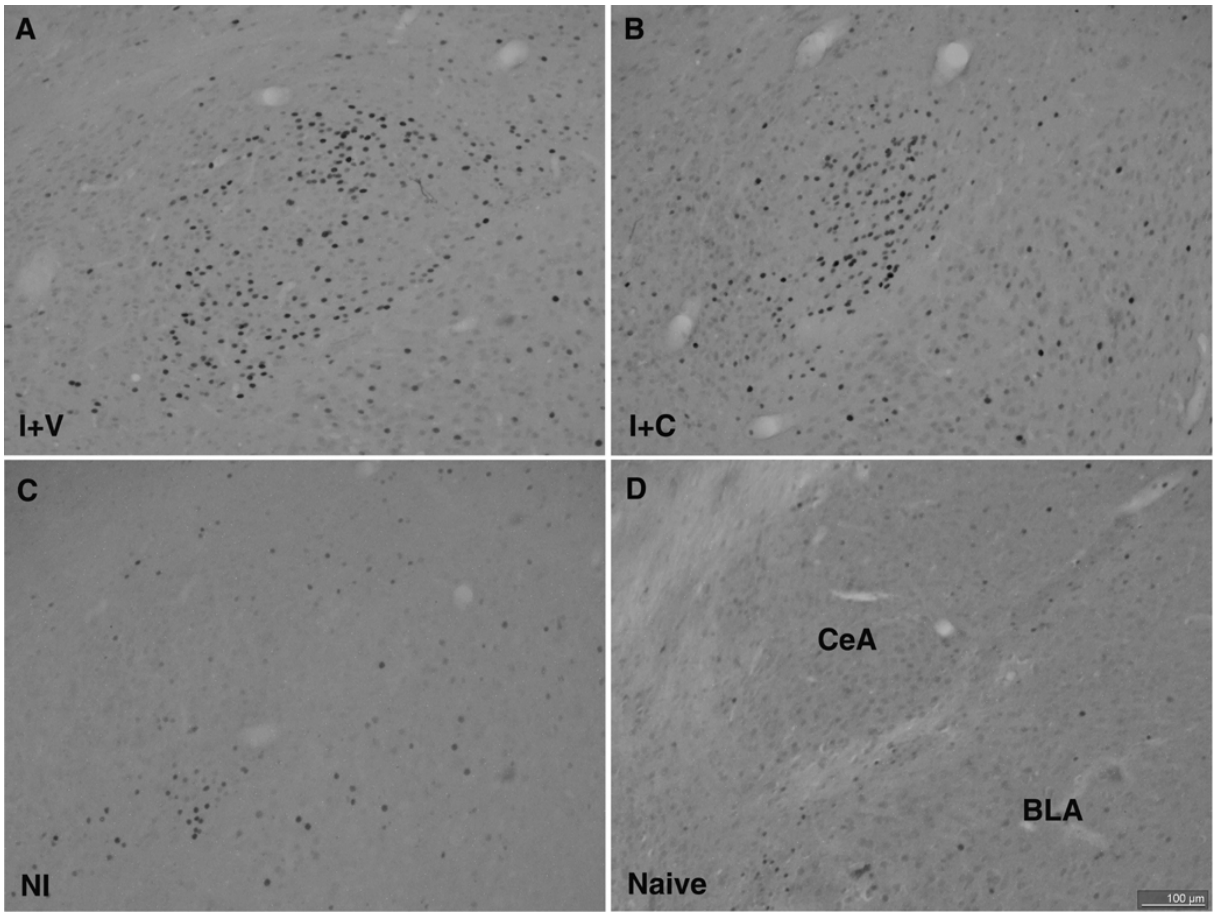

Figura 28 - Efeitos do tratamento neonatal com capsaicina sobre a expressão de *c-fos* induzida pela alergia alimentar no CeA. Seções coronais de cérebro representando os quatro grupos experimentais mostram intensa marcação para a proteína Fos em neurônios do núcleo central da amígdala (CeA) de camundongos imunizados que receberam veículo **(A)** e daqueles tratados com capsaicina **(B)**. Em contraste, núcleos positivos para Fos praticamente não foram observados nos camundongos não imunizados (NI) **(C)** e nos não manipulados (naive) **(D)**. BLA, núcleo basolateral da amígdala.

6 DISCUSSÃO

Os presentes resultados demonstram que 1 – uma reação alérgica é capaz de modular o comportamento alimentar de camundongos, isto é, animais sensibilizados com OVA, frente à opção de ingerir água ou uma solução adocicada de clara de ovo, desenvolvem uma aversão ao antígeno presente na dieta; 2 – camundongos com alergia alimentar apresentam maiores níveis de ansiedade quando observados no labirinto em cruz elevado e maiores níveis séricos de corticosterona uma hora após desafio oral com o antígeno; 3 – a reação alérgica no trato gastrointestinal leva à ativação de neurônios capazes de produzir CRF localizados em áreas específicas do SNC, tais como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e o núcleo central da amígdala (CeA); 4 – a alergia alimentar também induz a ativação do núcleo do trato solitário (NTS); 5 - animais tolerantes para o antígeno presente na dieta deixam de produzir anticorpos específicos para tal antígeno e não desenvolvem mais a aversão à solução adocicada de clara de ovo; 6 – animais tolerantes para a OVA não mais apresentam ativação dos núcleos paraventricular do hipotálamo (PVN) e central da amígdala (CeA) após a ingestão forçada de solução de clara de ovo; 7 – o tratamento com anticorpo anti-IgE é capaz de evitar a presença de IgE anti-OVA no soro, mas não a de IgG1. Além disso, este tratamento impede o desenvolvimento da aversão à solução adocicada de clara de ovo e a ativação do PVN e do CeA induzida pela alergia alimentar. 8 - o tratamento neonatal com capsaicina aumenta a preferência de animais imunizados pela solução adocicada contendo o antígeno e apesar de não interferir na ativação do CeA, impede a ativação do PVN em decorrência da ingestão do antígeno por animais imunizados. Além disso, o tratamento neonatal com capsaicina diminui a ativação do NTS após a reação alérgica no trato gastrointestinal. Os dados oriundos dos experimentos em que fizemos uso do tratamento neonatal com capsaicina indicam uma

participação das fibras sensitivas do tipo C na transmissão de informações ao SNC a partir da resposta alérgica no intestino de camundongos.

Para explorar as alterações provocadas por uma reação alérgica no SNC e no comportamento, fizemos uso de um modelo experimental no qual camundongos sensibilizados com OVA, frente à opção de ingerir água ou uma solução adocicada de clara de ovo, desenvolvem uma aversão ao antígeno presente na dieta (CARA; CONDE; VAZ, 1994). Desta forma, confirmando dados anteriores (CARA; CONDE; VAZ, 1994), mostramos aqui, por diversas vezes, que enquanto animais não sensibilizados preferem ingerir a solução adocicada, os camundongos imunizados, embora atraídos pelo seu sabor adocicado, passam a preteri-la e evitam o seu consumo, ingerindo preferencialmente água (Figura 3A). Este modelo, portanto, ao demonstrar que a seleção de uma dieta é influenciada pela imunização, evidencia com clareza a participação do sistema imune no comportamento alimentar e, desta forma, a relevância da área de neuroimunomodulação.

O paradigma embutido neste modelo de teste de preferência certamente envolve uma situação de conflito, na qual, como dissemos, é oferecida ao animal imunizado a opção de ingerir uma solução pela qual ele tem preferência (pelo seu sabor adocicado) e que, no entanto, contém o antígeno ao qual foi sensibilizado. A decisão a ser tomada envolve a ingestão ou não de uma dieta que, apesar de supostamente prazerosa, leva aos sintomas decorrentes da alergia. As situações de conflito são determinadas pela presença de forças motivacionais opostas; tais como o ato de pressionar uma barra realizado por um rato que assim recebe comida, contra a aversão ao choque associado a este mesmo ato. Modelos experimentais como este, que geram situações de conflito, são amplamente utilizados para o estudo da ansiedade e de fármacos ansiolíticos e ansiogênicos (MILLAN; BROCCO, 2003). O uso de alguns ansiolíticos favorece o ato de pressionar a barra, mesmo havendo o estímulo aversivo do choque (MILLAN; BROCCO, 2003). Seguindo esta linha de pensamento,

pareceu-nos pertinente testar a hipótese de que a mesma reação alérgica que leva ao desenvolvimento da aversão ao antígeno quando os animais são submetidos à situação de conflito embutida no teste de preferência, leva também os animais a apresentarem maiores níveis de ansiedade. O desafio antigênico por via oral demonstrou, em camundongos observados no labirinto em cruz elevado, que a reação alérgica é capaz de aumentar os níveis de ansiedade nos animais sensibilizados. Assim sendo, os camundongos alérgicos, quando comparados aos controles apropriados, passaram menos tempo explorando os braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE). Os dados bioquímicos corroboram os resultados comportamentias, logo, também verificamos que animais imunizados com OVA apresentaram maiores níveis séricos de corticosterona uma hora após o desafio oral com o antígeno. É importante notar que não houve diferença no tempo gasto na exploração dos braços abertos do LCE entre os animais não manipulados (naive) e aqueles dos grupos I+A e NI+O (Figura 4A); este fato descarta a possibilidade de ser o efeito comportamental observado decorrente da manipulação e/ou da gavagem. O mesmo raciocínio é válido para o experimento em que avaliamos os níveis séricos de corticosterona; também não houve diferenças entre os camundongos não manipulados (naive) e aqueles dos grupos I+A e NI+O (Figura 12). Além disso, o desafio com o antígeno por via oral não alterou a atividade geral de camundongos sensibilizados quando observados no campo aberto, o que indica que o comportamento destes animais no LCE não deve ser atribuído a uma redução inespecífica da atividade locomotora, o que alguns poderiam imaginar ocorrer em função da alergia alimentar.

Buscando impedir o desenvolvimento da aversão observada nos animais imunizados, Cara (1995) utilizou diversas manipulações farmacológicas. A associação de mepiramina (antagonista de receptores de histamina H-1) e metisergide (antagonista dos receptores 1 e 2 da serotonina), o uso de indometacina (anti-inflamatório não esteroidal), de dipirona (antiálgico), de WEB 2170 (antagonista de PAF) ou de NDGA (inibidor da cicloxigenase e

lipoxigenase) não foram capazes de fazer com que os animais imunizados passassem a ingerir preferencialmente a solução de clara de ovo. No entanto, aquele trabalho (CARA, 1995) mostrou que a associação de mepiramina e metisergide e o uso de NDGA foram capazes de reduzir o aumento da permeabilidade vascular observado na mucosa intestinal dos animais imunizados que ingeriram a solução contendo o antígeno. Os dados referentes às manipulações farmacológicas utilizadas por Cara (1995) indicam, assim, que o desenvolvimento da aversão que caracteriza este modelo não deve ser explicado apenas por meio de conseqüências gastrointestinais da resposta alérgica, tais como: edema da mucosa intestinal e náusea. Assim, ficam as perguntas: de que forma uma resposta imune caracterizada pela produção de anticorpos anafiláticos específicos é capaz de gerar uma informação que seja de utilidade para o SNC? Quais mudanças essa informação é capaz de provocar no SNC de um animal, de forma tal, que sejam relevantes na elaboração de uma resposta comportamental?

Passamos então a investigar, por meio da análise da expressão de *c-fos*, que áreas do cérebro estariam ativadas em decorrência da alergia alimentar e de que modo esta eventual ativação poderia explicar as mudanças comportamentais por nós observadas após a reação alérgica no intestino, quais sejam, desenvolvimento de aversão à dieta contendo o antígeno e maiores níveis de ansiedade.

Os dados mostram de modo inequívoco que a reação alérgica causada pela ingestão do antígeno em animais imunizados com OVA induz à ativação de regiões específicas do SNC. Em particular, encontramos maior expressão de *c-fos* no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e no núcleo central da amígdala (CeA). Vale lembrar que esta ativação parece mesmo ser específica, já que não encontramos, por exemplo, maior expressão de *c-fos* em outras regiões do próprio hipotálamo (dados não mostrados), entre as quais estão aquelas envolvidas com o controle da ingestão. Também não foram verificadas quaisquer alterações no consumo

total entre os diferentes grupos experimentais. Além disso, a presença de nutrientes na luz intestinal, por si só, é capaz de ativar áreas específicas do SNC (RAYBOULD, 2002). A ativação por nós observada, poderia, portanto, ser fruto da simples ingestão da solução de clara de ovo. No entanto, esta possibilidade pode ser descartada pelo fato de que o número de células positivas para Fos nos animais não imunizados que ingeriram a solução contendo o antígeno (NI+O) não foi diferente daquele evidenciado por nós nos animais não manipulados (naive) e nos imunizados que receberam água (I+A) (Figura 5).

Maiores níveis de ansiedade e desenvolvimento de aversão à dieta contendo o antígeno caracterizam a expressão de comportamentos de natureza emocional/afetiva. Será que a ativação agora verificada poderia explicar alterações comportamentais tais como essas? De fato, a ativação de áreas do cérebro tais como o PVN e o CeA, constatada pela maior expressão de *c-fos*, demonstra que a reação alérgica provoca alterações no SNC que são compatíveis com a expressão de comportamentos desta natureza (emocional/afetiva). O PVN e o CeA são duas das principais áreas do SNC contendo neurônios que expressam o fator liberador de corticotrofina (CRF), hormônio este considerado central na orquestração de respostas adaptativas relacionadas ao estresse (GRAY, 1993; GRAY; BINGAMAN, 1996; SWANSON et al., 1983). Sabe-se, por exemplo, que uma das principais respostas endócrinas relacionadas a uma situação de medo/ansiedade é a ativação do eixo hipotálamo-pituitária (hipófise)-adrenal (HPA). É por meio da ativação deste eixo que ocorre o aumento dos níveis séricos de glicocorticóides característico das situações de estresse (RIVIER et al., 1982). Nesse sentido, o CRF produzido por neurônios localizados no núcleo paraventricular do hipotálamo é liberado na região da eminência mediana e atinge a adeno-hipófise através do sistema porta hipofisário. O CRF, dessa forma, estimula a produção e liberação de ACTH pela adeno-hipófise. Por sua vez, o ACTH liberado pela hipófise, chega à adrenal através da

corrente sangüínea e estimula a produção de glicocorticóides. O núcleo paraventricular do hipotálamo, portanto, em função da produção do CRF, é peça chave na estimulação do eixo.

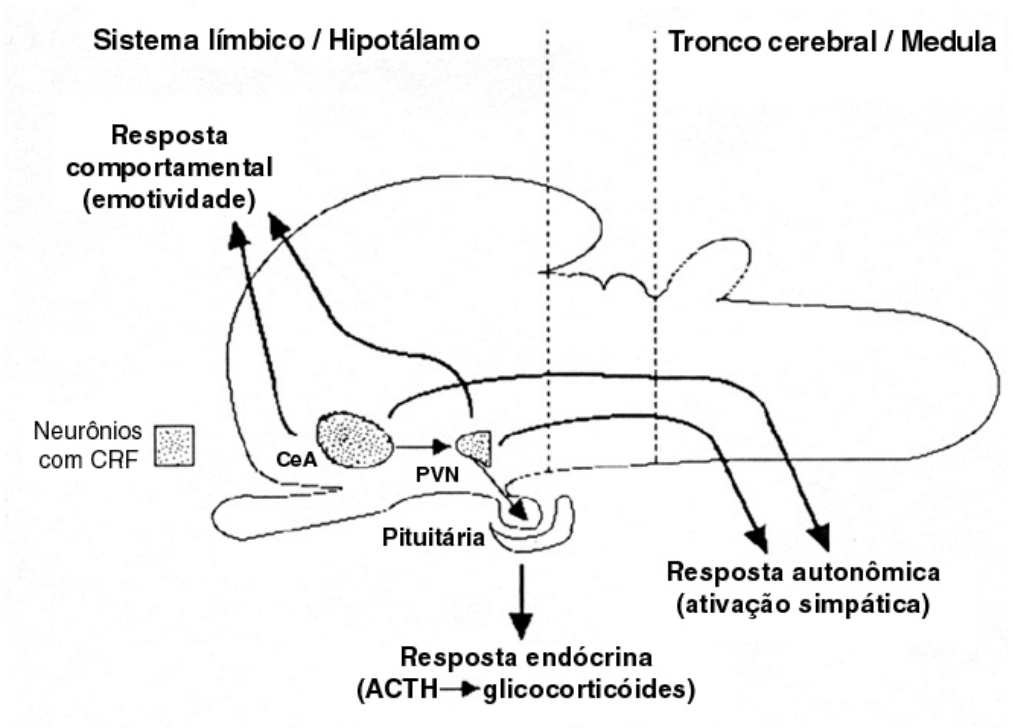

Figura 29 – Áreas do SNC contendo neurônios que expressam fator liberador de corticotrofina (CRF). Ilustração de corte sagital de cérebro na qual estão representadas as duas principais regiões contendo neurônios que expressam CRF. A ativação destas áreas leva a respostas endócrinas (ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal), neurovegetativas (ativação do sistema nervoso simpático) e comportamentais. Adaptado de Menzaghi et al. (1993)

Além de ser importante na resposta endócrina, o CRF produzido no PVN e também no CeA está envolvido na elaboração de respostas comportamentais (Figura 29). Assim sendo, ratos submetidos a um modelo de estresse social e observados no labirinto em cruz elevado (LCE) passaram menos tempo explorando os braços abertos do LCE, fato este revertido pela injeção bilateral de α-hélice CRF_{9-41} (antagonista de CRF) no CeA (HEINRICHS et al., 1992). De modo similar, estudos fazendo uso de anticorpos conjugados a toxinas que visaram eliminar neurônios produtores de CRF no CeA e no PVN demonstraram que estes têm papel relevante na expressão de comportamentos associados à emotividade em ratos estressados expostos ao LCE (MENZAGHI et al., 1993). Outro dado que corrobora a participação do CRF na expressão de comportamentos ligados à ansiedade é aquele relatado por Liebsch et al.

(1995). Neste estudo, foi demonstrado que a infusão lenta (bombas osmóticas) de um oligonucleotídeo *antisense* para receptores de CRF do tipo 1 no núcleo central da amígdala é capaz de fazer com que ratos passem mais tempo explorando os braços abertos do labirinto em cruz elevado do que os animais do grupo controle (LIEBSCH et al., 1995). A ativação do CeA e do PVN também foi descrita em animais submetidos a um modelo de aversão condicionada ao sabor. Nesse sentido, foi relatado que uma injeção IP de cloreto de lítio, que neste modelo é utilizado como estímulo não condicionado, levou a um aumento na expressão de *c-fos* no CeA (YAMAMOTO et al., 1997) e no PVN (LAMPRECHT; DUDAI, 1995) de roedores. Yamamoto et al. (1997) também observaram que a reapresentação do estímulo condicionado (sacarina) um dia após a única sessão de pareamento com o estímulo não condicionado (injeção IP de cloreto de lítio) foi capaz de aumentar a expressão de *c-fos* no núcleo central da amígdala. Ademais, a ativação do núcleo central da amígdala parece variar de acordo com a magnitude do condicionamento; isto é, a expressão de *c-fos* neste núcleo é maior quando os animais passam por três sessões de pareamento (apresentação conjunta de estímulo condicionado e não condicionado) do que quando passam por apenas uma (NAVARRO et al., 2000). A importância da ativação do CeA neste modelo ficou ainda melhor caracterizada em outro estudo no qual se observou que a injeção de um oligonucleotídeo *antisense* para *c-fos* no núcleo central da amígdala prejudicou a aquisição da aversão condicionada ao sabor (LAMPRECHT; DUDAI, 1996). Efeito semelhante foi descrito em trabalho no qual se utilizou o teste de conflito de Vogel. Assim, Moller, Bing e Heilig (1994) observaram, por meio da expressão de *c-fos*, a ativação do CeA em ratos submetidos a este teste, no qual os animais anteriormente treinados para bater em uma barra para receber alimento passam a ser punidos por um choque ao executar tal procedimento. A injeção bilateral de um oligonucleotídeo *antisense* para *c-fos* no núcleo central da amígdala bloqueou a expressão de *c-fos* e exerceu um efeito sobre o comportamento dos animais que

foi similar àquele observado quando do uso de fármacos ansiolíticos, ou seja, facilitou a resposta punida no teste de conflito de Vogel (MOLLER; BING; HEILIG, 1994).

Alguns outros estudos também têm relatado a participação do CRF e dos núcleos paraventricular do hipotálamo (PVN) e central da amígdala (CeA) na elaboração de respostas adaptativas frente a estímulos imunológicos de outras naturezas. Nesse sentido, após a estimulação de linfócitos T com enterotoxina B de estafilococos (SEB) observou-se, além da expressão de comportamentos relacionados à emotividade, um aumento na quantidade de RNAm para CRF no PVN e no CeA de camundongos (KUSNECOV; LIANG; SHURIN, 1999). De modo semelhante, a presença de imunorreatividade para Fos nestas mesmas áreas também foi descrita após o desafio de camundongos com SEB (GOEHLER et al., 2001). Por fim, eventos imunológicos desencadeados logo após a imunização com um antígeno dependente de células T (KLH – *Keyhole limpet hemocyanin*) também promoveram aumento da expressão de *c-fos* na PVN e no CeA (PACHECO-LOPEZ et al., 2002).

Em conjunto, os dados referentes a modelos animais e também os obtidos em seres humanos (MORRIS; OHMAN; DOLAN, 1998; RAADSHEER et al., 1994) ressaltam a importância destas áreas e do CRF na experiência de sensações de ordem afetiva. Logo, tornou-se natural a busca no presente trabalho de uma caracterização neuroquímica da ativação do PVN e do CeA após a ingestão do antígeno por animais sensibilizados. Para tanto, procedemos a uma dupla marcação que nos possibilitou visualizar os núcleos positivos para Fos, por meio da imunoistoquímica, e de transcritos (RNAm) para CRF, por meio de hibridização *in situ*. De fato, constatamos que em animais alérgicos, os neurônios expressando *c-fos*, tanto no PVN quanto no CeA, são capazes de produzir CRF (Figura 11). Além disso, como já comentado, observamos que animais imunizados com OVA apresentaram níveis elevados de corticosterona uma hora após desafio com o antígeno por via oral, este fato indica que a alergia alimentar leva à ativação do eixo HPA (Figura 12). Como mencionado acima, o

CRF produzido no PVN é importante para que esta ativação ocorra. Sendo assim, é possível que a produção deste neuropeptídeo por neurônios do PVN e do CeA seja um importante mecanismo para a expressão de comportamentos ligados à emotividade (ansiedade e aversão) em animais com alergia alimentar.

Ao nos debruçarmos sobre este modelo, outra pergunta foi: de que modo a reação alérgica gera a informação a ser transmitida ao SNC? Em outras palavras, quais mecanismos efetores desta resposta imune são importantes para que ocorram as alterações comportamentais e a ativação de áreas específicas do cérebro? Os anticorpos específicos parecem ser fundamentais para que os mecanismos efetores da resposta ao desafio sejam eliciados e para que, em sua decorrência, haja a alteração comportamental, isto é, a aversão à solução adocicada de clara de ovo. Segundo Cara (1995), a aversão parece surgir concomitantemente ao aparecimento desses anticorpos no soro dos animais, cerca de 14 dias após a imunização (dia 0). Além disso, foi demonstrado ser possível reproduzir o desenvolvimento da aversão pela dieta contendo o antígeno em animais normais que receberam soro de animais hiperimunes (CARA, 1995). Sendo assim, investigamos se a indução de tolerância oral à OVA seria capaz de prevenir o desenvolvimento da aversão. Confirmando dados anteriores (CARA; CONDE; VAZ, 1994) e fortalecendo a idéia de que o sistema imune pode modular o comportamento alimentar, observamos que camundongos expostos, por cinco dias consecutivos, a uma solução de OVA a 1% na água de bebida não desenvolveram aversão à dieta contendo o antígeno. Ao contrário, os animais tolerantes, de modo semelhante aos camundongos não imunizados, apresentaram forte preferência pela solução adocicada de clara de ovo (Figura 13A). Vale lembrar que o consumo total (solução adocicada de clara de ovo + água) não foi diferente entre animais imunizados, não imunizados e tolerantes (Figura 13B), o que demonstra que a redução de preferência pela solução contendo o antígeno apresentada pelos camundongos imunizados ocorreu em função da

menor ingestão de solução adocicada de clara de ovo e maior consumo de água. A indução de tolerância oral, além de evitar o desenvolvimento da aversão ao antígeno, também impediu a ativação do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e do núcleo central da amígdala (CeA) (Figura 14). Estes achados fortalecem a sugestão de que a ativação destas áreas esteja relacionada com o desenvolvimento da aversão pelo antígeno em camundongos imunizados.

Vale ressaltar neste momento que a tolerância oral é um fenômeno imunológico no qual, após ingestão prévia de um antígeno, parâmetros da resposta imune específica a este antígeno são suprimidos. De fato, neste experimento, pudemos observar que o protocolo de indução de tolerância foi capaz de suprimir a produção de anticorpos específicos ao antígeno presente na dieta. Vê-se na figura 17 que os níveis de IgE e de IgG1 específicas para OVA medidos nos animais tolerantes equivalem àqueles apresentados pelos camundongos não imunizados, sendo bem menores que aqueles observados nos imunizados.

Sabe-se do envolvimento de duas fases distintas mas relacionadas na ocorrência de reações alérgicas: uma fase imediata mediada por IgE e pelos mastócitos e uma fase tardia mediada por eosinófilos e linfócitos Th2 (SENGOKU et al., 2001). Como o efeito ansiogênico e a ativação das áreas cerebrais foram observados pouco tempo depois do desafio antigênico, (60 e 90 minutos após, respectivamente), suspeitamos que pudesse haver um envolvimento da fase imediata da resposta alérgica na mediação destes eventos. A indução de tolerância oral foi uma das formas encontradas para testar esta hipótese. Como comentado acima, verificamos nos animais tolerantes uma supressão da produção de IgG1 e IgE específicas para OVA e, como esperado, estes animais não desenvolveram aversão à solução contendo o antígeno e tão pouco apresentaram ativação de áreas do SNC. Contudo, já fora demonstrado anteriormente que a indução de tolerância oral em camundongos, por meio da ingestão (prévia à imunização) de uma solução de OVA a 1%, é capaz de suprimir parâmetros relacionados tanto à fase imediata quanto à fase tardia de respostas alérgicas associadas ao

padrão Th2 (RUSSO et al., 2001). Assim sendo, a indução de tolerância oral em diferentes linhagens de camundongos foi eficiente em diminuir o infiltrado de eosinófilos no parênquima pulmonar, diminuir a hiperreatividade brônquica e a produção de muco em modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar (RUSSO et al., 2001). O fato destes sinais característicos da asma estarem ausentes (ou diminuídos) nos animais tolerantes parece estar relacionado com a supressão de mecanismos efetores da resposta imune que determina a fisiopatologia desta doença. Logo, os autores deste trabalho observaram que os animais tolerantes apresentaram não só menores níveis de IgE e IgG1 específicas para OVA no soro (fase imediata), como também menores quantidades de interleucinas relacionadas ao padrão Th2 (IL-4 e IL-5) no lavado brônquio-alveolar (RUSSO et al., 2001). Considerando estas últimas informações, e apesar dos indícios temporais, o experimento em que induzimos tolerância oral não podia por si só confirmar o envolvimento da fase imediata da reação alérgica, caracterizada pela presença dos anticorpos anafiláticos.

Assim, para melhor testarmos a hipótese de que a fase imediata, ou seja, os anticorpos (e não outro parâmetro da resposta imune específica ao antígeno da dieta) fossem os principais responsáveis pelas alterações provocadas pela alergia alimentar neste modelo, delineamos um experimento no qual fizemos uso de um anticorpo anti-IgE para suprimir especificamente este parâmetro da resposta imune dos camundongos sensibilizados com OVA. O tratamento com anti-IgE foi eficiente em reduzir os níveis séricos de IgE dos animais imunizados. Deste modo, vê-se na figura 21 que os níveis de IgE medidos nos camundongos que receberam o anticorpo anti-IgE equivalem àqueles apresentados pelos não imunizados, sendo bem menores que os verificados nos animais tratados com o anticorpo controle. Os dados também mostram a especificidade do tratamento com este anticorpo. Logo, apesar de ter suprimido os níveis de IgE, o tratamento com o anticorpo anti-IgE não alterou os níveis de IgG1 dos animais imunizados. Podemos observar na figura 21 que os níveis séricos de IgG1

não diferem entre os camundongos que receberam o anticorpo controle e os que foram tratados com o anticorpo anti-IgE. Da análise da figura18 depreende-se que o tratamento com o anticorpo anti-IgE, realizado sete dias antes do teste de preferência, bloqueou totalmente o desenvolvimento da aversão à solução adocicada contendo o antígeno. Sendo assim, os camundongos tratados com este anticorpo, de modo semelhante àqueles não imunizados e ao contrário dos que receberam o anticorpo controle, apresentaram forte preferência pela solução adocicada de clara de ovo. Além disso, demonstramos que o mesmo tratamento com o anticorpo anti-IgE foi capaz de impedir a ativação do PVN e do CeA (Figuras 19 e 20) noventa minutos depois do desafio oral com o antígeno em animais imunizados. Em conjunto, os dados referentes aos experimentos em que tratamos animais imunizados com o anticorpo anti-IgE mostram claramente a importância da fase imediata e de mecanismos dependentes de IgE no desenvolvimento da aversão a componentes da dieta e na ativação de áreas específicas do SNC em animais com alergia alimentar.

A demonstração da relevância da IgE no desenvolvimento das alterações observadas neste modelo experimental leva-nos a crer que a desgranulação de mastócitos seja um importante mecanismo na sinalização do cérebro pela alergia alimentar. Nesse sentido, sabe-se ser muito íntima a relação anatômica existente entre os mastócitos - dispostos ao longo dos vasos da mucosa intestinal - e as fibras nervosas positivas para substância P, peptídeo intestinal vasoativo e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, as quais são oriundas do plexo entérico e correm paralelas a esses vasos (STEAD et al., 1989; STEAD et al., 1987). Estudos de ultraestrutura, conduzidos por esses últimos autores demonstraram haver um contato membrana-membrana (20 nm) entre os mastócitos e os terminais nervosos destas fibras, ditas do tipo C. Há várias evidências experimentais que explicam essa estreita interação.

Sendo assim, já foi demonstrado haver alterações no transporte de íons através do epitélio intestinal após desafio com ovalbumina em animais sensibilizados (PERDUE; GALL, 1985, 1986). Os mesmos autores mostraram que essas alterações foram evitadas pelo pré-tratamento dos animais com doxantrole - substância que inibe a desgranulação de mastócitos de mucosa e serosa (PEARCE et al., 1982) - mas não com cromoglicato de sódio - que atua apenas em mastócitos de serosa (PEARCE et al., 1982). Ademais, o uso de tetrodotoxina demonstrou a importância das terminações nervosas na mediação do processo, uma vez que essas anormalidades no transporte iônico foram reduzidas nessa ocasião (PERDUE; DAVISON, 1986). A relação entre os neuropeptídeos liberados por terminais nervosos e a resposta desencadeada por um desafio antigênico também foi demonstrada em outros órgãos. Assim, por exemplo, já se mostrou que a substância P medeia o aumento de permeabilidade vascular observado na mucosa da bexiga de animais sensibilizados com ovalbumina e desafiados com o antígeno. A utilização de antagonistas de receptores NK1 e de capsaicina foi capaz de evitar o aumento de permeabilidade induzido pela substância P (AHLUWALIA et al., 1998).

Além de liberar substâncias que medeiam a resposta inflamatória no local em questão, as fibras nervosas sensitivas também parecem estar envolvidas na transmissão de informações geradas por essas respostas. Dessa forma, a aplicação IP de 10 μg de LPS em ratos, dose capaz de eliciar as alterações comportamentais, aumentou as concentrações de substância P, de neurocinina A e de peptídeo relacionado ao gene da calcitonina na coluna vertebral de uma forma dependente de prostaglandinas (KENT et al., 1996).

A existência de uma estreita relação anatômica entre mastócitos e fibras do tipo C, aliada ao fato da IgE desempenhar importante papel nas alterações que se seguem à alergia alimentar, fornecem subsídios para que abordemos mais uma importante questão: como a informação gerada pela resposta alérgica chega ao SNC? Formulamos então a hipótese de que

a liberação e/ou formação de mediadores químicos pela desgranulação de mastócitos, sensibilizados com IgE específica para o antígeno presente na dieta, poderia desencadear a informação a ser captada e transmitida até o SNC pelos terminais nervosos sensitivos justapostos a essas células. A esse respeito, já se observou a despolarização de neurônios em cocultura com mastócitos em conseqüência da presença de anticorpos anti-IgE e do composto 48/80, o qual faz com que os mastócitos desgranulem (JANISZEWSKI; BIENENSTOCK; BLENNERHASSETT, 1990).

Para testarmos esta hipótese, tratamos camundongos com capsaicina com o objetivo de destruir as fibras do tipo C e, desta forma, bloquear a eventual transmissão da informação gerada pela resposta imune. A capsaicina é uma substância derivada de uma planta produtora de pimenta, sendo amplamente utilizada com o intuito de destruir as fibras do tipo C. O tratamento com capsaicina sabidamente promove uma deficiência na percepção de modalidades sensoriais que dependem das fibras do tipo C (HOLZER, 1991). De fato, resultados anteriores por nós obtidos já haviam demonstrado que a destruição das fibras do tipo C por meio de um tratamento neonatal com capsaicina era capaz de aumentar a preferência de animais imunizados pela solução adocicada contendo o antígeno. Desse modo, observamos que animais imunizados tratados com capsaicina apresentaram um aumento de 65% na preferência pela solução adocicada de clara de ovo quando comparados a camundongos imunizados que receberam apenas veículo (BASSO; DE SA-ROCHA; PALERMO-NETO, 2001). Vale ressaltar que o tratamento com capsaicina foi capaz de minimizar a aversão dos animais à solução contendo o antígeno, mas não de evitar o desenvolvimento desta aversão. Sendo assim, os animais imunizados tratados com capsaicina seguiram ingerindo quantidades bem menores de solução de clara de ovo (cerca de 20%) se comparados aos animais não imunizados que também receberam a capsaicina (cerca de 88%). Salientamos também neste trabalho que o tratamento neonatal com capsaicina não interferiu

com a produção de IgG1 e IgE específicas para OVA, fato este que poderia interferir no desenvolvimento da aversão em animais imunizados (BASSO; DE SA-ROCHA; PALERMO-NETO, 2001).

Os dados agora apresentados replicam e fortalecem os achados anteriores e acima descritos. Os animais imunizados tratados neonatalmente com capsaicina apresentaram um aumento de 117% na preferência pela solução adocicada de clara de ovo quando comparados aos animais imunizados que receberam apenas veículo (Figura 23). Importante salientar, neste contexto, que isso ocorreu devido a um maior consumo de solução adocicada de clara de ovo, visto que não foram observadas quaisquer diferenças no consumo total (água + solução de clara) entre os camundongos dos dois grupos.

Desta forma, a maior preferência pela solução adocicada de clara de ovo apresentada pelos animais imunizados que tiveram as fibras do tipo C destruídas pelo tratamento neonatal com capsaicina parece sugerir a participação das mesmas na transmissão de pelo menos parte da informação gerada pela resposta imune.

Neste experimento utilizamos o teste de contorções abdominais após uma injeção IP de ácido acético 0,6% para testar a eficiência do tratamento com capsaicina. A escolha deste teste deveu-se ao fato de que, além de refletir a sensibilidade visceral frente a estímulos químicos, parece haver um envolvimento importante dos mastócitos na sinalização de tal sensibilidade (RIBEIRO et al., 2000). Deste modo, a redução do número de mastócitos residentes na cavidade peritoneal, por meio de lavagem com salina ou uso de um desgranulador de mastócitos (composto 48/80), diminui a sensibilidade visceral ao ácido acético e, consequentemente, o número de contorções abdominais (RIBEIRO et al., 2000). Como pudemos observar na figura 24, a sensibilidade dos animais tratados com capsaicina ao ácido acético é bem menor do que aquela dos animais que receberam o veículo. Além disso, verificou-se que a eficiência do tratamento neonatal com capsaicina variou bastante conforme

o indivíduo. Como os mesmos animais foram utilizados no teste de preferência e no teste de contorções abdominais, foi possível pesquisar a possível existência de uma correlação entre a preferência pela solução adocicada e a sensibilidade à dor provocada por estímulo químico. Constatamos a ausência de correlação significante entre a preferência pela solução contendo o antígeno e a sensibilidade visceral ao ácido acético (dados não apresentados), este dado parece indicar que a dor visceral pode não estar envolvida com o desenvolvimento da alteração comportamental em questão (aversão ao antígeno). Outro fato que pode sugerir a inexistência de participação da dor no estabelecimento da aversão agora observada foi a ausência de marcação positiva para Fos em células da região ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal (PAG) em animais imunizados que ingeriram o antígeno (dados não mostrados). De fato, a ativação desta área do SNC tem sido considerada como importante marcador da percepção da dor somática e visceral (KEAY et al., 2001; KEAY et al., 1994).

Para seguir explorando as vias responsáveis pela comunicação entre o SNC e a mucosa intestinal de um animal com alergia alimentar, resolvemos em seguida avaliar a ativação do cérebro em animais alérgicos tratados com capsaicina. Em primeiro lugar, adicionamos um fato novo e que contribui de modo importante para o entendimento da sinalização do cérebro a partir da alergia alimentar. Demonstramos aqui que a ingestão do antígeno por camundongos imunizados leva à ativação do núcleo do trato solitário (NTS). Na verdade, este é um resultado esperado, pois é sabido que o NTS recebe aferências vagais e espinhais (ALTSCHULER et al., 1989; MENETREY; BASBAUM, 1987). Os corpos celulares dos neurônios aferentes, vagais e espinhais, que carregam informações sensoriais a partir das vísceras estão localizados, respectivamente, nos gânglios nodosos e nos gânglios da raiz dorsal da medula espinhal. As projeções a partir do gânglio nodoso em direção ao cérebro atingem diretamente o NTS, enquanto que as fibras partindo do gânglio da raiz dorsal entram no corno dorsal da medula e fazem conexão com neurônios de segunda ordem, os quais, por

sua vez, projetam-se para o NTS (trato espino-solitário) (GRUNDY, 2002). Esta particularidade anatômica faz do NTS uma área importante no que diz respeito à integração de informações sensoriais e na elaboração de reflexos viscero-viscerais. Neste sentido, já foi demostrada a ativação do NTS de modo concomitante com alterações motoras do trato gastrointestinal em ratos sensibilizados com OVA e desafiados com o antígeno por meio de infusão intestinal (SCOTT et al., 1998; SCOTT; TAN; SHARKEY, 2000). Ao demonstrar que as fibras nervosas extrínsecas são necessárias tanto para a ativação do NTS quanto para a manifestação das alterações motoras do trato GI após uma reação anafilática no intestino, alguns destes estudos levantaram a possibilidade de que haja um importante papel modulador do SNC nas observações feitas a partir deste modelo experimental (SCOTT et al., 1998). Também já foi demonstrado que outros estímulos, tais como a presença de nutrientes na luz intestinal, a distensão mecânica de porções do intestino grosso ou a aplicação de solução ácida na mucosa gástrica, foram capazes de induzir a expressão de *c-fos* no NTS (MONNIKES et al., 2003; SCHULIGOI et al., 1998; ZITTEL et al., 1994).

Como já mencionado acima, o NTS recebe fibras aferentes tanto vagais quanto espinhais. Apesar de haver diversos estudos abordando as vias que provocam a ativação de áreas do tronco cerebral a partir de uma reação alérgica no intestino, esse tema ainda é bastante controverso. Alguns autores têm sugerido que as fibras vagais são essenciais para que ocorram a ativação do NTS e a resposta motora do intestino em decorrência da desgranulação de mastócitos. De fato, há estudos demonstrando que o tratamento perivagal com capsaicina foi capaz de eliminar a expressão de *c-fos* no NTS e a resposta motora do intestino em ratos sensibilizados com OVA e desafiados com o antígeno (CASTEX et al., 1995). Entretanto, estes achados não foram confirmados por outros estudos. Deste modo, há relatos de que a vagotomia subdiafragmática, além de não evitar as alterações na motilidade intestinal, também não modificou a intensidade da imunorreatividade para Fos no tronco

cerebral de ratos submetidos a modelo de anafilaxia intestinal (SCOTT et al., 1998). Estes últimos autores argumentaram, então, que a sinalização do tronco cerebral a partir de uma reação alérgica no intestino é feita através de fibras aferentes espinhais. Eles demonstraram que a seção do nervo esplênico aboliu as alterações motoras do jejuno e diminuiu o número de neurônios positivos para Fos no NTS de animais sensibilizados e desafiados com o antígeno (SCOTT; TAN; SHARKEY, 2000).

A nossa abordagem experimental não permitiu que fosse discutida a participação de fibras vagais ou espinhais na sinalização do SNC a partir da alergia alimentar. No entanto, o tratamento neonatal com capsaicina possibilitou a avaliação da participação das fibras sensitivas do tipo C nesta sinalização. Aqui, nós relatamos que o tratamento neonatal com capsaicina, apesar de não bloquear totalmente, diminuiu a expressão de *c-fos* no NTS de animais imunizados e desafiados por via oral com o antígeno (Figuras 25 e 26). Além disso, demonstramos que o mesmo tratamento bloqueou completamente a ativação do PVN e não modificou a imunorreatividade para Fos no CeA de animais com alergia alimentar (Figura 25). Em conjunto, estes dados fazem-nos sugerir que, apesar de haver extensas projeções do NTS para o PVN (PETROV; KRUKOFF; JHAMANDAS, 1993), é pouco provável que esta via seja responsável pela completa ativação do PVN em decorrência da alergia alimentar. Neste sentido, alguns estudos têm descrito que um grande número de neurônios na medula espinhal de ratos projetam suas fibras diretamente para o hipotálamo (trato espino-hipotalâmico) (BURSTEIN; CLIFFER; GIESLER, 1990; CLIFFER; BURSTEIN; GIESLER, 1991). Uma vez que este trato espino-hipotalâmico, sabidamente, transmite informações sensorias de vísceras (KATTER et al., 1996; ZHANG; GOKIN; GIESLER, 2002), esta poderia ser uma via alternativa para a sinalização do PVN a partir dos eventos gerados pela alergia alimentar.

O fato agora observado de não ter sido o tratamento neonatal com capsaicina capaz de modificar a expressão de *c-fos* induzida pela alergia alimentar no CeA, parece indicar que as vias levando à ativação do CeA e do PVN não sejam as mesmas, pelo menos neste modelo experimental. Uma vez que a amígdala também recebe fibras aferentes do NTS (PETROV; KRUKOFF; JHAMANDAS, 1993), esta via poderia ser responsável, ao menos em parte, pela expressão de *c-fos* no CeA (mesmo considerando-se a menor ativação verificada no NTS dos animais tratados com capsaicina). A despeito de já ter sido demonstrado ser o tratamento neonatal com capsaicina capaz de destruir apenas 30% do número de neurônios no gânglio nodoso (CAROBI, 1996) e 41-75% das fibras do tipo C na raiz da medula espinhal (HIURA; SAKAMOTO, 1987), os presentes resultados levam-nos a sugerir que outros mecanismos, independentes das fibras do tipo C, estejam envolvidos com a sinalização do cérebro a partir da alergia alimentar. Essa sugestão está de acordo com os achados nos quais demonstramos que o tratamento neonatal com capsaicina, apesar de diminuir a magnitude de tal aversão, não foi capaz de evitar o desenvolvimento da aversão pela dieta contendo o antígeno em animais alérgicos (BASSO; DE SA-ROCHA; PALERMO-NETO, 2001). Estudos de outros grupos também têm demonstrado que a transmissão de certas informações sensorias provenientes de vísceras dependem apenas parcialmente das fibras do tipo C. De fato, mostrou-se que a expressão de *c-fos* induzida pela distensão mecânica do intestino não foi completamente abolida pelo tratamento neonatal com capsaicina (MONNIKES et al., 2003). De modo semelhante, enquanto o tratamento sistêmico com capsaicina reduziu em 50% o número de células positivas para Fos no PVN de animais submetidos à cirurgia abdominal, o mesmo tratamento não modificou a marcação para Fos no NTS e no CeA destes animais (BONAZ; TACHE, 1997). Por fim, já foi sugerida a participação de fibras resistentes à capsaicina na sinalização entre o trato gastrointestinal e o cérebro decorrente da acidez gástrica (SCHULIGOI et al., 1998).

Portanto, os resultados deste estudo fornecem evidências de que as fibras sensitivas do tipo C estejam envolvidas com parte da sinalização de áreas específicas do SNC a partir da alergia alimentar. Este envolvimento é particularmente notado na sinalização do PVN e, em menor grau, do NTS.

A complexa rede de fibras nervosas aferentes presente no intestino também pode ser base de sustentação para possíveis hipóteses que expliquem o fato do tratamento neonatal com capsaicina ter sido incapaz de impedir o desenvolvimento da aversão nos animais imunizados e de não ter bloqueado totalmente a ativação do SNC. Como já salientado na revisão de literatura, existem, no intestino, diferentes fibras sensitivas responsáveis por captar e transmitir informações importantes não só para o funcionamento do órgão em si, bem como, para que haja uma perfeita integração deste com o SNC. Na realização dessas tarefas, existem funções exercidas pelo sistema nervoso intrínseco e também por componentes vagais e espinhais, ambos pertencentes ao chamado sistema nervoso extrínseco.

O tratamento neonatal com capsaicina é capaz de destruir os terminais nervosos sensitivos extrínsecos; contudo, não é tão eficiente em destruir aqueles das fibras aferentes intrínsecas (HOLZER, 1991, 2002). Partindo-se do princípio de que, em teoria, no presente modelo, a informação gerada pela resposta imune poderia estar sendo captada por qualquer uma dessas fibras, é provável que o tratamento com capsaicina tenha interferido ou bloqueado a ação dos terminais nervosos sensitivos extrínsecos, mas não aquela dos terminais nervosos das fibras aferentes primárias intrínsecas. É possível, então, que a informação ainda esteja sendo captada pelos terminais das fibras intrínsecas e, a partir daí, tenha sido passada adiante para as fibras extrínsecas, atingindo através delas o SNC. De fato, os neurônios aferentes primários intrínsecos apresentam características morfológicas e eletrofisiológicas já comentadas anteriormente e que apoiam essa especulação. Esses neurônios, sendo do tipo Dogiel II, possuem vários axônios e portanto, a informação captada por eles não segue em

uma única direção. Além disso, o impulso elétrico gerado por meio da ativação dos terminais dessas células pode passar sem interrupção pelo corpo celular, ativando assim, outros neurônios. Ao contrário, isso não ocorre nos neurônios sensitivos vagais e espinhais, visto que este fenômeno depende dos potenciais excitatórios pós-sinápticos lentos, os quais são exclusivos dos neurônios sensitivos intrínsecos (FURNESS et al., 1998). Ademais, sabe-se da existência de uma estreita relação entre os neurônios aferentes extrínsecos e os neurônios aferentes intrínsecos (BERTHOUD et al., 1997; HOLZER, 2002).

A presença de citocinas no sangue a partir da desgranulação de mastócitos, em teoria, também poderia participar da sinalização do cérebro em decorrência da reação alérgica no intestino. Apesar dos nossos dados não permitirem uma discussão aprofundada a este respeito, esta forma de comunicação entre os sistemas imune e nervoso já foi descrita em outras situações (KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002). As múltiplas maneiras pelas quais pode se dar a comunicação entre o SNC e um evento mediado pelo sistema imune, tal como a alergia alimentar, chamam a atenção para a relevância da integração destes sistemas na elaboração de respostas adaptativas.

A análise conjunta dos dados referentes aos experimentos em que camundongos foram tratados ou não com capsaicina, nos quais foram avaliadas a preferência pela solução adocicada contendo o antígeno e a ativação de núcleos específicos do SNC, parece sugerir que a ativação do núcleo central da amígdala seja mais importante para o desenvolvimento da aversão ao antígeno presente na dieta. Essa sugestão advém do fato de que em animais tratados com capsaicina houve o desenvolvimento da aversão e ativação do núcleo central da amígdala, sem, no entanto, haver ativação do núcleo paraventricular do hipotálamo que pudesse se comparar àquela observada em camundongos que receberam apenas veículo. A importância do núcleo central da amígdala (CeA) na expressão de comportamentos tais como a aversão já foi amplamente comentada; no entanto, seriam necessários experimentos

adicionais para compreender, de modo mais claro, até que ponto o CeA está envolvido no desenvolvimento da aversão verificada neste modelo experimental.

O modelo experimental por nós utilizado neste trabalho, e proposto originalmente por Cara, Conde e Vaz (1994), abre espaço para que o papel do sistema imune seja discutido em uma perspectiva pouco tradicional, mas que por outro lado, ao privilegiar as interações com outros sistemas, favorece a visão do organismo com um todo. Em 1984, James Edwin Blalock publicou um artigo intitulado "*The immune system as a sensory organ*". Nesse trabalho, ele sugere que o sistema imune funcione como um órgão sensorial para estímulos chamados por ele de "não cognitivos". Esses estímulos, que não poderiam ser notados pelas aferências do sistema nervoso, incluem a presença de vírus, bactérias, protozoários ou antígenos. Dessa forma, o sistema imune seria o responsável por identificar esse tipo de estímulo, transformando-o em informação que pudesse ser "compreendida" (tipo cognitivo) pelo SNC, o qual, então, seria capaz de elaborar todas as respostas adaptativas necessárias (BLALOCK, 1984). Nessa mesma linha de raciocínio, o autor diz que mesmo as células do sistema imune são capazes de participar da elaboração de respostas aos estímulos não cognitivos, produzindo substâncias que, tradicionalmente, seriam de origem exclusiva do sistema neuro-endócrino. De fato, já se demonstrou que linfócitos B de camundongos são capazes de produzir ACTH e endorfinas após estimulação por LPS (HARBOUR; SMITH; BLALOCK, 1987).

Uma análise da escala filogenética pode contribuir para essa visão de integração entre o sistema imune e o SNC. Em invertebrados, os quais não possuem SNC organizado, as células que correspondem ao sistema imune também produzem várias substâncias encontradas no sistema neuro-endócrino de mamíferos, tais como ACTH e CRF. No enfoque de alguns pesquisadores italianos (OTTAVIANI; FRANCESCHI, 1996), como esses seres não possuem um sistema neuro-endócrino tão organizado, a produção de CRF e ACTH por estas células seria tal qual uma resposta de estresse que se segue a um desafio antigênico, no entanto, uma

resposta local, organizada no contexto do microambiente. Talvez tenhamos aqui mais um indício da relevância das relações neuro-imuno-endócrinas, visto terem elas sido preservadas ao longo da escala filogenética.

Voltando ao contexto do presente modelo experimental, a idéia de que o sistema imune funcione como órgão sensorial parece-nos muito interessante. Nesse caso, a resposta imune causada por um antígeno presente na dieta atuaria como uma aferência do SNC, transformando um estímulo não cognitivo em um sinal capaz de gerar uma resposta comportamental altamente elaborada e relevante para a adaptação do animal ao meio. O animal deve perceber a diferença entre as duas soluções e fazer uma opção que altera a sua preferência natural pelo sabor adocicado. Não nos parece haver dúvidas de que este seja um fenômeno no qual há o envolvimento de processos cognitivos. Outros dados do nosso laboratório fortalecem a importância da integração entre sistemas imune e nervoso na adaptação dos animais a estímulos do meio ambiente, mostrando que esse tipo de resposta não se limita à reação alérgica no trato gastrointestinal. Deste modo, observamos que camundongos imunizados com OVA evitaram a exploração de um ambiente previamente associado à exposição ao antígeno por via aérea (nebulização) (COSTA-PINTO et al., 2004). Neste caso, a reação alérgica nas vias aéreas levou a uma resposta comportamental em que os animais passam a evitar o lado escuro de uma caixa (associado à exposição antigênica), supostamente mais seguro, para ficar no compartimento claro, considerado desconfortável para os animais. De modo coerente, o desafio nasal com o antígeno também levou à ativação do PVN e do CeA de animais imunizados com OVA (COSTA-PINTO et al., 2004). Em estudo relatado anteriormente, nosso grupo já havia demonstrado que ratos re-expostos a um estímulo visual previamente associado com uma resposta alérgica pulmonar exploraram por menos tempo os braços abertos do labirinto em cruz elevado. Este achado indica que a reação

alérgica em vias aéreas é capaz de elevar os níveis de ansiendade de animais imunizados com OVA e que este efeito pode ser condicionado (PALERMO-NETO; GUIMARAES, 2000).

Finalmente, do ponto de vista médico, utilizando um modelo experimental que explora as interações entre o sistema imune e o sistema nervoso, demonstramos a existência de uma relação clara entre alergia alimentar e alterações do SNC em áreas relacionadas com comportamentos compatíveis com sintomas de ordem psicológica. Assim sendo, consideramos que o presente trabalho possa fornecer subsídios para uma melhor compreensão de desordens psicológicas presentes em pacientes alérgicos.

7 CONCLUSÕES

A alergia alimentar leva à expressão de comportamentos de natureza emocional, tais como aversão e ansiedade.

A reação alérgica decorrente da ingestão do antígeno presente na dieta promove a ativação de neurônios capazes de produzir CRF localizados em áreas específicas do cérebro, tais como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e o núcleo central da amígdala (CeA); esta ativação é compatível com a ativação do eixo HPA e com a expressão de comportamentos de natureza emocional.

Os dados também indicam que as alterações acima mencionadas devem-se à fase imediata da reação alérgica. Em especial, mecanismos dependentes de IgE são fundamentais para o desenvolvimento da aversão e para a ativação do SNC.

Por fim, as fibras do tipo C parecem estar envolvidas com a transmissão de pelo menos parte da informação gerada a partir da resposta alérgica no trato gastrointestinal, particularmente aquela dirigida ao PVN e, em menor grau, ao NTS.

Do que foi dito, quer nos parecer que a reação alérgica, atuando como aferência do SNC, gera uma informação por meio de mecanismos dependentes de IgE que, ao menos em parte, é transmitida para o cérebro por fibras sensoriais do tipo C. Uma vez no SNC, esta informação leva à ativação de neurônios capazes de produzir CRF localizados em áreas relacionadas à emotividade (tais como o PVN e o CeA), permitindo assim, a ativação do eixo HPA e a expressão de comportamentos que constituem, em última instância, respostas adaptativas ao estímulo presente no meio ambiente. Ressaltamos, portanto, a relevância da integração dos sistemas imune e nervoso na elaboração de respostas adaptativas em animais com alergia alimentar.

REFERÊNCIAS

ADAMEC, R. E.; SHALLOW, T. Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. **Physiol. Behav.**, v. 54, p. 101-109, 1993.

ADDOLORATO, G.; MARSIGLI, L.; CAPRISTO, E.; CAPUTO, F.; DALL'AGLIO, C.; BAUDANZA, P. Anxiety and depression: a common feature of health care seeking patients with irritable bowel syndrome and food allergy. **Hepatogastroenterology**, v. 45, p. 1559-1564, 1998.

ADER, R. Immune-derived modulation of behavior. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 594, p. 280-288, 1990.

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

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

AHLUWALIA, A.; GIULIANI, S.; SCOTLAND, R.; MAGGI, C. A. Ovalbumin-induced neurogenic inflammation in the bladder of sensitized rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 124, p. 190-196, 1998.

ALTSCHULER, S. M.; BAO, X. M.; BIEGER, D.; HOPKINS, D. A.; MISELIS, R. R. Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the rat: sensory ganglia and nuclei of the solitary and spinal trigeminal tracts. **J. Comp. Neurol.**, v. 283, p. 248-268, 1989.

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, p. 103-105, 1995.

ANDRADE, M. C. **Participação da reação de hipersensibilidade imediata no desencadeamento da aversão à ingestão de clara de ovo em camundongos imunizados com ovalbumina.** 1999. 112 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.

ATKINS, F. M. Food allergy and behavior: definitions, mechanisms and a review of the evidence. **Nutr. Rev.**, v. 44, p. 104-112, 1986. Supplement.

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

BASSO, A. S. **Envolvimento do sistema nervoso na alteração de preferência ao sabor induzida imunologicamente em camundongos.** 1999. 138 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

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

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, p. 524-526, 1987.

BERTHOUD, H. R.; PATTERSON, L. M.; NEUMANN, F.; NEUHUBER, W. L. Distribution and structure of vagal afferent intraganglionic laminar endings (IGLEs) in the rat gastrointestinal tract. **Anat. Embryol. (Berl)**, v. 195, p. 183-191, 1997.

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, 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, p. 652-654, 1986.

BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E.; FELIX, D.; HAAS, H. Hypothalamic changes during the immune response. **Eur. J. Immunol.**, v. 7, 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, p. 466-470, 1975.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Mechanism of virus-induced stimulation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. **J. Steroid. Biochem.**, v. 34, p. 235-239, 1989.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocr. Rev.**, v. 17, p. 64-102, 1996.

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

BISCHOFF, S. C.; MAYER, J. H.; MANNS, M. P. Allergy and the gut. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 121, p. 270-283, 2000.

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

BLUTHE, R. M.; CRESTANI, F.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Mechanisms of the behavioral effects of interleukin 1. Role of prostaglandins and CRF. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 650, p. 268-275, 1992.

BONAZ, B.; TACHE, Y. Corticotropin-releasing factor and systemic capsaicin-sensitive afferents are involved in abdominal surgery-induced Fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Brain. Res.**, v. 748, p. 12-20, 1997.

BRET-DIBAT, J. L.; CREMINON, C.; COURAUD, J. Y.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R.; KENT, S. Systemic capsaicin pretreatment fails to block the decrease in food-motivated behavior induced by lipopolysaccharide and interleukin-1beta. **Brain. Res. Bull.**, v. 42, p. 443-449, 1997.

BULBRING, E.; LIN, R. C. The effect of intraluminal application of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptophan on peristalsis; the local production of 5-HT and its release in relation to intraluminal pressure and propulsive activity. **J. Physiol.**, v. 140, p. 381-407, 1958.

BURSTEIN, R.; CLIFFER, K. D.; GIESLER JR., G. J. Cells of origin of the spinohypothalamic tract in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 291, p. 329-344, 1990.

CARA, D. C. **Mudança de preferência a sabores induzida imunologicamente em camundongos.** 1995. 100 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

CARA, D. C.; CONDE, A. A.; VAZ, N. M. Immunological induction of flavor aversion in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, 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, p. 52-63, 1987.

CAROBI, C. A quantitative investigation of the effects of neonatal capsaicin treatment on vagal afferent neurons in the rat. **Cell Tissue Res.**, v. 283, p. 305-311, 1996.

CASTEX, N.; FIORAMONTI, J.; FARGEAS, M. J.; BUENO, L. c-fos expression in specific rat brain nuclei after intestinal anaphylaxis: involvement of 5-HT3 receptors and vagal afferent fibers. **Brain Res.**, v. 688, p. 149-160, 1995.

CASTRO, G. A.; ARNTZEN, C. J. Immunophysiology of the gut: a research frontier for integrative studies of the common mucosal immune system. **Am. J. Physiol.**, v. 265, p. G599-610, 1993.

CATTO-SMITH, A. G.; PATRICK, M. K.; HARDIN, J. A.; GALL, D. G. Intestinal anaphylaxis in the rat: mediators responsible for the ion transport abnormalities. **Agents Actions**, v. 28, p. 185-191, 1989.

CERVERO, F. Sensory innervation of the viscera: peripheral basis of visceral pain. **Physiol. Rev.**, v. 74, p. 95-138, 1994.

CERVERO, F. Visceral pain-central sensitisation. **Gut**, v. 47, p. iv56-57, 2000. Supplement 4.

CHULUYAN, H. E.; SAPHIER, D.; ROHN, W. M.; DUNN, A. J. Noradrenergic innervation of the hypothalamus participates in adrenocortical responses to interleukin-1. **Neuroendocrinology**, v. 56, p. 106-111, 1992.

CLERC, N.; FURNESS, J. B.; LI, Z. S.; BORNSTEIN, J. C.; KUNZE, W. A. Morphological and immunohistochemical identification of neurons and their targets in the guinea-pig duodenum. **Neuroscience**, v. 86, p. 679-694, 1998.

CLIFFER, K. D.; BURSTEIN, R.; GIESLER JR., G. J. Distributions of spinothalamic, spinohypothalamic, and spinotelencephalic fibers revealed by anterograde transport of PHA-L in rats. **J. Neurosci.**, v. 11, p. 852-868, 1991.

COHEN, S. G.; SAAVEDRA-DELGADO, A. M. Through the centuries with food and drink, for better or worse. II. **Allergy Proc.**, v. 10, p. 363-373, 1989.

COSTA-PINTO, F. A.; BASSO, A. S.; BRITTO, L. R.; MALUCELLI, B. E.; RUSSO, M. Avoidance behavior and neural correlates of allergen expousure in a murine model of asthma. **Brain Behav. Immun.,** v. 19, 2004. no prelo.

CRAYTON, J. W. Adverse reactions to foods: relevance to psychiatric disorders. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 78, p. 243-250, 1986.

CROWE, S. E.; PERDUE, M. H. Functional abnormalities in the intestine associated with mucosal mast cell activation. **Reg. Immunol.**, v. 4, p. 113-117, 1992a.

CROWE, S. E.; PERDUE, M. H. Gastrointestinal food hypersensitivity: basic mechanisms of pathophysiology. **Gastroenterology**, v. 103, p. 1075-1095, 1992b.

DJURIC, V. J.; MARKOVIC, B. M.; LAZAREVIC, M.; JANKOVIC, B. D. Anaphylactic shock-induced conditioned taste aversion. II. Correlation between taste aversion and indicators of anaphylactic shock. **Brain Behav. Immun.**, v. 2, p. 24-31, 1988.

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

DUNN, A. J. Systemic interleukin-1 administration stimulates hypothalamic norepinephrine metabolism parallelling the increased plasma corticosterone. **Life Sci.**, v. 43, p. 429-435, 1988.

DUNN, A. J. Interactions between the nervous system and the immune system. In: BLOOM, F. E.; KUPFER, D. J. **Psychopharmacology:** The Fourth Generation of Progress. New York: Raven Press, 1995. p. 719-731.

DUNN, A. J.; ANTOON, M.; CHAPMAN, Y. Reduction of exploratory behavior by intraperitoneal injection of interleukin-1 involves brain corticotropin-releasing factor. **Brain Res. Bull.**, v. 26, p. 539-542, 1991.

FELTEN, D. L. Direct innervation of lymphoid organs: substrate for neurotransmitter signaling of cells of the immune system. **Neuropsychobiology**, v. 28, p. 110-112, 1993.

FELTEN, D. L.; ADER, R.; COHEN, N.; FELTEN, S. Y.; CARLSON, S.; ROSZMAN, T. L. Central neural circuits involved in neural-immune interactions. In: ADER, R.; FELTEN, D. L.; COHEN, N. **Psychoneuroimmunolgy.** San Diego: Academic Press, 1991. p. 3-19.

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

FRANKLIN, K.; PAXINOS, G. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. San Diego: Academic Press, 1996. 208 p.

FURNESS, J. B.; KUNZE, W. A.; BERTRAND, P. P.; CLERC, N.; BORNSTEIN, J. C. Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. **Prog. Neurobiol.**, v. 54, p. 1-18, 1998.

FURNESS, J. B.; KUNZE, W. A.; CLERC, N. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses. **Am. J. Physiol.**, v. 277, p. G922-928, 1999.

GEBHART, G. F. Visceral pain-peripheral sensitisation. **Gut**, v. 47, p. iv54-55, 2000. Supplement 4.

GERSHON, M. D. **The second brain**: gut instinct. New York: Harper Collins Puplishers, 1998. 314 p.

GETTIS, A. Food sensitivities and psychological disturbance: a review. **Nutr. Health**, v. 6, p. 135-146, 1989.

GOEHLER, L. E.; GAYKEMA, R. P.; HANSEN, M. K.; KLEINER, J. L.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Staphylococcal enterotoxin B induces fever, brain c-Fos expression, and serum corticosterone in rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 280, p. R1434-1439, 2001.

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.

GRAY, T. S.; BINGAMAN, E. W. The amygdala: corticotropin-releasing factor, steroids, and stress. **Crit. Rev. Neurobiol.**, v. 10, p. 155-168, 1996.

GRUNDY, D. Neuroanatomy of visceral nociception: vagal and splanchnic afferent. **Gut**, v. 51, p. i2-5, 2002. Supplement 1.

GRUNDY, D.; HILLSLEY, K.; KIRKUP, A. J.; RICHARDS, W. Mesenteric afferent sensitivity to cholecystokinin and 5-hydroxytryptamine. **Dtsch Tierarztl Wochenschr**, v. 105, p. 466-468, 1998.

HAAK-FRENDSCHO, M.; SABAN, R.; SHIELDS, R. L.; JARDIEU, P. M. Anti-immunoglobulin E antibody treatment blocks histamine release and tissue contraction in sensitized mice. **Immunology**, v. 94, p. 115-121, 1998.

HARBOUR, D. V.; SMITH, E. M.; BLALOCK, J. E. Novel processing pathway for proopiomelanocortin in lymphocytes: endotoxin induction of a new prohormone-cleaving enzyme. **J. Neurosci. Res.**, v. 18, p. 95-101, 1987.

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

HEINRICHS, S. C.; PICH, E. M.; MICZEK, K. A.; BRITTON, K. T.; KOOB, G. F. Corticotropin-releasing factor antagonist reduces emotionality in socially defeated rats via direct neurotropic action. **Brain Res.**, v. 581, p. 190-197, 1992.

HELLERSTEIN, M. K.; MEYDANI, S. N.; MEYDANI, M.; WU, K.; DINARELLO, C. A. Interleukin-1-induced anorexia in the rat. Influence of prostaglandins. **J. Clin. Invest.**, v. 84, p. 228-235, 1989.

HILLSLEY, K.; GRUNDY, D. Sensitivity to 5-hydroxytryptamine in different afferent subpopulations within mesenteric nerves supplying the rat jejunum. **J. Physiol.**, v. 509, pt 3, p. 717-727, 1998a.

HILLSLEY, K.; GRUNDY, D. Serotonin and cholecystokinin activate different populations of rat mesenteric vagal afferents. **Neurosci. Lett.**, v. 255, p. 63-66, 1998b.

HIURA, A.; SAKAMOTO, Y. Quantitative estimation of the effects of capsaicin on the mouse primary sensory neurons. **Neurosci. Lett.**, v. 76, p. 101-106, 1987.

HOLZER, H. H.; TURKELSON, C. M.; SOLOMON, T. E.; RAYBOULD, H. E. Intestinal lipid inhibits gastric emptying via CCK and a vagal capsaicin-sensitive afferent pathway in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 267, p. G625-629, 1994.

HOLZER, P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, p. 143-201, 1991.

HOLZER, P. Sensory neurone responses to mucosal noxae in the upper gut: relevance to mucosal integrity and gastrointestinal pain. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 14, p. 459-475, 2002.

HOLZER, P.; MICHL, T.; DANZER, M.; JOCIC, M.; SCHICHO, R.; LIPPE, I. T. Surveillance of the gastrointestinal mucosa by sensory neurons. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 52, p. 505-521, 2001.

JANCSO, G.; KIRALY, E.; JANCSO-GABOR, A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. **Nature**, v. 270, p. 741-743, 1977.

JANISZEWSKI, J.; BIENENSTOCK, J.; BLENNERHASSETT, M. G. Activation of rat peritoneal mast cells in coculture with sympathetic neurons alters neuronal physiology. **Brain Behav. Immun.**, v. 4, p. 139-150, 1990.

JANKOVIC, B. D.; HORVAT, J.; MITROVIC, K. Antigenic correlation between rat brain synaptic vesicles and rat bone marrow B lymphocytes. **Experientia**, v. 35, p. 1393-1395, 1979.

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, p. 289-294, 1993.

JUANOLA, C.; GIRALT, M.; JIMENEZ, M.; MOURELLE, M.; VERGARA, P. Mucosal mast cells are involved in CCK disruption of MMC in the rat intestine. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. G63-67, 1998.

KABIERSCH, A.; DEL REY, A.; HONEGGER, C. G.; BESEDOVSKY, H. O. Interleukin-1 induces changes in norepinephrine metabolism in the rat brain. **Brain Behav. Immun.**, v. 2, p. 267-274, 1988.

KATTER, J. T.; DADO, R. J.; KOSTARCZYK, E.; GIESLER JR., G. J. Spinothalamic and spinohypothalamic tract neurons in the sacral spinal cord of rats. II. Responses to cutaneous and visceral stimuli. **J. Neurophysiol.**, v. 75, p. 2606-2628, 1996.

KEAY, K. A.; CLEMENT, C. I.; DEPAULIS, A.; BANDLER, R. Different representations of inescapable noxious stimuli in the periaqueductal gray and upper cervical spinal cord of freely moving rats. **Neurosci. Lett.**, v. 313, p. 17-20, 2001.

KEAY, K. A.; CLEMENT, C. I.; OWLER, B.; DEPAULIS, A.; BANDLER, R. Convergence of deep somatic and visceral nociceptive information onto a discrete ventrolateral midbrain periaqueductal gray region. **Neuroscience**, v. 61, p. 727-732, 1994.

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

KENT, S.; BRET-DIBAT, J. L.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Mechanisms of sickness-induced decreases in food-motivated behavior. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 20, p. 171-175, 1996.

KIRCHGESSNER, A. L.; GERSHON, M. D. Projections of submucosal neurons to the myenteric plexus of the guinea pig intestine: in vitro tracing of microcircuits by retrograde and anterograde transport. **J. Comp. Neurol.**, v. 277, p. 487-498, 1988.

KIRCHGESSNER, A. L.; TAMIR, H.; GERSHON, M. D. Identification and stimulation by serotonin of intrinsic sensory neurons of the submucosal plexus of the guinea pig gut: activity-induced expression of Fos immunoreactivity. **J. Neurosci.**, v. 12, p. 235-248, 1992.

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

KUNZE, W. A.; BERTRAND, P. P.; FURNESS, J. B.; BORNSTEIN, J. C. Influence of the mucosa on the excitability of myenteric neurons. **Neuroscience**, v. 76, p. 619-634, 1997.

KUSNECOV, A. W.; LIANG, R.; SHURIN, G. T-lymphocyte activation increases hypothalamic and amygdaloid expression of CRH mRNA and emotional reactivity to novelty. **J. Neurosci.**, v. 19, p. 4533-4543, 1999.

LAMPRECHT, R.; DUDAI, Y. Differential modulation of brain immediate early genes by intraperitoneal LiCl. **Neuroreport**, v. 7, 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, p. 31-41, 1996.

LANGLEY, J. N. **The autonomic nervous system, part I**. Cambridge: Heffer, 1921. 134 p.

LI, X. M.; KLEINER, G.; HUANG, C. K.; LEE, S. Y.; SCHOFIELD, B.; SOTER, N. A.; SAMPSON, H. A. Murine model of atopic dermatitis associated with food hypersensitivity. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 107, p. 693-702, 2001.

LIEBSCH, G.; LANDGRAF, R.; GERSTBERGER, R.; PROBST, J. C.; WOTJAK, C. T.; ENGELMANN, M.; HOLSBOER, F.; MONTKOWSKI, A. Chronic infusion of a CRH1 receptor antisense oligodeoxynucleotide into the central nucleus of the amygdala reduced anxiety-related behavior in socially defeated rats. **Regul. Pept.**, v. 59, p. 229-239, 1995.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, p. 180-185, 1987.

LLOYD, K. C.; HOLZER, H. H.; ZITTEL, T. T.; RAYBOULD, H. E. Duodenal lipid inhibits gastric acid secretion by vagal, capsaicin-sensitive afferent pathways in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 264, p. G659-663, 1993.

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, 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, p. 236-239, 2001.

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

MARKOVIC, B. M.; DJURIC, V. J.; LAZAREVIC, M.; JANKOVIC, B. D. Anaphylactic shock-induced conditioned taste aversion. I. Demonstration of the phenomenon by means of three modes of CS-US presentation. **Brain Behav. Immun.**, v. 2, p. 11-23, 1988.

MENETREY, D.; BASBAUM, A. I. Spinal and trigeminal projections to the nucleus of the solitary tract: a possible substrate for somatovisceral and viscerovisceral reflex activation. **J. Comp. Neurol.**, v. 255, p. 439-450, 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.

MILLAN, M. J.; BROCCO, M. The Vogel conflict test: procedural aspects, gamma-aminobutyric acid, glutamate and monoamines. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 463, p. 67-96, 2003.

MOLLER, C.; BING, O.; HEILIG, M. c-fos expression in the amygdala: in vivo antisense modulation and role in anxiety. **Cell Mol. Neurobiol.**, v. 14, p. 415-423, 1994.

MONNIKES, H.; RUTER, J.; KONIG, M.; GROTE, C.; KOBELT, P.; KLAPP, B. F.; ARNOLD, R.; WIEDENMANN, B.; TEBBE, J. J. Differential induction of c-fos expression in brain nuclei by noxious and non-noxious colonic distension: role of afferent C-fibers and 5-HT3 receptors. **Brain Res.**, v. 966, p. 253-264, 2003.

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, p. 49-57, 2004.

MORRIS, J. S.; OHMAN, A.; DOLAN, R. J. Conscious and unconscious emotional learning in the human amygdala. **Nature**, v. 393, p. 467-470, 1998.

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

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, p. 283-287, 1993.

OTTAVIANI, E.; FRANCESCHI, C. The neuroimmunology of stress from invertebrates to man. **Prog. Neurobiol.**, v. 48, p. 421-440, 1996.

PACHECO-LOPEZ, G.; ESPINOSA, E.; ZAMORANO-ROJAS, H. M.; RAMIREZ-AMAYA, V.; BERMUDEZ-RATTONI, F. Peripheral protein immunization induces rapid activation of the CNS, as measured by c-Fos expression. **J. Neuroimmunol.**, v. 131, p. 50-59, 2002.

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, p. 497-507, 2001.

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

PALERMO-NETO, J.; GUIMARAES, R. K. Pavlovian conditioning of lung anaphylactic response in rats. **Life Sci.**, v. 68, p. 611-623, 2000.

PEARCE, F. L.; BEFUS, A. D.; GAULDIE, J.; BIENENSTOCK, J. Mucosal mast cells. II. Effects of anti-allergic compounds on histamine secretion by isolated intestinal mast cells. **J. Immunol.**, v. 128, p. 2481-2486, 1982.

PEARSON, D. J. Psychologic and somatic interrelationships in allergy and pseudoallergy. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 81, p. 351-360, 1988.

PEARSON, D. J.; RIX, K. J.; BENTLEY, S. J. Food allergy: how much in the mind? A clinical and psychiatric study of suspected food hypersensitivity. **Lancet**, v. 1, p. 1259-1261, 1983.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

PERDUE, M. H.; CHUNG, M.; GALL, D. G. Effect of intestinal anaphylaxis on gut function in the rat. **Gastroenterology**, v. 86, p. 391-397, 1984.

PERDUE, M. H.; DAVISON, J. S. Response of jejunal mucosa to electrical transmural stimulation and two neurotoxins. **Am. J. Physiol.**, v. 251, p. G642-648, 1986.

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

PERDUE, M. H.; GALL, D. G. Rat jejunal mucosal response to histamine and anti-histamines in vitro. Comparison with antigen-induced changes during intestinal anaphylaxis. **Agents Actions**, v. 19, p. 5-9, 1986.

PETROV, T.; KRUKOFF, T. L.; JHAMANDAS, J. H. Branching projections of catecholaminergic brainstem neurons to the paraventricular hypothalamic nucleus and the central nucleus of the amygdala in the rat. **Brain Res.**, v. 609, p. 81-92, 1993.

PEVELER, R.; MAYOU, R.; YOUNG, E.; STONEHAM, M. Psychiatric aspects of food-related physical symptoms: a community study. **J. Psychosom. Res.**, v. 41, p. 149-159, 1996.

PORTELA, C DE P.; MASSOCO, C. O.; DE LIMA, W. T.; PALERMO-NETO, J. Stress-induced increment on total bronchoalveolar cell count in OVA-sensitized rats. **Physiol. Behav.**, v. 72, p. 415-420, 2001.

RAADSHEER, F. C.; HOOGENDIJK, W. J.; STAM, F. C.; TILDERS, F. J.; SWAAB, D. F. Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. **Neuroendocrinology**, v. 60, p. 436-444, 1994.

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, p. 46-60, 1999.

RAYBOULD, H. E. Does your gut taste? Sensory transduction in the gastrointestinal tract. **News Physiol. Sci.**, v. 13, p. 275-280, 1998.

RAYBOULD, H. E. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. I. Sensing of lipid by the intestinal mucosa. **Am. J. Physiol.**, v. 277, p. G751-755, 1999.

RAYBOULD, H. E. Visceral perception: sensory transduction in visceral afferents and nutrients. **Gut**, v. 51, p. i11-14, 2002. Supplement 1.

RAYBOULD, H. E.; HOLZER, H. Dual capsaicin-sensitive afferent pathways mediate inhibition of gastric emptying in rat induced by intestinal carbohydrate. **Neurosci. Lett.**, v. 141, p. 236-238, 1992.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 387, p. 111-118, 2000.

RICHARDS, W.; HILLSLEY, K.; EASTWOOD, C.; GRUNDY, D. Sensitivity of vagal mucosal afferents to cholecystokinin and its role in afferent signal transduction in the rat. **J. Physiol.**, v. 497, pt 2, p. 473-481, 1996.

RIVIER, C.; BROWNSTEIN, M.; SPIESS, J.; RIVIER, J.; VALE, W. In vivo corticotropin-releasing factor-induced secretion of adrenocorticotropin, beta-endorphin, and corticosterone. **Endocrinology**, v. 110, p. 272-278, 1982.

RIVIER, C.; VALE, W. Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. **Nature**, v. 305, p. 325-327, 1983.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors. **Physiol. Behav.**, v. 53, p. 383-388, 1993.

ROTHENBERG, M. E.; MISHRA, A.; BRANDT, E. B.; HOGAN, S. P. Gastrointestinal eosinophils in health and disease. **Adv. Immunol.**, v. 78, p. 291-328, 2001.

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, p. 518-526, 2001.

SAGAR, S. M.; SHARP, F. R.; CURRAN, T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. **Science**, v. 240, p. 1328-1331, 1988.

SAMPSON, H. A. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 103, p. 717-728, 1999.

SAMPSON, H. A. Food anaphylaxis. **Br. Med. Bull.**, v. 56, p. 925-935, 2000.

SAMPSON, H. A.; BURKS, A. W. Mechanisms of food allergy. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 16, p. 161-177, 1996.

SAPHIER, D.; ABRAMSKY, O.; MOR, G.; OVADIA, H. Multiunit electrical activity in conscious rats during an immune response. **Brain Behav. Immun.**, v. 1, p. 40-51, 1987.

SCHULIGOI, R.; JOCIC, M.; HEINEMANN, A.; SCHONINKLE, E.; PABST, M. A.; HOLZER, P. Gastric acid-evoked c-fos messenger RNA expression in rat brainstem is signaled by capsaicin-resistant vagal afferents. **Gastroenterology**, v. 115, p. 649-660, 1998.

SCHWARTZ, G. J. The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects. **Nutrition**, v. 16, p. 866-873, 2000.

SCOTT, R. B.; TAN, D. T.; MIAMPAMBA, M.; SHARKEY, K. A. Anaphylaxis-induced alterations in intestinal motility: role of extrinsic neural pathways. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. G812-821, 1998.

SCOTT, R. B.; TAN, D. T.; SHARKEY, K. A. Effect of splanchnectomy on jejunal motility and fos expression in brain stem after intestinal anaphylaxis in rat. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 279, p. G990-997, 2000.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature,** p. 32, 1936.

SENGOKU, T.; SATO, S.; SAKUMA, S.; OGAWA, T.; OHKUBO, Y.; GOTO, T. Characterization of Ascaris-induced biphasic skin allergic reaction model in mice: possible roles of mast cells in early-phase and CD4-positive T cells in late-phase reactions. **Pharmacology**, v. 63, p. 82-89, 2001.

SHARKEY, K. A.; MAWE, G. M. Neuroimmune and epithelial interactions in intestinal inflammation. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 2, p. 669-677, 2002.

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, p. 308-322, 1990.

STEAD, R. H.; DIXON, M. F.; BRAMWELL, N. H.; RIDDELL, R. H.; BIENENSTOCK, J. Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa. **Gastroenterology**, v. 97, p. 575-585, 1989.

STEAD, R. H.; TOMIOKA, M.; QUINONEZ, G.; SIMON, G. T.; FELTEN, S. Y.; BIENENSTOCK, J. Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 84, p. 2975-2979, 1987.

STENTON, G. R.; VLIAGOFTIS, H.; BEFUS, A. D. Role of intestinal mast cells in modulating gastrointestinal pathophysiology. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, v. 81, p. 1-11; quiz 12-15, 1998.

SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E.; RIVIER, J.; VALE, W. W. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. **Neuroendocrinology**, v. 36, p. 165-186, 1983.

URSIN, H. Stress, distress, and immunity. **Ann. N. Y. Acad. Sci.,** v. 594, p. 204-211, 1994.

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, p. 1394-1397, 1981.

VLAJKOVIC, S.; DUGANDZIJA-NOVAKOVIC, S.; MILANOVIC, S.; JANKOVIC, B. D. Brain self-stimulation and immunity: effect on humoral and cell-mediated immune responses. **Int. J. Neurosci.**, v. 69, p. 235-250, 1993.

WUTHRICH, B.; BALLMER-WEBER, B. K. Food-induced anaphylaxis. **Allergy**, v. 56, p. 102-104, 2001. Supplement 67.

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, p. 127-130, 1997.

YU, L. C.; PERDUE, M. H. Role of mast cells in intestinal mucosal function: studies in models of hypersensitivity and stress. **Immunol. Rev.**, v. 179, p. 61-73, 2001.

ZANGROSSI, H., JR.; FILE, S. E. Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor. **Brain Res. Bull.**, v. 29, p. 381-388, 1992.

ZHANG, X.; GOKIN, A. P.; GIESLER JR., G. J. Responses of spinohypothalamic tract neurons in the thoracic spinal cord of rats to somatic stimuli and to graded distention of the bile duct. **Somatosens. Mot. Res.**, v. 19, p. 5-17, 2002.

ZITTEL, T. T.; DE GIORGIO, R.; STERNINI, C.; RAYBOULD, H. E. Fos protein expression in the nucleus of the solitary tract in response to intestinal nutrients in awake rats. **Brain Res.**, v. 663, p. 266-270, 1994.

ANEXO

Original Paper

NeuroImmunoModulation

Neuroimmunomodulation 2001;9:88–94

Received: June 1, 2000
Accepted after revision: May 2, 2001

Immune-Induced Flavor Aversion in Mice: Modification by Neonatal Capsaicin Treatment

Alexandre Salgado Basso Luiz Carlos de Sá-Rocha João Palermo-Neto

Applied Pharmacology and Toxicology Laboratory, Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Brazil

Key Words
Food allergy · Capsaicin · Mice · IgE · Behavior · Taste aversion

Abstract
Objective: This study was designed to evaluate the role of c-sensitive fibers in the establishment of immune-induced flavor aversion in mice. ***Methods:*** Mice were treated neonatally with capsaicin in order to destroy c-sensitive fibers; after such treatment, adult animals, immunized or not with ovalbumin, were submitted to a two-bottle preference test, with a choice between water and a sweetened egg white solution. ***Results:*** Neonatal capsaicin treatment was unsuccessful in preventing the development of immune-induced aversion to the sweetened solution containing the antigen. Nonetheless, amongst immunized mice, those which had been previously treated with capsaicin showed a significant increment in the preference for the sweetened egg white solution. Furthermore, our data showed that neonatal capsaicin treatment did not interfere with either IgG1 or IgE production. ***Conclusion:*** The present results suggest that c-sensitive fibers have a role in the transmission of the signals generated by this immune response to the central nervous system, thus contributing to the development of a flavor aversion in mice.

Copyright © 2001 S. Karger AG, Basel

Introduction

Previous experiments have shown that immune reactions are capable of modulating several aspects of animal behavior, for example, flavor aversion (diet selection). Normal (nonimmunized) mice tend to choose a sweetened solution of egg white over water, when given this choice. Mice which have been previously immunized against ovalbumin avoid the ingestion of a sweetened solution of egg white, choosing water instead [1]. This behavioral change is triggered by an immune response to the antigen presented in their diet and is dependent on the existence of specific antibodies in their serum [1]. Thus, when mice become tolerant to this antigen (oral tolerance induced by antigen-containing gavage), they produce no antibodies against such an antigen and no longer avoid drinking the sweetened solution of egg white [1]. More specifically, IgE seems to be the most important antibody modulating such a behavioral change. This statement is based on the results of a study of oral tolerance using either old or germ-free mice [2].

It has been demonstrated that the immune reaction elicited by the ingestion of antigen (ovalbumin) leads to an increase in vascular permeability in the intestinal mucosa [3]; even when ovalbumin was given intravenously, an increase in vascular permeability was found in the stomach and small intestine [2].

KARGER
Fax + 41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2001 S. Karger AG, Basel
1021–7401/01/0092–0088$17.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/journals/nim

Dr. João Palermo-Neto
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Patologia
Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87
CEP 05508-900 São Paulo, SP (Brazil)
Fax +55 11 211 3074, E-Mail jpalermo@usp.br

Attempts have been made to manipulate the outcome of this process through the use of different drugs. Although histamine and serotonin receptor antagonists have been shown to be effective in reducing the increment in vascular permeability, these drugs were not able to reverse the behavioral changes elicited by the immune reaction to ovalbumin [3]. Thus, it seems that the edema is not, at least not directly, associated with the behavioral changes observed in immunized mice.

The fact that a series of events probably occurs between antibody production and the occurrence of behavioral changes must be carefully considered. What kind of information is generated by this immune response? How are these signals (information) transferred to the central nervous system (CNS)?

There is a close anatomical relationship between some nerve endings and mucosal mast cells; these are type c-sensitive fiber nerve endings and release neuropeptides such as substance P and calcitonin gene-related peptide [4, 5]. This interaction has been explored in a model of intestinal anaphylaxis, as follows: hooded Lister rats sensitized to egg albumin respond with an immediate and transitory increase in intestinal short-circuit current when challenged with this antigen [6–8]. Doxantrole is a mast cell stabilizer and prevents the release of its mediators. Pretreatment of jejunum obtained from sensitized animals with doxantrole abolishes the antigen-induced increment in short-circuit current in the model described above [8]. This is evidence of mast cell-mediated ionic secretion. Furthermore, Crowe et al. [9] have shown that the epithelial ionic secretory response to luminally administered egg albumin can be inhibited by either administration of the neurotoxin tetrodotoxin or by the depletion of substance P-containing neurons through neonatal capsaicin treatment.

Since we know that those fibers which are close to mucosal mast cells derive from both the intrinsic and extrinsic nervous system [10, 11], we designed the present experiments in order to investigate the possible role of capsaicin-sensitive fibers in the transmission to the CNS of information related to immune-induced flavor aversion in mice.

Materials and Methods

Experiments

Two separate experiments were performed. In the first one, 2-day-old mice were given capsaicin, being immunized after 6–8 weeks, and then submitted to the aversive test. The same mice were bled for serum collection and antibody (IgE and IgG1) titration at the end of the aversive test. A distinct group of mice was used to assess the efficacy of capsaicin treatment, using the method of measuring the increment in vascular permeability triggered by xylene as described below.

In the second experiment, mice were submitted to the same capsaicin treatment and immunizing protocol as outlined above. In addition, the same mice were submitted to the stretching test (described below) to assess the efficacy of capsaicin treatment.

All other procedures apply to both experiments, unless otherwise specified.

Animals

Male Balb-C mice, 6–8 weeks old, from our own colony, were used throughout. For the passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test, male Wistar rats (200–250 g), also from our own colony, were used. The animals were housed accordingly under conditions of controlled temperature (22–26 °C) and artificially lighted rooms on a cycle of 12 h of light/12 h of dark (lights on at 7.00 a.m.) with free access to rodent chow and water. The experiments were performed in a different room with the same temperature as the animal colony, to which the animals were transferred and maintained in their home cages 5 days before the experiments. Animals were housed and used in accordance with the guidelines of the Committee on the Care and Use of Laboratory Animal Resources of the School of Veterinary Medicine, University of São Paulo; these guidelines are similar to those of the National Research Council, USA.

Drugs

Capsaicin, ovalbumin (chicken egg white; grade II or V) and Evans blue dye were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, USA.

Neonatal Capsaicin Treatment

Two-day-old mice were given 50 mg/kg s.c. of capsaicin. Control mice received the same volume of vehicle subcutaneously (10% ethanol, 10% Tween, 80% saline solution).

Immunization

On day 0, the mice (6–8 weeks old) were given 0.2 ml s.c. of saline (0.15 *M* NaCl) solution containing 10 μg of ovalbumin and 1 mg of $Al(OH)_3$ as adjuvant. Fourteen days later (day 14), they were injected with 0.2 ml s.c. of saline solution containing 10 μg of ovalbumin.

Aversive Test

Immediately after the second ovalbumin injection (day 14), mice were housed individually. Each individual cage was supplied with two identical small bottles (both filled with water) on opposite sides. Seven days later (day 21), one of the bottles was filled with a sweetened (0.5% saccharin) solution of egg white (20%) in water. The other small bottle remained filled with water. Every bottle was weighed immediately before the beginning of the aversive test and after 24 h. The total fluid intake (water plus sweetened egg white solution) was expressed as milligrams of ingested solution per gram of body weight. The bottles had their position switched every 4 h during the first 12 h to avoid a possible preference by the animal for one of the sides of the cage. To evaluate the preference of the mice for the sweetened solution, we used the following calculation: percentage of preference = consumption of sweetened solution of egg white/total fluid intake × 100. Only in the first experiment, immediately after the end of the aversive test, mice were killed by decapitation and their blood was collected for serum antibody (IgE and IgG1) titration.

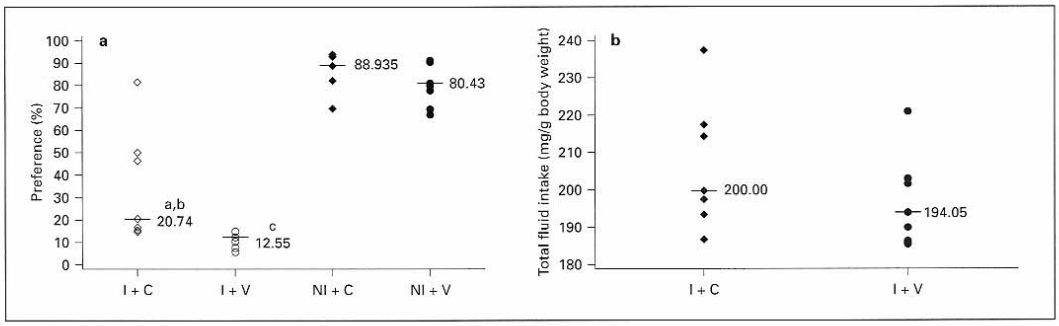

Fig. 1. a Preference for the sweetened egg white solution. Immunized and nonimmunized mice treated with capsaicin or vehicle were submitted to the aversive test, which lasted 24 h. Each symbol represents an individual data point. I + C = Immunized mice treated with capsaicin (n = 7); I + V = immunized mice treated with vehicle (n = 7); NI + C = nonimmunized mice treated with capsaicin (n = 6); NI + V = nonimmunized mice treated with vehicle (n = 7). [a] $p < 0.05$ for I + C compared to I + V. [b] $p < 0.05$ for I + C compared to NI + C. [c] $p < 0.05$ for I + V compared to NI + V. The differences in preference were determined by the Kruskall-Wallis test followed by the Kolmogorov-Smirnov two-sample test. Horizontal bars represent medians. **b** Total fluid intake (mg/g body weight) of immunized mice treated with capsaicin or vehicle. Each symbol represents an individual data point. I + C = Immunized mice treated with capsaicin (n = 7); I + V = immunized mice treated with vehicle (n = 7). The Mann-Whitney test was used for comparisons. Horizontal bars represent medians.

ELISA

Titration of IgG1 antibodies was performed by ELISA. Serum obtained as soon as the aversive test was finished was tested for IgG1 using ovalbumin-coated, 96-well plates and a streptavidin-peroxidase-conjugated rat anti-mouse IgG1 antiserum; *o*-phenylenediamine was used as the chromogen. After adding H_2O_2 (1 μg/ml), the reaction was blocked with 30% H_2SO_4 and the optical density was read at 492 nm on an automated ELISA reader. Titration curves were made for the samples. The results are shown as the mean optical density of four samples per group (plus standard deviation) at various serum dilutions. A control serum was used to determine the coefficient of variation, which was less than 4%.

Passive Cutaneous Anaphylaxis

Titration of IgE antibodies was performed by PCA reaction in rats as described by Mota and Wong [12]. Basically, the animals were shaved on their back and intradermal injections (100 μl) of serial dilutions (1/20, 1/40, 1/80 and 1/160) of serum obtained from the mice used in these experiments were given on each side of the dorsal skin. After 24 h, the time required for mast cell sensitization by IgE present in the serum [12], the rats were challenged intravenously with 1 ml of 2.5% Evans blue solution containing 500 μg of ovalbumin. Ten minutes after the challenge, the rats were sacrificed and dye leakage in the skin was observed at each injection point. All tests were made in triplicate, and PCA titers were expressed as the reciprocal of the highest dilution that induced a reaction >5 mm in diameter.

Assessment of the Efficacy of Neonatal Capsaicin Treatment

The efficacy of capsaicin treatment was assessed through one of two methods. The first method involved measuring the increase in vascular permeability triggered by xylene. For the first experiment, mice other than those submitted to the aversive test were used to evaluate the efficacy of the neonatal capsaicin treatment. Assessment of the efficacy of capsaicin treatment in the destruction of sensitive c-fibers was performed by the method described by Jancsó et al. [13] through the use of Evans blue dye extravasation during the period of increment in vascular permeability triggered by xylene. In order to do so, one hind paw of each animal was put in contact with a xylene-soaked cotton ball; following this procedure, mice were injected with 2.5% Evans blue dye (0.1 ml/10 g of body weight, i.v.). Twenty minutes after the injection of Evans blue dye, the animals were sacrificed in a CO_2-saturated chamber, their paws were surgically removed at the level of the tibiotarsal joint and weighed and trimmed to facilitate the extraction of the extravasated dye from the tissue. Evans blue dye was retrieved by formamide (37 °C during 48 h). The amount of dye extracted from the tissue was measured by absorbance readouts at 620 nm. Results were expressed as milligrams of dye per gram of tissue, based on a standard curve generated by six known dilutions of Evans blue dye in formamide.

The second method for measuring the efficacy of capsaicin treatment was visceral chemosensitivity (stretching test). As an attempt to establish a correlation between the efficacy of capsaicin treatment and the behavior of each animal in the aversive test, for the second experiment, the same animals were used for the aversive test as well as for the visceral chemosensitivity function test. This test was chosen because it reflects visceral sensitivity, which might represent an important aspect in our model. Furthermore, data from such a test could be meaningful, since mast cells seem to play a relevant role in the generation of this sensory signaling [14]. Briefly, immediately after the end of the aversive test, mice were injected with 0.6% acetic acid (0.1 ml/10 g of body weight, i.p.) and then placed in a transparent observation box. The number of stretches (defined as abdominal musculature contractions accompanied by writhing of the body and backward extension of the hind limbs) per animal was counted during 20 min.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the software package SPSS®SYSTAT version 7.0. Bartlett's test was performed to evaluate whether data should be analyzed by parametric or nonparametric tests. The differences in the preference were determined by nonparametric analysis of variance (Kruskal-Wallis test) followed by a post hoc test (Kolmogorov-Smirnov two-sample test); those data are presented as medians with maximum and minimum limits. The differences in serum IgG1 titration were determined by one-way analysis of variance followed by a post hoc test (Tukey-Kramer test). The difference in concentration of Evans blue dye was determined by Student's t test. Those data are shown as means and standard deviations. The difference in the number of stretches was determined by the Mann-Whitney test. Data are shown as medians. A probability of $p < 0.05$ was considered to show significant differences for all measures.

Results

First Experiment

Our data show that an immune reaction was capable of altering the behavior of mice in regard to their flavor preference, thus suggesting the influence of the immune system on diet selection (ultimately, a behavioral change). As can be seen in figure 1a, while nonimmunized mice showed a significant preference (Kruskal-Wallis test = 20.337; $p < 0.05$) for the sweetened egg white solution, immunized mice avoided it, drinking more water instead.

As can be seen, immunized mice treated with capsaicin did not drink the sweetened egg white solution as much as did nonimmunized animals (which had received capsaicin vehicle). Thus, neonatal capsaicin treatment was not effective in preventing the immune-induced flavor aversion (fig. 1a). However, capsaicin-treated immunized mice showed an increment in their preference for the sweetened egg white solution, when compared to data observed in vehicle-treated immunized mice. Hence, it seems that capsaicin-sensitive c-fibers indeed have a role in the development of immune-induced flavor aversion.

As shown in figure 1b, there was no difference in terms of total fluid intake between immunized mice treated or not with capsaicin. Thus, the difference in preference between these groups could not be attributed to a decrease in water consumption.

Figure 2 shows that the neonatal capsaicin treatment did not interfere with IgG1 production against ovalbumin in immunized animals. Thus, the titration curves for immunized mice treated or not with capsaicin are quite similar. Furthermore, PCA tests showed that IgE titration was exactly the same ($\geq$ 1:80) in immunized mice treated or not with capsaicin. We should stress that the results were exactly the same in all three rats employed for each point of PCA analysis.

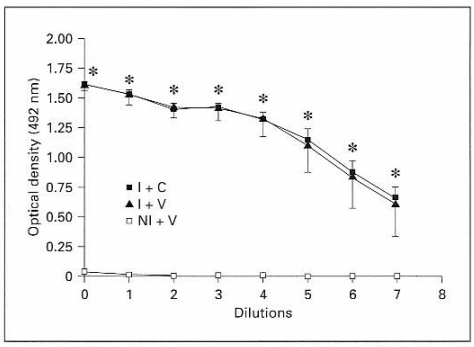

Fig. 2. IgG1 subclass anti-ovalbumin antibody titers in serum derived from immunized mice treated with capsaicin (I + C; n = 4) or vehicle (I + V; n = 4) and from nonimmunized mice treated with vehicle (NI + V; n = 3). The first dilution point is 1/40. Mice were bled for serum collection immediately after the aversive test. Analysis of variance followed by the Tukey-Kramer test was used to determine differences. * $p < 0.05$ comparing I + C and I + V to NI + V. Data are means ± standard deviations.

Finally, the neonatal capsaicin treatment was able to destroy the c-fibers involved in the transmission of sensitive information. Indeed, the amount of Evans blue dye extracted from the hind paw was significantly smaller in animals given capsaicin (77.98 ± 35.72 mg/g tissue) than in mice treated with vehicle (144.97 ± 52.51 mg/g tissue) ($p < 0.05$).

Second Experiment

Data from the second experiment are in keeping with those found in the first one. As can be seen in figure 3a, the neonatal capsaicin treatment induced an increment in the preference for the sweetened solution by immunized mice. When compared to the preference that immunized vehicle-treated animals showed, there was an increment of 117% (if we look at medians). These results, showing that neonatal capsaicin treatment can minimize the magnitude of the immune-induced aversion, suggest that the capsaicin-sensitive c-fibers play a role in developing such an aversion.

Again, there was no difference between immunized mice treated or not with capsaicin in terms of total fluid intake (fig. 3b). Once more, this result shows that the difference observed between the groups in terms of prefer-

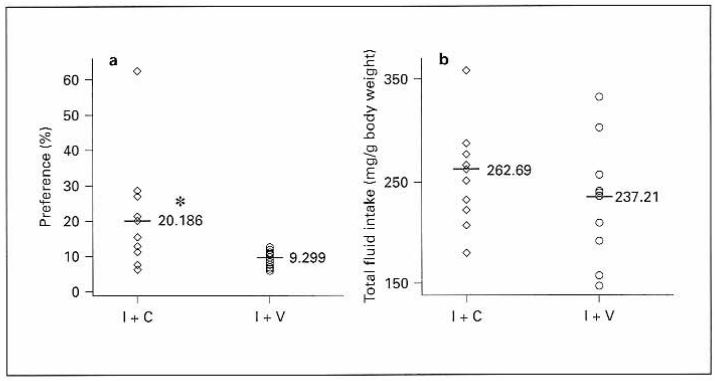

Fig. 3. a Preference for the sweetened egg white solution. Immunized mice treated with capsaicin or vehicle were submitted to the aversive test, which lasted 24 h. Each symbol represents an individual data point. I + C = Immunized mice treated with capsaicin (n = 11); I + V = immunized mice treated with vehicle (n = 11). * $p < 0.05$ (Mann-Whitney test). Horizontal bars represent medians. **b** Total fluid intake (mg/g body weight) of immunized mice treated with capsaicin or vehicle. Each symbol represents an individual data point. I + C = Immunized mice treated with capsaicin (n = 11); I + V = immunized mice treated with vehicle (n = 11). The Mann-Whitney test was used for comparisons. Horizontal bars represent medians.

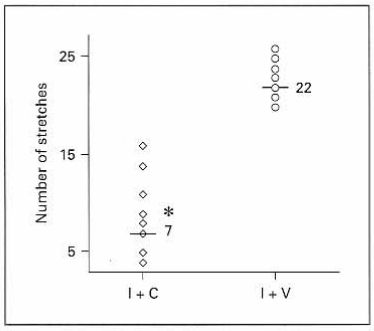

Fig. 4. Immunized vehicle- or capsaicin-treated mice were submitted to the stretching test immediately after the end of the aversive test. Animals were given 0.6% acetic acid (0.1 ml/10 g, i.p.) and then observed for 20 min. Each symbol represents an individual data point. I + C = Immunized mice treated with capsaicin (n = 11); I + V = immunized mice treated with vehicle (n = 11). * $p < 0.05$ (Mann-Whitney test). Horizontal bars represent medians.

ence for the sweetened solution is related to a greater consumption of egg white.

Figure 4 shows that neonatal capsaicin treatment was able to destroy the sensory c-fibers, because capsaicin-treated mice showed a decrease in the number of stretches induced by acetic acid. Figure 4 also shows that the efficacy of capsaicin treatment was quite variable. We should remember that in this second experiment, the efficacy of capsaicin treatment was assessed in the same mice which were submitted to the aversive test. Thus, we were able to analyze those data in a correlative fashion. The Spearman rank correlation coefficient was equal to –0.02299. Although the negative coefficient means that capsaicin-treated mice showing a greater preference for the sweetened egg white solution tend to rank lower in the stretching test, this coefficient is not significant ($p = 0.9462$).

Discussion

Taken together, the present results show that: (1) flavor preference was altered by an immune reaction (leading to a behavioral shift), and (2) neonatal capsaicin treatment was successful in increasing the preference for the sweetened solution by immunized mice, when compared to immunized vehicle-treated animals, raising the possibility of a relevant role for type c-sensitive fibers in the development of the aversion to the antigen presented in the diet. The increment in preference was about 65% for the first set of experiments and over 117% for the second.

The aversive test model employed in this study clearly shows the participation of the immune system in diet selection. As a matter of fact, we confirmed here the data presented before by Cara et al. [1] and Cara [15], who showed a preference for the sweetened solution by nonimmunized animals, while ovalbumin-immunized mice avoided the consumption of an antigen-containing sweetened solution, drinking water instead.

Data resulting from the neonatal capsaicin treatment provided some information that can be helpful in answering one of our primary questions: how can an anaphylactic immune reaction generate information that can

be of any use by the CNS? Capsaicin treatment (50 mg/kg) failed to prevent an immune reaction induction of aversion in immunized animals. Nevertheless, it should be noted that capsaicin-treated immunized mice presented an increment in their preference for the sweetened egg white solution, when compared to vehicle-treated immunized mice. Data provided by two independent sets of experiments showed a very similar pattern for these results. We should stress that, under our working conditions, this difference was caused by an increment in the consumption of the sweetened solution, with no differences being observed regarding the total fluid intake (or decrease in the water consumption) among mice from both groups. Moreover, neonatal capsaicin treatment (50 mg/kg) did not interfere with the production of anaphylactic antibodies directed at ovalbumin in immunized animals, which could alter by itself their avoidance of the sweetened egg white solution.

Using the same experimental model, Andrade [2] demonstrated the fundamental role of IgE-type anaphylactic antibodies. In the presence of antigen, these antibodies lead to the degranulation of mast cells, most probably through receptors present on their membrane. This may be the cause of the inflammatory signs, including edema, which were reported by Cara [15]. The release and/or synthesis of inflammatory mediators by mast cell degranulation could be the source of the information which is recognized (and transferred) by sensitive nerve endings existing in juxtaposition to these cells. In this regard, the depolarization of neurons which are cocultured with mast cells challenged by either IgE or compound 48/80 (a mast cell degranulator) has already been reported [16]. Therefore, the greater preference for the sweetened egg white solution by capsaicin-treated immunized animals suggests an important role for capsaicin-sensitive nerve endings in the transmission of the information generated by the immune reaction to the CNS. In fact, Castex et al. [17] demonstrated that capsaicin-sensitive vagal fibers are responsible for transmission of the information generated by the intestinal administration of ovalbumin to previously immunized rats. Their experiments revealed that such fibers are necessary for inducing c-fos expression in specific brain areas following an immune response.

The failure of capsaicin treatment to prevent an immune response-induced decrease in the preference of the mice for a sweetened solution could be explained by some characteristics of its action on neurons and some sensitive fibers. In this regard, Carobi [18] showed that following neonatal capsaicin administration to rats, only a 30% reduction was observed in the number of nodose ganglion neurons, compared to the controls. In addition to that, although 99% of abdominal vagal fibers have been shown to be small unmyelinated c-fibers [19], Berthoud et al. [20] reported the existence of capsaicin-resistant afferent vagal fibers in different areas of the gastrointestinal tract. Hence, it is conceivable that the neonatal capsaicin treatment was capable of destroying the c-fibers to a certain extent, which was only sufficient to increase the preference for the sweetened solution by immunized animals; i.e. the destruction was not enough to prevent the development of aversion. An individual variation in the resistance to the capsaicin treatment should also be kept in mind; therefore, the establishment of a correlation between the efficacy of capsaicin treatment in areas adjacent to the gastrointestinal tract and the behavior of each animal in the aversive test could be extremely helpful for comprehending this phenomenon. Unfortunately, this was not done for the first experiment. In the second experiment, the Spearman rank correlation showed that there was no correlation between the efficacy of capsaicin treatment and the preference of each animal for the sweetened solution. This information could suggest that the pathway involving visceral pain might not be the same as that involved in the establishment of immune-induced flavor aversion. Visceral painful information is supposed to be carried by a spinal pathway [21]. In fact, two different nervous pathways could be considered in this model. One of them is through the vagus nerve and the other one through the spinal cord [22]. This issue will be addressed in future experimental designs.

Finally, another possibility to be considered is that the information could be transmitted to the CNS by more than one pathway. It means that we might have blocked one (capsaicin-sensitive c-fibers) but not all of them; thus, the information could still reach the CNS by others ways. Our data have shown that the signals which do not depend on capsaicin-sensitive c-fibers can still elicit flavor aversion, therefore evidencing their importance in this phenomenon. That possible pathway could be blood-borne cytokines. Mast cell degranulation leads to the release of several mediators (such as IL-1) that might, somehow, reach the blood and possibly, by crossing the blood-brain barrier, affect CNS function and consequently animal behavior [23].

The experimental model used by our group (immunologically induced change in flavor preference) allows us to discuss the importance of the immune system to the organism as a whole. Blalock [24] published an article in 1984 entitled 'The immune system as a sensory organ'. It was suggested in this article that the immune system

works as a sensorial organ for what he called 'noncognitive' stimuli; such stimuli as virus, bacteria, protozoan and even single antigens could not be 'noticed' by the nervous system itself. Therefore, the immune system would be responsible for identifying these stimuli and signaling to the CNS in a comprehensive ('cognitive') format, and so elicit an organized adaptive response to deal with such stimuli [24]. In the present experimental model, the immune response generated by a dietary antigen would serve as an afferent pathway to the CNS, turning a 'noncognitive' stimulus into a signal that leads to a highly organized behavioral response. The animal must differentiate between two solutions and make a choice, changing its natural flavor preference. Thus, no doubts remain regarding the involvement of cognitive processes in the events described by us in this study.

The present data suggest that at least part of such communication between this particular immune response to a dietary antigen and the CNS is made by capsaicin-sensitive c-fibers, which occur in juxtaposition to mast cells located in the intestinal mucosa.

Acknowledgments

This study, part of the MS dissertation presented by A.S.B. to the Department of Pathology of the School of Veterinary Medicine of the University of São Paulo, was financially supported by FAPESP (grant numbers 1999/04228-7 and 1996/10000-0) and CNPq (grant number 520050/97-5NV), to whom the authors wish to express their gratitude. The authors would also like to thank Dr. Maria Fernanda Macedo Soares (Butantan Institute), who kindly supplied the rat anti-mouse IgG1 antiserum for ELISA and helped us with antibody titration, and Mr. Frederico Azevedo da Costa Pinto for his great help in preparing the manuscript.

References

1 Cara DC, Conde AA, Vaz NM: Immunological induction of flavor aversion in mice. Braz J Med Biol Res 1994;27:1331–1341.
2 Andrade MC: Participação da reação de hipersensibilidade imediata no desencadeamento da aversão à ingestão de clara de ovo em camundongos imunizados com ovalbumina; dissertação (mestrado), Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB UFMG, Belo Horizonte, 1999.
3 Cara DC, Conde AA, Vaz NM: Immunological induction of flavor aversion in mice. II. Passive/adoptive transfer and pharmacological inhibition. Scand J Immunol 1997;45:16–20.
4 Stead RH, Dixon MF, Bramwell NH, Riddell RH, Bienenstock J: Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa. Gastroenterology 1989;97:575–585.
5 Stead RH, Tomioka M, Quinonez G, Simon GT, Felten SY, Bienenstock J: Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84:2975–2979.
6 Perdue MH, Forstner JF, Roomi NW, Gall DG: Epithelial response to intestinal anaphylaxis in rats: Goblet cell secretion and enterocyte damage. Am J Physiol 1984;247:G632–G637.
7 Perdue MH, Gall DG: Intestinal anaphylaxis in the rat: Jejunal response to in vitro antigen exposure. Am J Physiol 1985;250:G427–G431.
8 Perdue MH, Gall DG: Rat jejunal mucosal response to histamine and anti-histamines in vitro. Comparison with antigen-induced changes during intestinal anaphylaxis. Agents Actions 1986;19:5–9.
9 Crowe SE, Sestini P, Perdue MH: Allergic reactions of rat jejunal mucosa. Ion transport responses to luminal antigen and inflammatory mediators. Gastroenterology 1990;99:74–82.
10 Williams RM, Berthoud HR, Stead RH: Vagal afferent nerve fibres contact mast cells in rat small intestinal mucosa. Neuroimmunomodulation 1997;4:266–270.
11 Furness JB, Kunze WAA, Bertrand PP, Clerc N, Bornstein JC: Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. Prog Neurobiol 1998; 54:1–18.
12 Mota I, Wong D: Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. Life Sci 1969;8:813–820.
13 Jancsó G, Kiraly E, Jancso-Gabor A: Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. Nature 1977;270:741–743.
14 Ribeiro RA, Vale ML, Thomazzi SM, Paschoalato ABP, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ: Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. Eur J Pharmacol 2000;387:111–118.
15 Cara DC: Mudança de preferência a sabores induzida imunologicamente em camundongos; Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP, São Paulo, 1995.
16 Janiszewski J, Bienenstock J, Blennerhassett MG: Activation of rat peritoneal mast cells in coculture with sympathetic neurons alters neuronal physiology. Brain Behav Immun 1990;4: 139–150.
17 Castex N, Fioramonti J, Fargeas MJ, Bueno L: c-fos expression in specific rat brain nuclei after intestinal anaphylaxis: Involvement of 5-HT3 receptors and vagal afferent fibers. Brain Res 1995;688:148–160.
18 Carobi C: A quantitative investigation of the effects of neonatal capsaicin treatment on vagal afferent neurons in the rat. Cell Tissue Res 1996;283:305–311.
19 Prechtl JC, Powley TL: The fiber composition of the abdominal vagus of the rat. Anat Embryol (Berl) 1990;181:101–115.
20 Berthoud HR, Patterson LM, Willing AE, Mueller K, Neuhuber WL: Capsaicin-resistant vagal afferent fibers in the rat gastrointestinal tract: Anatomical identification and functional integrity. Brain Res 1997;746:195–206.
21 Willis WD, Al-Chaer ED, Quast MJ, Westlund KN: A visceral pain pathway in the dorsal column of the spinal cord. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:7675–7679.
22 Furness JB, Kunze WAA, Clerc N: Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: Neural, endocrine, and immune responses. Am J Physiol 1999;277:G922–G928.
23 Banks WA, Kastin AJ, Broadwell RD: Passage of cytokines across the blood-brain barrier. Neuroimmunomodulation 1995;2:241–248.
24 Blalock JE: The immune system as a sensory organ. J Immunol 1984;132:1067–1070.

ELSEVIER

Journal of Neuroimmunology 140 (2003) 69–77

Journal of Neuroimmunology

www.elsevier.com/locate/jneuroim

Neural correlates of IgE-mediated food allergy

Alexandre Salgado Basso[a], Frederico Azevedo Costa Pinto[a], Momtchilo Russo[b], Luiz Roberto Giorgetti Britto[c], Luiz Carlos de Sá-Rocha[a], João Palermo Neto[a,*]

[a] *Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, São Paulo 05508-900, Brazil*
[b] *Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil*
[c] *Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil*

Received 1 April 2003; accepted 23 April 2003

Abstract

Although many authors have considered the possibility of a direct interaction between food allergy and behavioral changes, the evidence supporting this hypothesis is elusive. Here, we show that after oral ovalbumin (OVA) challenge, allergic mice present higher levels of anxiety, increased Fos expression in emotionality-related brain areas, and aversion to OVA-containing solution. Moreover, treatment with anti-IgE antibody or induction of oral tolerance abrogate both food aversion and the expression of c-*fos* in the central nervous system (CNS). Our findings establish a direct relationship between brain function and food allergy, thus creating a solid ground for understanding the etiology of psychological disorders in allergic patients.
© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Food allergy; IgE; Emotionality; Psychoneuroimmunology; c-*fos*; CNS; Psychological disorders

1. Introduction

Food allergy and other allergic diseases have emerged as major public health problems due to their dramatic increase over the past two to three decades. It is estimated that approximately 8% of children and 2% of the adult population suffer from food allergy (Sampson, 1999; Sampson and Burks, 1996). Additionally, food-induced anaphylaxis is now the leading single cause of anaphylactic reactions treated in hospitals in the USA and UK (Sampson, 2000; Wuthrich and Ballmer-Weber, 2001). Food-induced allergic reactions are responsible for a myriad of symptoms involving the skin, gastrointestinal (GI) tract, and airways (Crowe and Perdue, 1992; Sampson, 1999). In the GI tract, mast cell degranulation (triggered by cross-linking of IgE, bound to its high-affinity receptor) results in an augmentation of ion secretion by the epithelium and an increase in vascular permeability accompanied by contraction of smooth muscle layers and edema of the mucosa (Bischoff et al., 2000; Yu and Perdue, 2001). This jeopardizes the integrity of the epithelial barrier, thus favoring the penetration of other antigens (Ags) (Bischoff et al., 2000; Yu and Perdue, 2001). Although the cellular and molecular mechanisms underlying food allergy are well understood, little is known about the effect of food allergy on brain function. Some authors have reported an association between food allergy and behavioral changes (Atkins, 1986; Crayton, 1986; Gettis, 1989). Indeed, it has been shown that human patients suffering from food allergy present higher prevalence of trait anxiety and/or depression than nonhealthy controls with lactose intolerance and healthy controls (Addolorato et al., 1998). However, in similar studies, other authors have failed to find this association (Pearson et al., 1983; Peveler et al., 1996), arguing that the diagnosis of psychological symptoms in allergic patients was due to an artifact of referral bias (Peveler et al., 1996). The main argument against allergy-induced psychological symptoms has been the lack of supportive evidence for a direct effect of allergy on neural activity and behavior (Pearson, 1988).

In the present study, we investigated whether food allergy could modulate neural activity and behavior. More specifically, we examined c-*fos* expression in brain areas that are involved in the emotional and affective aspects of adaptive and behavioral responses. For this purpose, a

* Corresponding author. Tel.: +55-11-30917957; fax: +55-11-30917829.
E-mail address: jpalermo@usp.br (J. Palermo Neto).

0165-5728/03/$ - see front matter © 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/S0165-5728(03)00166-8

mouse model known to induce changes in feeding behavior after immunization with ovalbumin (OVA) was employed. In this model, when a sweetened OVA-containing solution is offered to OVA-immunized or nonimmunized mice, in a two-bottle preference test, the OVA-immunized animals but not the nonimmunized, avoided drinking the OVA-containing solution (Basso et al., 2001; Cara et al., 1994). Here, we show that food aversion of allergic mice is associated with increased levels of anxiety and with increased c-*fos* activity in emotionality-related brain areas, such as the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) and the central nucleus of the amygdala (CeA). We also show that induction of immunological tolerance or treatment with non-anaphylactic anti-IgE antibodies block these alterations. This study shows a direct effect of food allergy on brain function and behavior, indicating some pathways by which allergic reactions influence emotionality.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Six- to eight-week-old male BALB/c mice were obtained from our colony at the Department of Pathology, School of Veterinary Medicine—USP, São Paulo, Brazil. The animals were housed accordingly in a controlled temperature (22–26 °C) and artificially lighted room on a 12-h-light–12-h-dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) with free access to rodent chow and water. Animals were housed and used in accordance with the guidelines of the Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources of the School of Veterinary Medicine, University of São Paulo; these guidelines are similar to those of the National Research Council, USA.

2.2. OVA immunization

Mice were immunized on days 0 and 14 with an intraperitoneal injection of 4 μg grade V chicken egg OVA (Sigma, St. Louis, MO) and 1.6 mg of aluminum hydroxide gel suspended in PBS to a total volume of 0.4 ml.

2.3. Oral Ag administration

Oral tolerance to OVA was induced by offering the animals ad libitum a 1% OVA (grade II, Sigma) solution dissolved in drinking water for 5 consecutive days before sensitization (day 0). This solution was freshly prepared each 24 h.

2.4. Anti-IgE antibody treatment

Mice were treated intravenously with 0.25 mg purified rat IgG1 anti-mouse IgE (clone R35-92, Pharmingen, San Diego, CA) or control rat IgG (Sigma) in a total volume of 0.25 ml, 1 h after the second OVA immunization (day 14).

2.5. Two-bottle preference test

On day 18, mice were housed individually. Each individual cage was supplied with two identical bottles (both filled with water) at opposite sides. Three days later (day 21), one of the bottles was filled with a sweetened (0.5% saccharin) solution of egg white (20%) in water. The other bottle remained filled with water. Every bottle was weighed immediately before the beginning of the aversive test and after 24 h. The total fluid intake (water plus sweetened egg white solution) was expressed as grams of ingested solution. To evaluate their preference for the sweetened solution, we used the following calculation: percentage of preference = sweetened solution of egg white consumption/total fluid intake × 100.

2.6. Behavioral analysis

Mice were submitted to oral water delivery by gavage for 3 consecutive days preceding day 21. This allowed habituation to the procedure and minimized possible handling- or gavage-induced behavioral changes. On day 21, mice were given 0.5 ml OVA-containing solution (60% egg white solution in water) by gavage. One hour after oral OVA challenge, mice were observed in an open field similar to that described earlier (Palermo Neto et al., 2001). Briefly, the open field consists of a round wooden arena (45 cm diameter, 20-cm-high walls) painted white and with its floor divided in several cells of equal size. Each mouse was individually placed in the center of the apparatus, being observed for 5 min for ambulation frequency (total entries into cells). Behavioral analysis in the plus maze was performed immediately after the end of the open-field test. The plus maze device used was made of wood and had two open arms (15 × 5 cm) and two enclosed arms of the same size with 15-cm-high walls. The apparatus is elevated 100 cm above the ground and is configured in such way that similar arms are placed opposite each other. Each mouse was placed in the central area of plus maze and allowed 5 min of free exploration. The time spent in open arms and enclosed arms exploration were recorded. The percentage of time spent in the open arms is inversely correlated with level of anxiety in this test.

2.7. Fos immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on samples collected 90 min after oral OVA challenge. Mice were deeply anesthetized with xylazine and ketamine and immediately perfused intracardially with 25 ml of 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) followed by 100 ml

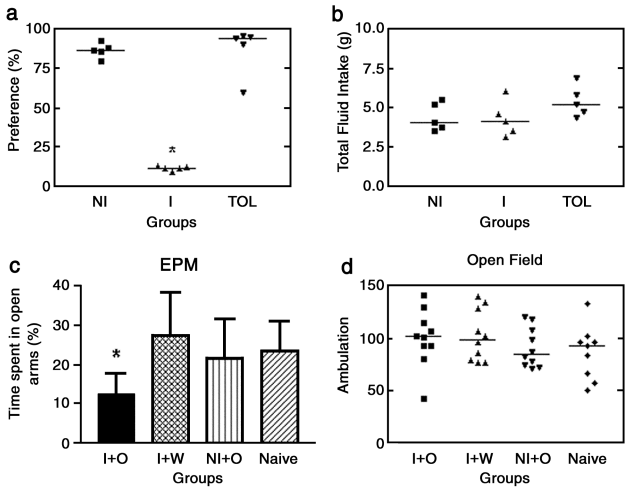

Fig. 1. Behavioral changes in allergic mice. (a) Two-bottle preference test. Preference for the sweetened OVA-containing solution by individual mice shows that while tolerant (TOL) and nonimmunized (NI) mice preferred drinking the antigen-containing solution, immunized (I) animals developed food aversion, choosing water over the sweetened OVA solution. Horizontal bars represent medians. $n=5$ in each group. *Significant difference from all other groups by the Kruskall–Wallis test followed by the Kolmogorov–Smirnov two-sample test ($P<0.05$). (b) Total fluid intake for individual mice show a similar distribution of values for NI, I, and TOL groups. Horizontal bars represent medians. (c) Elevated plus maze test (EPM). One hour after oral challenge, immunized mice receiving OVA (I+O) presented increased levels of anxiety as they spent less time exploring the open arms of the EPM than those that received water (I+W), the nonimmunized mice receiving OVA (NI+O), and the naive mice. $n=10$ in each group. *Significant decrease compared to all other groups by ANOVA followed by post hoc Student–Newman–Keuls test [mean ± S.D.; $F(3,36)=5.17$, $P<0.05$]. (d) Open field. Numbers of entries in cells of the open field for individual mice show that ambulation frequency was similar among the groups. Horizontal bars represent medians. $n=10$ in each group.

of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB). Their brains were removed and postfixed for at least 5 h in the same fixative and cryoprotected overnight in 30% sucrose in PB. Coronal, frozen 30-μm sections were cut and collected in PB. Floating sections were incubated overnight with an antiserum directed against the Fos protein (Ab-5, Calbiochem, San Diego, CA). The Fos antibody was used at 1:1000 in a solution of 5% normal goat serum in PB with 0.3% Triton X-100. After washing, the sections were incubated for 90 min with a biotinylated goat anti-rabbit antibody (Jackson, West Grove, PA) diluted at 1:200. Following incubation with avidin–biotin complex (Vectastain kit, Vector, Burlingame, CA), peroxidase activity was revealed using diaminobenzidine as chromogen and hydrogen peroxide. The sections were mounted on gelatin-coated slides, dehydrated, and coverslipped. In some cases, counterstaining with Giemsa helped the evaluation of the percentage of Fos-positive neurons. Numbers of stained nuclei were estimated using an image analysis software (Image-Pro® Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

2.8. Determination of OVA-specific IgG1

OVA-specific serum IgG1 antibodies were assayed by sandwich ELISA as described earlier (Russo et al., 2001). Briefly, Nunc-Immuno Plates Maxi-Sorb (Inter-Med, São Paulo, Brazil) were coated overnight at 4 °C with 2 μg of OVA per well, washed with (PBS)–Tween 0.05%, and blocked with 0.25% casein in PBS. After washing, the serum samples were added and incubated for 1 h. The bound antibodies were revealed by the addition of 1 μg/ml of goat anti-mouse IgG1 for 1 h followed by washings and the addition of peroxidase-conjugated rabbit anti-goat IgG (H+L) antibodies (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) for 1 h. After washings, the reaction was developed by addition of 100 μl/well of substrate containing 0.5 mg/ml of *o*-orthophenylenediamine dihydrochloride (Sigma) and 0.0015% of H_2O_2 in 0.1 M citric acid/sodium citrate buffer (Merck, São Paulo, Brazil), pH 5.0. The reaction was stopped with 4 M H_2SO_4 and the absorbance of the samples determined at 490 nm using a Multiskan EX (Thermo Labsystems, Vantaa, Finland). The concentrations of IgG1 antibodies were estimated by comparison with IgG1 standards run in parallel on plates coated with rabbit anti-mouse Ig (Southern Biotechnology).

2.9. Determination of OVA-specific IgE

For OVA specific serum IgE determinations, plates were coated overnight at 4 °C with 2 μg/ml of goat anti-mouse IgE antibodies (Southern Biotechnology). The serum samples were added to the wells followed by biotin-labeled

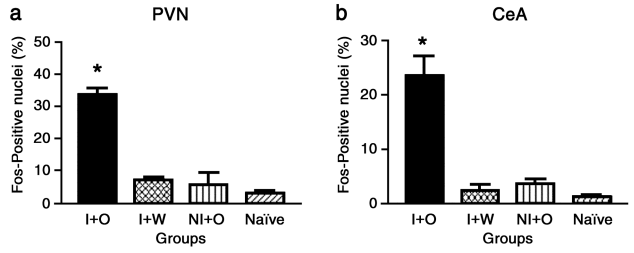

Fig. 2. c-*fos* expression in emotionality-related brain areas of allergic mice. Immunized mice receiving OVA (I+O) presented increased number of Fos-positive nuclei than that observed in immunized animals that received water (I+W), in nonimmunized mice receiving OVA (NI+O), and in naive mice. c-*fos* expression was evaluated 90 min after oral challenge. (a) Paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). $n=3–4$ in each group. *Significant increase compared to all other groups by ANOVA followed by post hoc Tukey–Kramer test [mean ± S.D.; $F(3,9)=86.3$, $P<0.01$]. (b) Central nucleus of the amygdala. $n=3–4$ in each group. *Significant increase compared to all other groups by ANOVA followed by post hoc Tukey–Kramer test [mean ± S.D.; $F(3,9)=81.95$, $P<0.01$].

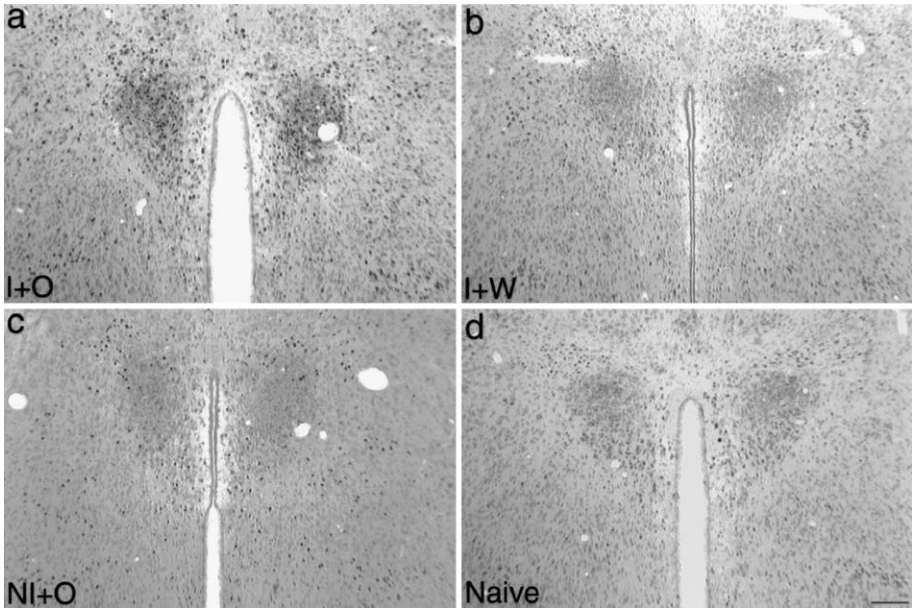

Fig. 3. Food allergy-induced c-*fos* expression in the PVN. Representative brain coronal sections showing intense Fos staining in neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) in immunized mice challenged with an oral dose of OVA solution (a). In contrast, Fos-positive nuclei were almost absent in immunized mice receiving water (b), in nonimmunized animals receiving OVA (c), and in naive mice (d). Counterstained with Giemsa. Scale bar, 100 μm.

OVA. The bound OVA-biotin was revealed by extrAvidin peroxidase conjugated (Sigma) followed by 100 ml/well of substrate as described above. OVA-specific IgE levels of samples were related to an internal standard obtained from pooled sera of hyperimmunized BALB-c mice that was arbitrarily assigned to be 1000 U.

3. Results

3.1. Allergic mice develop food aversion

We first determined the feeding behavior of allergic animals. For this, we used an experimental model in which

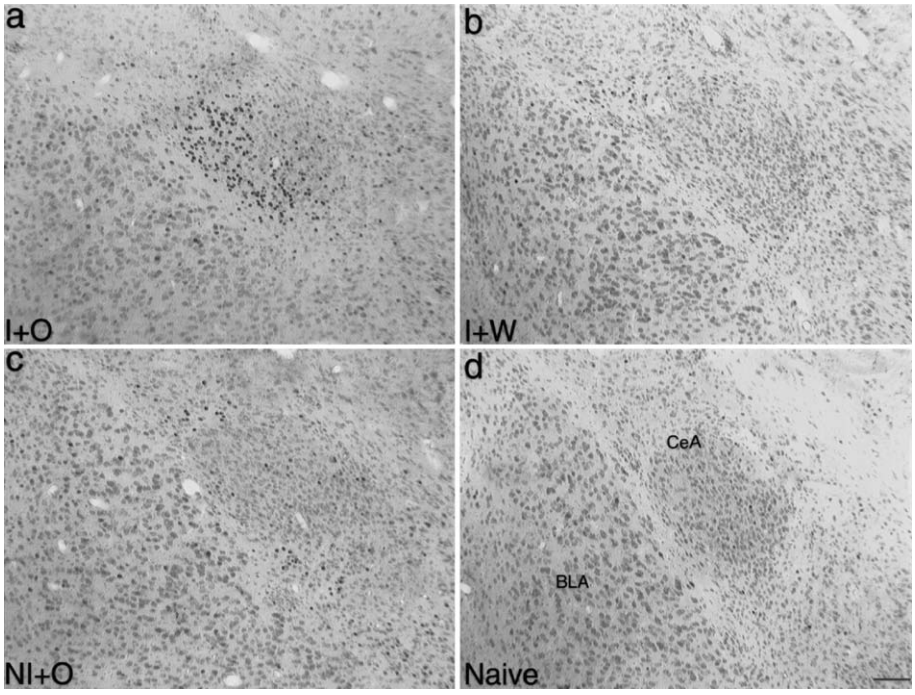

Fig. 4. Food allergy-induced c-*fos* expression in the CeA. Representative brain coronal sections showing intense Fos staining in neurons of the central nucleus of the amygdala (CeA) in immunized mice challenged with an oral dose of OVA solution (a). In contrast, Fos-positive nuclei were almost absent in immunized mice receiving water (b), in nonimmunized animals receiving OVA (c), and in naive mice (d). BLA, basolateral nucleus; CeA, central nucleus. Counterstained with Giemsa. Scale bar, 100 μm.

nonimmunized or OVA-immunized mice face the choice of drinking either water or a sweetened OVA-containing solution (Cara et al., 1994). We found that nonimmunized animals preferred the sweetened OVA-containing solution while OVA-immunized animals developed food aversion as they preferred drinking water over the sweetened Ag-containing solution (Fig. 1a). It appears that food aversion is triggered by OVA-specific antibodies (Cara et al., 1994). Therefore, we next examined whether the induction of oral tolerance to OVA would block food aversion. It was previously shown that the induction of oral tolerance by exposing mice to OVA in the drinking water before OVA immunization suppresses Th2-associated allergic responses (Russo et al., 2001). We found that mice exposed to 1% OVA dissolved in the drinking water for 5 consecutive days did not develop food aversion. Instead, tolerant mice showed the same preference for the sweetened OVA-containing solution as that presented by nonimmunized animals (Fig. 1a). Moreover, total liquid intake (sweetened OVA solution plus water) did not differ among experimental groups (Fig. 1b), indicating that the reduction of preference for the sweetened OVA-containing solution by immunized mice was due to a decreased intake of the antigen-containing solution and increased water intake.

3.2. Allergic mice present anxiety-like behavior

To further explore the repercussion of food allergy on the central nervous system (CNS), we examined the anxiety-like behavior of allergic mice. OVA-immunized mice were challenged by an oral dose of OVA and observed 1 h later in an open field, and subsequently, in an elevated plus maze (EPM). The EPM is a validated behavioral model widely employed for the quantitative analysis of anxiety in rats and mice (Lister, 1987; Pellow et al., 1985). Rodents naturally avoid open areas, and drugs or anxiogenic stimuli induce even shorter time of exploration of the open arms of this arena (Lister, 1987; Pellow et al., 1985). Oral OVA delivery to immunized mice induced a clear anxiogenic effect (Fig. 1c). Thus, we observed that mice from the I + O group (immunized receiving OVA) spent less time exploring the open arms of the EPM than those that received water (I + W) than nonimmunized mice receiving OVA solution (NI + O) and naive mice (Fig. 1c). No difference was detected between naive animals and those from I + W or NI + O groups (Fig. 1c), showing that the anxiogenic effect observed was not induced by forced ingestion itself. Furthermore, oral presentation of the antigen to immunized mice did not interfere with ambulation in the open field, which is important when interpreting data generated in the EPM (Fig. 1d).

3.3. Allergic mice present increased c-fos expression in emotionality-related brain areas

We were interested in determining which brain areas could be associated with the behavioral changes observed in our model. Since it is well established that c-*fos* expression is a good marker of neuronal activation (Dragunow and Faull, 1989; Sagar et al., 1988), we determined the number of Fos-positive cells in different brain areas. We found that allergic mice had an increased c-*fos*

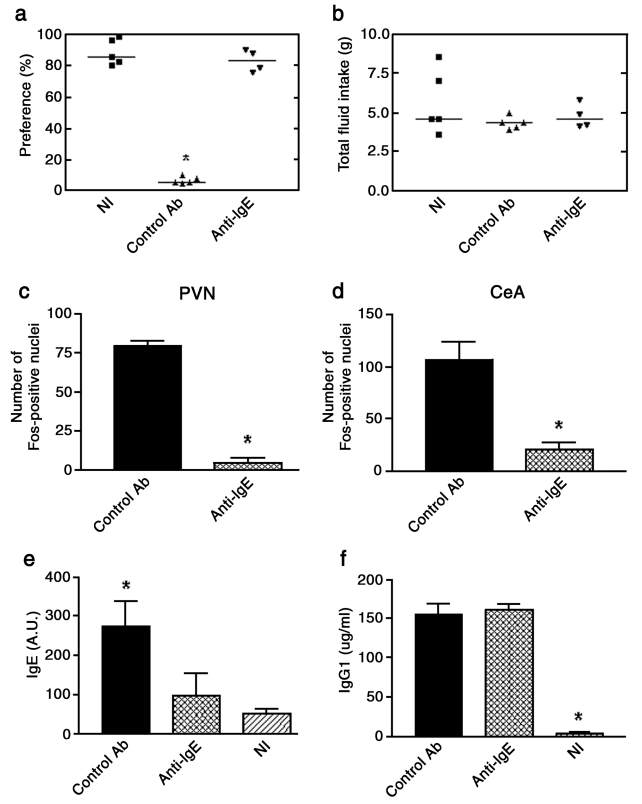

Fig. 5. OVA-specific IgE plays a fundamental role on food allergy-induced behavioral changes and c-*fos* expression. (a) Two-bottle preference test. Preference for the sweetened OVA-containing solution by individual mice show that while nonimmunized (NI) mice and animals treated with anti-IgE antibody (Anti-IgE) preferred drinking the antigen-containing solution, those treated with the control antibody (Control Ab) developed food aversion, choosing water over the sweetened OVA solution. Horizontal bars represent medians. $n = 4–5$ in each group. *Significant difference from all other groups by the Kruskall–Wallis test followed by the Kolmogorov–Smirnov two-sample test ($P < 0.05$). (b) Total fluid intakes for individual mice show a similar distribution of values for NI, Control Ab, and Anti-IgE groups. Horizontal bars represent medians. (c) While mice treated with the control antibody (Control Ab) presented intense Fos staining in neurons of the PVN and CeA (d), few Fos-positive nuclei were observed in animals treated with anti-IgE antibody. $n = 3$ in each group. *Significant decrease compared to Control Ab group by the unpaired Student's *t*-test ($P < 0.05$). Data represent mean ± S.D. (e) Treatment of immunized mice with anti-IgE antibody blocked the appearance of OVA-specific IgE in the serum. While mice treated with the Control Ab presented high levels of IgE, those treated with anti-IgE antibody presented levels similar to that observed in nonimmunized animals (NI). $n = 3$ in each group. *Significant difference from all other groups by ANOVA followed by post hoc Tukey–Kramer test [mean ± S.D.; $F(2,10) = 25.71$, $P < 0.01$]. (f) Treatment of immunized mice with anti-IgE antibody did not interfere with OVA-specific IgG1 production. Mice treated with anti-IgE or with the control antibody presented similar levels of serum IgG1. *Significant difference from all other groups by ANOVA followed by post hoc Tukey–Kramer test [mean ± S.D.; $F(2,10) = 575.51$, $P < 0.01$].

expression mainly in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) and in the central nucleus of the amygdala (CeA). Interestingly, these areas are involved in the generation and control of adaptive responses endowed with emotional or affective contents (Adolphs et al., 1995; Monnikes et al., 1992; Morton et al., 1989). In OVA-immunized animals, we detected a high number of Fos-positive neurons 90 min after OVA challenge in both areas (PVN, Figs. 2a and 3a; CeA, Figs. 2b and 4a). In contrast, Fos-positive neurons were virtually absent in OVA-immunized animals that received water (I + W) (Figs. 3b and 4b), in nonimmunized mice that received OVA (NI + O) (Figs. 3c and 4c), and in naive animals (Figs. 3d and 4d). The presence of nutrients in the intestinal lumen appears to be sufficient to cause CNS stimulation (Raybould, 2002), and therefore, the activation of brain areas described here could be caused simply by ingestion of the antigen-containing solution. Nonetheless, the fact that Fos staining in nonimmunized animals receiving OVA solution (NI + O) was similar to that seen in naive mice and in immunized animals receiving water (I + W) (Fig. 2a and b) does not support this hypothesis.

3.4. The neural correlates of food allergy are IgE dependent

Since oral tolerance prevented the development of food aversion and also suppressed IgE production (data not shown), we asked whether the allergy-induced behavioral changes and increased Fos expression could be attributed to OVA-specific IgE antibodies. To test this hypothesis, we treated the OVA-immunized animals with a non-anaphylactic anti-IgE antibody before OVA challenge and analyzed the development of food aversion and the activation of the brain areas described above. We found that treatment with anti-IgE antibody 7 days before oral OVA challenge prevented food aversion. Thus, while animals treated with control rat IgG developed aversion to the sweetened OVA solution and preferred drinking water, those treated with anti-IgE antibody behaved exactly as nonimmunized mice (NI), choosing the sweetened antigen-containing solution over water (Fig. 5a). Again, the total liquid consumption among different experimental groups did not differ (Fig. 5b). Additionally, anti-IgE treatment markedly reduced activation of emotionality-related brain areas, evidenced by the fact that few Fos-positive neurons were observed in the PVN and CeA of mice treated with anti-IgE (Fig. 5c and d). In contrast, animals that received control (rat IgG) antibodies showed intense Fos staining in neurons of the PVN (Figs. 5c and 6a) and CeA (Figs. 5d and 6b). As expected, treatment with anti-IgE antibody blocked the appearance of OVA-specific IgE antibodies (Fig. 5e). In anti-IgE-treated animals, the level of IgE antibodies was similar to that obtained from nonimmunized animals (NI) (Fig. 5e). We have also demonstrated that anti-IgE treatment did not affect the production of OVA-specific IgG1 antibodies (Fig. 5f). Our results clearly show that IgE antibodies are essential for the development of food aversion and for the activation of the emotionality-related brain areas.

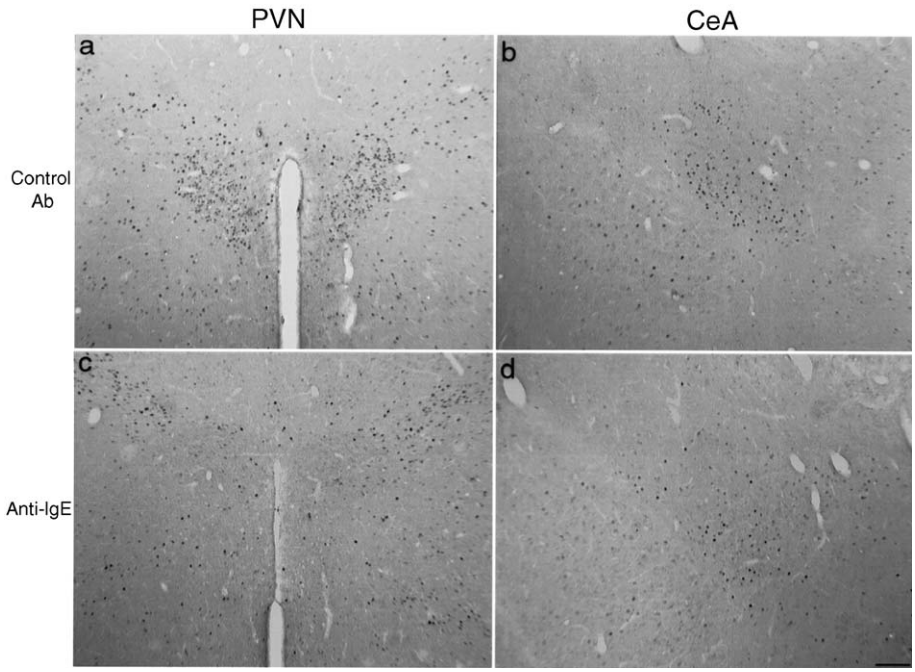

Fig. 6. IgE is essential for food allergy-induced c-*fos* expression in the brain. Representative brain coronal sections showing intense Fos staining in neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) (a) and the central nucleus of the amygdala (CeA) (b) in immunized mice treated with the control antibody (Control Ab). In contrast, few Fos-positive nuclei were observed in the PVN (c) and CeA (d) of mice treated with anti-IgE antibody. Scale bar, 100 μm.

4. Discussion

Previous reports established a solid biochemical and molecular basis for a bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems (Besedovsky and del Rey, 1996; Blalock, 1989). It is known that the nervous, immune, and endocrine systems share a myriad of receptors for cytokines, neurotransmitters, hormones, and neuropeptides. Additionally, molecules previously reported as specific products of one of the systems have also been demonstrated to exist in the others. For instance, cytokines can be synthesized in the CNS, while hormones, such as ACTH and TSH, can be produced by lymphoid cells (Besedovsky and del Rey, 1996). These bidirectional interactions play an important role not only in the physiology of these systems, but also in several pathological processes (Ader et al., 1995).

In the present work, we focused on the relationships between food allergy and changes in CNS activities involved in emotional or affective behavior. Our results demonstrate a direct relationship between food allergy and changes in CNS activities associated with the expression of behavioral responses such as anxiety and aversion.

We first demonstrated that OVA-immunized mice avoid drinking an antigen-containing solution, which indicates that allergy can modulate feeding behavior. These results confirm previous findings (Basso et al., 2001; Cara et al., 1994) and support the notion that allergic responses influence diet selection. Thus, albeit attracted by its sweet flavor, OVA-immunized mice develop an aversion to OVA-containing diet and avoid it henceforth. However, the induction of OVA-specific unresponsiveness by oral tolerance abrogated the development of food aversion.

The development of food aversion prompted us to study further behavioral alterations and changes in the CNS activity that could be associated with the allergic response. To do that we analyzed in allergic mice the occurrence of anxiety-like behavior and c-*fos* expression in specific brain areas. We found that, after oral OVA challenge, OVA-immunized mice presented increased levels of anxiety because they spent less time exploring the open arms of the EPM. High levels of anxiety and development of food aversion are indicative of emotional or affective responses. Indeed, OVA-immunized mice presented enhanced Fos immunoreactivity in the PVN and CeA after oral OVA challenge. These areas are known to be linked with emotional- and affective-related behavioral patterns. Both the PVN and the CeA are among the main areas of the CNS containing corticotropin-releasing factor (CRF)-expressing neurons. CRF is considered one of the major regulators of adaptive stress responses (Gray, 1993; Gray and Bingaman, 1996; Swanson et al., 1983). It has been shown that socially defeated rats placed on the EPM spent less time exploring the open arms and that this response was reversed by a CRF antagonist (α-helical CRF_{9-41}) injected bilaterally into the CeA (Heinrichs et al., 1992). Likewise, studies in which the CRF neurons of the CeA and PVN were immunotargeted and eliminated provide clear evidence for their relevance in the expression of emotionality-related behavior in stressed rats exposed to the EPM (Menzaghi et al., 1993). Activation of the CeA and PVN has also been detected in animals submitted to a model of conditioned taste aversion. In this model, intraperitoneal injection of lithium chloride, which is used as unconditioned stimulus, paired with saccharin (the conditioned stimulus) causes an increased expression of c-*fos* in the CeA (Yamamoto et al., 1997) and PVN (Lamprecht and Dudai, 1995). The importance of CeA activation in this model was established because microinjection of oligonucleotide antisense to c-*fos* into this area resulted in a deficient acquisition of conditioned taste aversion (Lamprecht and Dudai, 1996). Moreover, stimulation of T lymphocytes with staphylococcal enterotoxin B results in an increase in CRF mRNA transcripts in these areas (PVN and CeA) (Kusnecov et al., 1999), c-*fos* expression in the PVN (Goehler et al., 2001), and the expression of emotionality-related behavioral patterns (Kusnecov et al., 1999). Early immune events elicited by peripheral immunization with the T-cell-dependent antigen Keyhole limpet hemocyanin (KLH) have also been shown to induce increased c-*fos* expression in the PVN and CeA (Pacheco-Lopez et al., 2002).

Altogether, studies using animal models, as well as clinical studies in human patients (Morris et al., 1998; Raadsheer et al., 1994), clearly point out the importance of these areas in the generation and modulation of affective responses. Although activation of specific rat brain nuclei after intestinal anaphylaxis has been reported by others (Castex et al., 1995), to our knowledge, this is the first study demonstrating evidence of a direct influence of an allergic reaction to dietary antigens on the development of behavioral responses and CNS alterations compatible with elaborate psychological symptoms.

We also elucidated the triggering mechanism of allergy-induced activation of the CNS and development of food aversion. It is well established that allergic hypersensitivity proceeds through two distinct but related phases: an immediate phase which is mediated by IgE and mast cells and a late phase that is mediated by Th2 cells and eosinophils (Sengoku et al., 2001). Because the expression of anxiety-like behavior and activation of PVN and CeA occurred, respectively, 60 and 90 min after OVA challenge, we suspected that these responses were related to the immediate phase of the allergic reaction. To test this hypothesis, we first blocked OVA-specific IgE and IgG1 production by the induction of oral tolerance. As expected, tolerant mice did not develop food aversion. Although oral tolerance also suppresses late-phase reaction (Russo et al., 2001), the experiments with anti-IgE treatment clearly indicate that food aversion and activation of emotionality-related brain areas are triggered by an IgE-dependent mechanism. Thus, by blocking OVA-specific IgE response, we prevented activation of the PVN and CeA in immu-

nized mice and precluded the aversion to the antigen-containing diet.

It follows that IgE-induced mast cell degranulation is likely to be the major mechanism for food allergy signaling to the brain. Since mast cells are distributed along blood vessels of the intestinal mucosa in intimate contact with substance P-positive nerve fibers (C-type fibers) (Stead et al., 1989; Stead et al., 1987), we hypothesized that mediators released by mast cell degranulation could stimulate the nerve endings of the C-fibers that, in turn, would transmit the sensory information to the CNS. Previous evidence that destruction of C-fibers by capsaicin treatment during neonatal period attenuates food aversion supports this hypothesis (Basso et al., 2001). The cross-talk between C-sensory nerve fibers and mast cells has been shown to influence the intestinal smooth muscle contraction and epithelial ion secretion (Yu and Perdue, 2001). In addition, it has been demonstrated that when in coculture, neurons can depolarize following mast cell activation with anaphylactic anti-IgE antibody or compound 48/80 (Janiszewski et al., 1990). Although our data indicate an important role of mast cells on the neural correlates of food allergy, the mediators involved and the molecular mechanisms are still to be determined.

Employing an experimental model designed to explore interactions between the immune and nervous systems, we demonstrated a clear, direct effect of food allergy on behavior patterns, as well as related changes in the CNS. Furthermore, we elucidated the triggering mechanism of these allergy-induced alterations. Our data provide valuable insight for future studies aimed at understanding the development of psychological disorders in allergic patients.

Acknowledgements

We thank Adilson Alves and Eliane Gomes for technical assistance and Suzana S. Couto for reading the manuscript. This work was supported by FAPESP grants 00/07126-0 and 99/0428-7.

References

Addolorato, G., Marsigli, L., Capristo, E., Caputo, F., Dall'Aglio, C., Baudanza, P., 1998. Anxiety and depression: a common feature of health care seeking patients with irritable bowel syndrome and food allergy. Hepatogastroenterology 45, 1559–1564.

Ader, R., Cohen, N., Felten, D., 1995. Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. Lancet 345, 99–103.

Adolphs, R., Tranel, D., Damasio, H., Damasio, A.R., 1995. Fear and the human amygdala. J. Neurosci. 15, 5879–5891.

Atkins, F.M., 1986. Food allergy and behavior: definitions, mechanisms and a review of the evidence. Nutr. Rev. 44, 104–112 (Suppl.).

Basso, A.S., de Sa-Rocha, L.C., Palermo-Neto, J., 2001. Immune-induced flavor aversion in mice: modification by neonatal capsaicin treatment. Neuroimmunomodulation 9, 88–94.

Besedovsky, H.O., del Rey, A., 1996. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. Endocr. Rev. 17, 64–102.

Bischoff, S.C., Mayer, J.H., Manns, M.P., 2000. Allergy and the gut. Int. Arch. Allergy Immunol. 121, 270–283.

Blalock, J.E., 1989. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. Physiol. Rev. 69, 1–32.

Cara, D.C., Conde, A.A., Vaz, N.M., 1994. Immunological induction of flavor aversion in mice. Braz. J. Med. Biol. Res. 27, 1331–1341.

Castex, N., Fioramonti, J., Fargeas, M.J., Bueno, L., 1995. c-*fos* expression in specific rat brain nuclei after intestinal anaphylaxis: involvement of 5-HT3 receptors and vagal afferent fibers. Brain. Res. 688, 149–160.

Crayton, J.W., 1986. Adverse reactions to foods: relevance to psychiatric disorders. J. Allergy Clin. Immunol. 78, 243–250.

Crowe, S.E., Perdue, M.H., 1992. Gastrointestinal food hypersensitivity: basic mechanisms of pathophysiology. Gastroenterology 103, 1075–1095.

Dragunow, M., Faull, R., 1989. The use of c-*fos* as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. J. Neurosci. Methods 29, 261–265.

Gettis, A., 1989. Food sensitivities and psychological disturbance: a review. Nutr. Health 6, 135–146.

Goehler, L.E., Gaykema, R.P., Hansen, M.K., Kleiner, J.L., Maier, S.F., Watkins, L.R., 2001. Staphylococcal enterotoxin B induces fever, brain c-*fos* expression, and serum corticosterone in rats. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 280, R1434–R1439.

Gray, T.S., 1993. Amygdaloid CRF pathways. Role in autonomic, neuroendocrine, and behavioral responses to stress. Ann. N. Y. Acad. Sci. 697, 53–60.

Gray, T.S., Bingaman, E.W., 1996. The amygdala: corticotropin-releasing factor, steroids, and stress. Crit. Rev. Neurobiol. 10, 155–168.

Heinrichs, S.C., Pich, E.M., Miczek, K.A., Britton, K.T., Koob, G.F., 1992. Corticotropin-releasing factor antagonist reduces emotionality in socially defeated rats via direct neurotropic action. Brain Res. 581, 190–197.

Janiszewski, J., Bienenstock, J., Blennerhassett, M.G., 1990. Activation of rat peritoneal mast cells in coculture with sympathetic neurons alters neuronal physiology. Brain Behav. Immun. 4, 139–150.

Kusnecov, A.W., Liang, R., Shurin, G., 1999. T-lymphocyte activation increases hypothalamic and amygdaloid expression of CRH mRNA and emotional reactivity to novelty. J. Neurosci. 19, 4533–4543.

Lamprecht, R., Dudai, Y., 1995. Differential modulation of brain immediate early genes by intraperitoneal LiCl. NeuroReport 7, 289–293.

Lamprecht, R., Dudai, Y., 1996. Transient expression of c-*fos* in rat amygdala during training is required for encoding conditioned taste aversion memory. Learn. Mem. 3, 31–41.

Lister, R.G., 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. Psychopharmacology (Berl.) 92, 180–185.

Menzaghi, F., Heinrichs, S.C., Pich, E.M., Weiss, F., Koob, G.F., 1993. The role of limbic and hypothalamic corticotropin-releasing factor in behavioral responses to stress. Ann. N. Y. Acad. Sci. 697, 142–154.

Monnikes, H., Heymann-Monnikes, I., Tache, Y., 1992. CRF in the paraventricular nucleus of the hypothalamus induces dose-related behavioral profile in rats. Brain Res. 574, 70–76.

Morris, J.S., Ohman, A., Dolan, R.J., 1998. Conscious and unconscious emotional learning in the human amygdala. Nature 393, 467–470.

Morton, K.D., Van de Kar, L.D., Brownfield, M.S., Bethea, C.L., 1989. Neuronal cell bodies in the hypothalamic paraventricular nucleus mediate stress-induced renin and corticosterone secretion. Neuroendocrinology 50, 73–80.

Pacheco-Lopez, G., Espinosa, E., Zamorano-Rojas, H.M., Ramirez-Amaya, V., Bermudez-Rattoni, F., 2002. Peripheral protein immunization induces rapid activation of the CNS, as measured by c-*fos* expression. J. Neuroimmunol. 131, 50–59.

Palermo Neto, J., Massoco, C.O., Favare, R.C., 2001. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. Neurotoxicol. Teratol. 23, 497–507.

Pearson, D.J., 1988. Psychologic and somatic interrelationships in allergy and pseudoallergy. J. Allergy Clin. Immunol. 81, 351–360.

Pearson, D.J., Rix, K.J., Bentley, S.J., 1983. Food allergy: how much in the mind? A clinical and psychiatric study of suspected food hypersensitivity. Lancet 1, 1259–1261.

Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open:-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J. Neurosci. Methods 14, 149–167.

Peveler, R., Mayou, R., Young, E., Stoneham, M., 1996. Psychiatric aspects of food-related physical symptoms: a community study. J. Psychosom. Res. 41, 149–159.

Raadsheer, F.C., Hoogendijk, W.J., Stam, F.C., Tilders, F.J., Swaab, D.F., 1994. Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. Neuroendocrinology 60, 436–444.

Raybould, H.E., 2002. Visceral perception: sensory transduction in visceral afferents and nutrients. Gut 51 (Suppl. 1), i11–i14.

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., 2001. Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 24, 518–526.

Sagar, S.M., Sharp, F.R., Curran, T., 1988. Expression of c-*fos* protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. Science 240, 1328–1331.

Sampson, H.A., 1999. Food allergy: part 1. Immunopathogenesis and clinical disorders. J. Allergy Clin. Immunol. 103, 717–728.

Sampson, H.A., 2000. Food anaphylaxis. Br. Med. Bull. 56, 925–935.

Sampson, H.A., Burks, A.W., 1996. Mechanisms of food allergy. Annu. Rev. Nutr. 16, 161–177.

Sengoku, T., Sato, S., Sakuma, S., Ogawa, T., Ohkubo, Y., Goto, T., 2001. Characterization of *Ascaris*-induced biphasic skin allergic reaction model in mice: possible roles of mast cells in early-phase and CD4-positive T cells in late-phase reactions. Pharmacology 63, 82–89.

Stead, R.H., Tomioka, M., Quinonez, G., Simon, G.T., Felten, S.Y., Bienenstock, J., 1987. Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84, 2975–2979.

Stead, R.H., Dixon, M.F., Bramwell, N.H., Riddell, R.H., Bienenstock, J., 1989. Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa. Gastroenterology 97, 575–585.

Swanson, L.W., Sawchenko, P.E., Rivier, J., Vale, W.W., 1983. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. Neuroendocrinology 36, 165–186.

Wuthrich, B., Ballmer-Weber, B.K., 2001. Food-induced anaphylaxis. Allergy 56 (Suppl. 67), 102–104.

Yamamoto, T., Sako, N., Sakai, N., Iwafune, A., 1997. Gustatory and visceral inputs to the amygdala of the rat: conditioned taste aversion and induction of c-*fos*-like immunoreactivity. Neurosci. Lett. 226, 127–130.

Yu, L.C., Perdue, M.H., 2001. Role of mast cells in intestinal mucosal function: studies in models of hypersensitivity and stress. Immunol. Rev. 179, 61–73.

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
Brain Research 1009 (2004) 181–188
BRAIN RESEARCH
www.elsevier.com/locate/brainres

Research report

Neural pathways involved in food allergy signaling in the mouse brain: role of capsaicin-sensitive afferents

Alexandre Salgado Basso[a], Frederico Azevedo Costa-Pinto[a], Luiz Roberto Giorgetti Britto[b], Luiz Carlos de Sá-Rocha[a], João Palermo-Neto[a,*]

[a] *Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Av. Orlando Marques de Paiva, 87 São Paulo, SP 05508-900, Brazil*
[b] *Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil*

Accepted 19 February 2004

Abstract

There is increasing evidence supporting the notion that brain–gut communication is crucial for the manifestation of functional gastrointestinal (GI) disorders. Employing denervation by neonatal capsaicin treatment, we investigated here the role of unmyelinated C-fibers in food allergy signaling in the brain. We found that 90 min after oral ovalbumin (OVA) challenge, allergic mice present increased c-*fos* expression in emotionality-related brain areas such as the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) and the central nucleus of the amygdala (CeA). Food allergy also induced enhanced Fos immunoreactivity in the nucleus of tractus solitarii (NTS) of OVA-immunized animals. We also show that while the degree of Fos staining in the NTS of allergic mice was only diminished by neonatal capsaicin, it was completely blocked in the PVN. However, capsaicin did not modify food allergy-induced c-*fos* expression in the CeA. In conclusion, this study provides evidence showing that unmyelinated C-fibers are part of the neural pathways involved in food allergy-induced activation of specific brain areas, particularly the PVN and to a lesser extent the NTS.
© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Theme: Sensory systems
Topic: Somatic and visceral afferents

Keywords: c-*fos*; Irritable bowel syndrome; IgE; Psychoneuroimmunology; Intestinal anaphylaxis; Corticotropin-releasing factor

1. Introduction

The gastrointestinal (GI) tract, whose lining is the largest surface (about 300 m^2) of human body facing the external environment, has been considered a sensory organ [16]. According to that view, the GI tract should monitor what happens in the lumen and handle two important tasks at the same time. The first is sampling of luminal contents, absorption of nutrients, and digestion itself. The second is perception of the nature of materials in the lumen and elaboration of subsequent responses against potentially harmful elements such as toxins, some antigens, and pathogens. It is becoming evident that accomplishment of those apparently conflicting tasks is achieved by the interplay of at least three components found in the GI tract: a wide neural network, a huge collection of immune cells, and several specialized epithelial cells [16,21,39]. For instance, the presence of nutrients (lipids, carbohydrates, and proteins) in the lumen has been shown to decrease gastric motility, acid secretion, and to modulate feeding behavior, producing a reduction in food intake [22,33,34,36]. Several studies have argued that, beyond controlling such motor and secretory responses following food intake, the interactions between nervous and immune systems within the gut are important contributors to the hyperalgesia and abnormal motor patterns seen in the intestine of patients with GI disorders such as irritable bowel syndrome (IBS) [16,21,23]. In fact, mediators (cytokines, serotonin, prostaglandin E_2) released by immune cells during intestinal inflammation have been shown to promote up-regulation and functional alterations of receptors and ion channels leading to the sensitization of afferent neurons conveying visceral sensory information to the central nervous system (CNS) [18,21]. Thus, not only peripheral sensitization

* Corresponding author. Tel.: +55-11-30917957; fax: +55-11-30917829.
E-mail address: jpalermo@usp.br (J. Palermo-Neto).

0006-8993/$ - see front matter © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.brainres.2004.02.062

of those afferent fibers, but also central sensitization of specific brain areas would be responsible for the increase in painful sensation observed in IBS patients. [10,12,17].

Additionally, there is evidence showing that corticotropin-releasing factor (CRF) within the CNS promotes changes in GI motor function similar to those observed during stress. Specifically, central injection of CRF inhibits gastric emptying and stimulates colonic motility in rats and mice [40,41]. These effects seem to be mediated by CRF receptors located, at least in part, in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) [28–30]. Moreover, it has been proposed that CRF-induced changes in GI motor function are enhanced in patients with IBS [15]. Altogether, data in the literature support the notion that a thorough understanding of the interactions among the immune system, afferent neural pathways, and specific brain areas—which are responsible for integrating sensory information and elaborating autonomic, endocrine and behavioral responses—is crucial for elucidating the pathophysiology of sensory gastrointestinal disorders.

Recently, employing an experimental model of food allergy, we have shown that ovalbumin (OVA)-immunized mice develop aversion to an OVA-containing diet and present increased anxiety levels when observed in the plus maze 1 h after oral OVA challenge [4]. Furthermore, allergic mice when challenged with oral OVA showed increased c-*fos* expression in brain areas which are related to the display of emotionality-associated behaviors, such as aversion and anxiety. Hence, we observed in these mice an intense Fos staining in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) and in the central nucleus of the amygdala (CeA) [4], which actually are the main areas containing CRF-expressing neurons in the CNS. Interestingly, development of food aversion and brain activation in allergic mice are likely to be due to IgE-dependent mast cell degranulation, since both were abrogated by anti-IgE antibody treatment [4].

Since the above model implies interactions between immune system in the gut and brain areas involved in the neuroendocrine response during stress, it seemed appropriate to understand the neural pathways mediating GI sensory disorders. Here we report that beyond activation of the CeA and the PVN, IgE-mediated food allergy induces c-*fos* expression in the nucleus of tractus solitarii (NTS). Moreover, neonatal capsaicin treatment diminished Fos immunoreactivity in the NTS and, albeit incapable of modifying c-*fos* expression in the CeA, completely blocked it in the PVN. Our results lead us to suggest that C-fibers might convey food allergy information to the brain, particularly to the PVN and the NTS.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Balb/c mice were obtained from the animal facility of the Department of Pathology, School of Veterinary Medicine—USP, São Paulo, Brazil. The animals were housed accordingly in controlled temperature (22–26 °C) and artificially lighted rooms on a 12-h light–12-h dark cycle (lights on at 7:00 am) with free access to rodent chow and water. Animals were housed and used in accordance with the guidelines of the committee on care and use of laboratory animal resources of the School of Veterinary Medicine, University of São Paulo; these guidelines are similar to those of the National Research Council, USA.

2.2. Neonatal capsaicin treatment

Two-day-old mice were subcutaneously (s.c.) given 50 mg/kg capsaicin (Sigma, St. Louis, MO). Control mice received the same volume of s.c. vehicle (10% ethanol, 10% Tween, 80% saline solution).

2.3. Visceral chemosensitivity (stretching test)

One week before immunization, every capsaicin-treated mouse was tested in order to ensure the efficacy of this treatment. The animals were submitted to the stretching test as described earlier [3]. Briefly, mice were injected with 0.6% acetic acid (0.1 ml/10 g body weight i.p.) and then placed in a transparent observation box. The number of stretches (defined as abdominal musculature contractions accompanied by writhing of the body and backward extension of the hindlimbs) per animal was counted during 20 min. Among capsaicin-treated mice, only those presenting at least a 50% decrease in the number of stretches were immunized and tested for food allergy-induced c-*fos* expression.

2.4. OVA immunization

Six- to eight-week-old male mice were immunized on days 0 and 14 with an i.p. injection of 4 μg grade V chicken egg OVA (Sigma) and 1.6 mg of aluminum hydroxide gel suspended in PBS to a total volume of 0.4 ml.

2.5. Fos immunohistochemistry

Mice were submitted to oral water delivery by gavage for 3 consecutive days preceding day 21. This allowed habituation to the experimental procedure and minimized possible handling- or gavage-induced effects on c-*fos* expression. On day 21, mice were given 0.5 ml OVA-containing solution (60% egg white solution in water) by gavage. Immunohistochemistry was performed on samples collected 90 min after oral OVA challenge. Mice were deeply anesthetized with xylazine and ketamine and immediately perfused intracardially with 25 ml of 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) followed by 100 ml of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB). Their brains were removed and post-fixed for at least 5 h in the same fixative and cryoprotected overnight in 30% sucrose in PB. Coronal, frozen 30-μm sections were cut and collected in PB. Floating sections

were incubated overnight with an antiserum directed against the Fos protein (Ab-5, Calbiochem, San Diego, CA). The Fos antibody was used at 1:1000 in a solution of 5% normal goat serum in PB with 0.3% Triton X-100. After washing, the sections were incubated for 90 min with a biotinylated goat anti-rabbit antibody (Jackson, West Grove, PA) diluted at 1:200. Following incubation with avidin–biotin complex (Vectastain Kit, Vector, Burlingame, CA), peroxidase activity was detected using diaminobenzidine as a chromogen and hydrogen peroxide. As negative controls, brain sections were incubated with normal rabbit serum or in the absence of the primary anti-Fos antibody. Both procedures completely abolished Fos staining. The sections were mounted on gelatin-coated slides, dehydrated and coverslipped. Numbers of stained nuclei were estimated using an image analysis software (Image-pro® Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Cells with dark brown or black nuclear staining above the generally low background at bright-field microscopy were identified as Fos-positive cells. Based on the previous morphological analyses of brain sections counterstained with Giemsa, we were able to differentiate neurons from glial cells [4]. The analysis of these sections led us to conclude that fos-positive nuclei belong mostly, if not only, to neurons. Since we did not aim at estimating the total number of Fos-positive nuclei in each entire region, nor at achieving a three-dimensional reconstruction of the sites expressing c-*fos*, we determined the number of Fos-immunoreactive cells in only three representative sections of each area per animal, bilaterally. In each section, the area to be analyzed was delineated according to anatomical landmarks and stereotaxic coordinates [14]. The approximate stereotaxic coordinates of sections used for the cell counts were: paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) bregma − 0.82 mm; central nucleus of the amygdala (CeA) bregma − 1.22 mm; nucleus of tractus solitarii (NTS) bregma − 7.08 mm. The average number of stained cells on both sides was used to represent the number of Fos-positive cells on that section, and animals from each experimental group were compared using the mean number on all sections counted in that region.

2.6. Statistical analysis

Differences among experimental groups in the number of Fos-immunoreactive cells were evaluated with ANOVA followed by post hoc Tukey–Kramer test. Data are expressed as mean ± standard deviation (s.d.). In all analyses, $P < 0.05$ indicated statistical significance.

3. Results

3.1. Food allergy induces intense Fos staining in the NTS

Confirming previous findings, we show here that allergic mice present increased c-*fos* expression in emotionality-

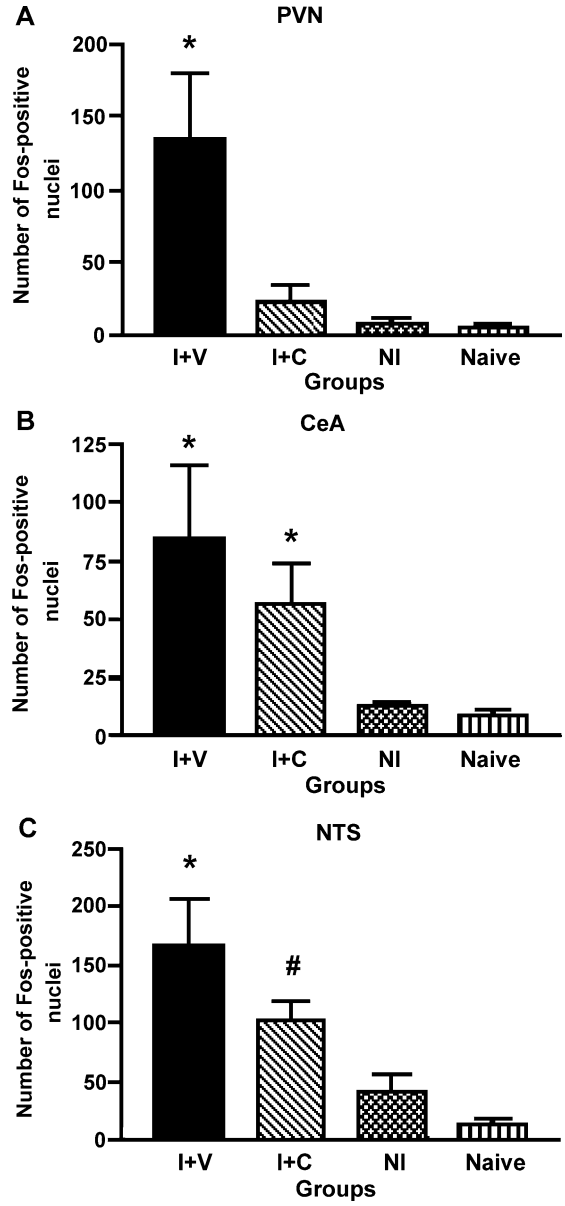

Fig. 1. (A) Neonatal capsaicin completely abolished food allergy-induced c-*fos* expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). While immunized mice treated with vehicle (I + V) presented increased number of Fos-positive nuclei after oral OVA challenge, those pretreated with capsaicin (I + C) showed little Fos staining, similar to non-immunized receiving OVA (NI + O) and naive mice. $n = 4$ in each group. *Significant increase compared to all other groups by ANOVA followed by post hoc Tukey–Kramer test (mean ± S.D.; $F_{3,12} = 28.1$, $P < 0.01$). (B) Neonatal capsaicin did not modify c-*fos* expression in the central nucleus of the amygdala (CeA). The number of Fos-positive nuclei did not differ between I + V and I + C. $n = 4$ in each group. *Significant increase compared to NI and naive groups by ANOVA followed by post hoc Tukey–Kramer test (mean ± S.D.; $F_{3,12} = 15.37$, $P < 0.05$). (C) Neonatal capsaicin diminished but did not totally block food allergy-induced c-*fos* expression in the nucleus of tractus solitarii (NTS). The degree of Fos staining observed in I + C animals is lesser than that of I + V group, but still increased if compared to that of NI and naive mice. $n = 4$ in each group. *Significant increase compared to all other groups. #Significant increase compared to NI and naive groups. ANOVA followed by post hoc Tukey–Kramer test (mean ± S.D.; $F_{3,12} = 33.9$, $P < 0.05$). c-*fos* expression was evaluated 90 min after oral challenge.

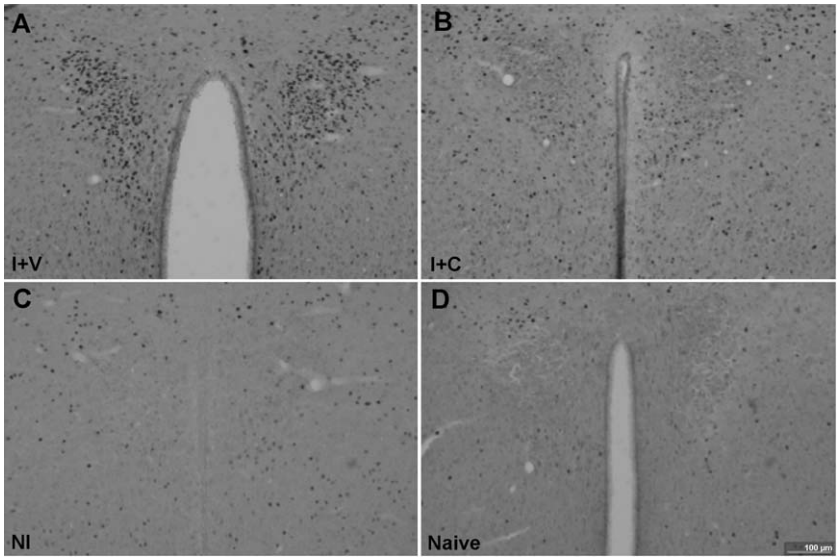

Fig. 2. Effects of neonatal capsaicin on food allergy-induced c-*fos* expression in the PVN. Representative brain coronal sections showing intense Fos staining in neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) after oral OVA challenge in immunized mice treated with vehicle (A). In contrast, Fos-positive nuclei were almost absent in immunized mice pretreated with capsaicin (B), in non-immunized animals (C), and in naive mice (D).

related brain areas. Therefore, while we observed intense Fos staining in the PVN and in the CeA of OVA-immunized mice challenged with oral OVA-solution, Fos-positive nuclei were almost absent in the PVN and in the CeA of non-immunized mice drinking OVA-solution (NI) and naive (no handling) animals (Fig. 1A and B). We also demonstrated that beyond activation of the PVN and the CeA, food allergy induces c-*fos* expression in the NTS. There was a huge increase in the number of Fos stained nuclei in the NTS of OVA-immunized mice 90 min after oral OVA challenge when compared to that seen in animals belonging to the NI and naive groups (Fig. 1C). Importantly, forced ingestion as a cause of NTS activation in allergic mice cannot be supported as a plausible hypothesis since Fos staining in non-immunized animals receiving OVA-solution (NI) was similar to that found in naive animals (Fig. 1C).

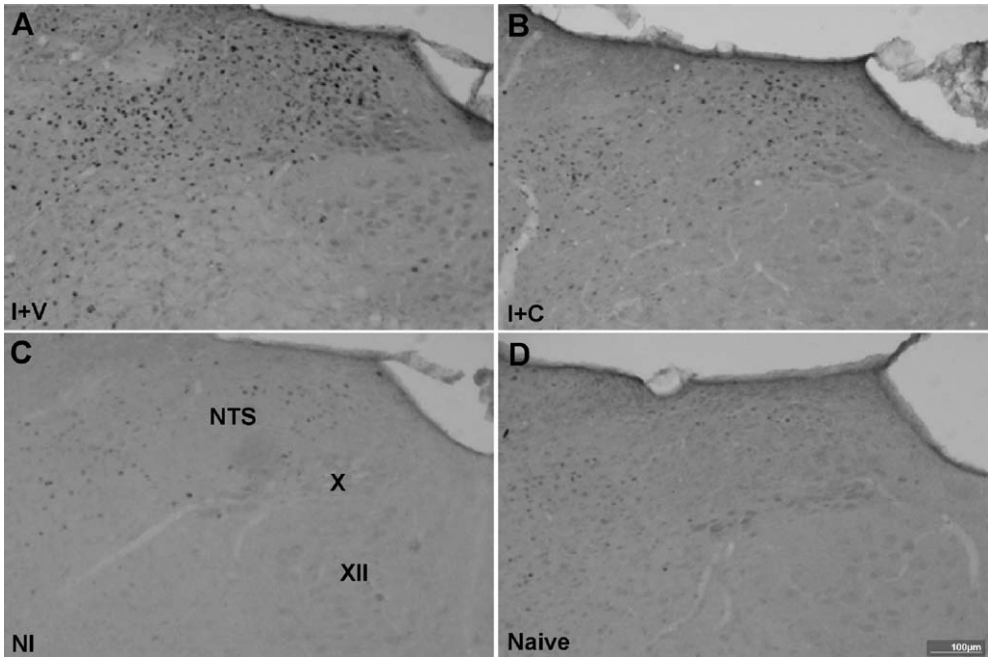

Fig. 3. Effects of neonatal capsaicin on food allergy-induced c-*fos* expression in the NTS. Representative brain coronal sections showing that neonatal capsaicin, albeit diminishing it, did not block food allergy-induced Fos staining in the nucleus of tractus solitarii (NTS) of allergic mice. (A) Immunized mice treated with vehicle, (B) immunized animals treated with capsaicin, (C) non-immunized animals and (D) naive mice. X, Dorsal motor nucleus of the vagus nerve; XII, Hypoglossal nucleus.

3.2. Effects of neonatal capsaicin on food allergy-induced c-fos expression in the brain

In order to analyze a possible route conveying food allergy-evoked sensory information to the brain, we employed neonatal capsaicin treatment aiming at destruction of primary afferent C-fibers, which are known to be involved in brain–gut communication. We found that neonatal capsaicin totally precluded PVN activation in allergic mice. While we observed intense Fos staining in the PVN of vehicle-treated, OVA-immunized mice (I + V) 90 min after oral challenge with the antigen, Fos-positive nuclei were barely seen in the PVN of capsaicin-treated, OVA-immunized animals (I + C) (Figs. 1A and 2). Neonatal capsaicin also diminished, but did not completely block, food allergy-induced c-*fos* expression in the NTS. Thus, although we observed fewer Fos-positive nuclei in the NTS of capsaicin-treated, OVA-immunized animals (I + C) when compared to vehicle-treated mice (I + V), Fos immunoreactivity in the I + C group was still higher than that found in non-immunized or naive animals (Figs. 1C and 3). It is noteworthy that neonatal capsaicin did not modify the number of Fos-labeled cells in the CeA following the antigen challenge in allergic animals. Indeed, we have not observed a difference in Fos immunoreactivity in this area when comparing I + C and I + V groups (Figs. 1B and 4).

4. Discussion

Employing an experimental model of food allergy focused on interactions between the immune and the nervous systems, we have previously shown that OVA-immunized mice orally challenged with an antigen-containing solution presented increased Fos immunoreactivity in brain areas (such as the PVN and the CeA) related to neuroendocrine responses during stress [4]. This pattern of brain activation seems compatible with behavioral changes observed in allergic mice, which include food aversion and increased anxiety levels 60 min after oral OVA challenge [4]. Considering that this model can provide new insights regarding the pathophysiology of sensory GI disorders, in this study, we describe some of the neural pathways involved in food allergy signaling in the mouse brain.

Here we show that food allergy also induces Fos expression in the NTS. This is not surprising, as this nucleus receives visceral sensory inputs from both spinal and vagal afferents [2,27]. Cell bodies of vagal and spinal primary afferents conveying visceral sensory information are located within the nodose and the dorsal root ganglia, respectively. Central projections from the nodose ganglion directly reach the NTS, whereas the fibers from the dorsal root ganglion enter the dorsal horn of the spinal cord and make synaptic connections with second order neurons which, in turn, project to the NTS (spinosolitary tract) [18]. This makes

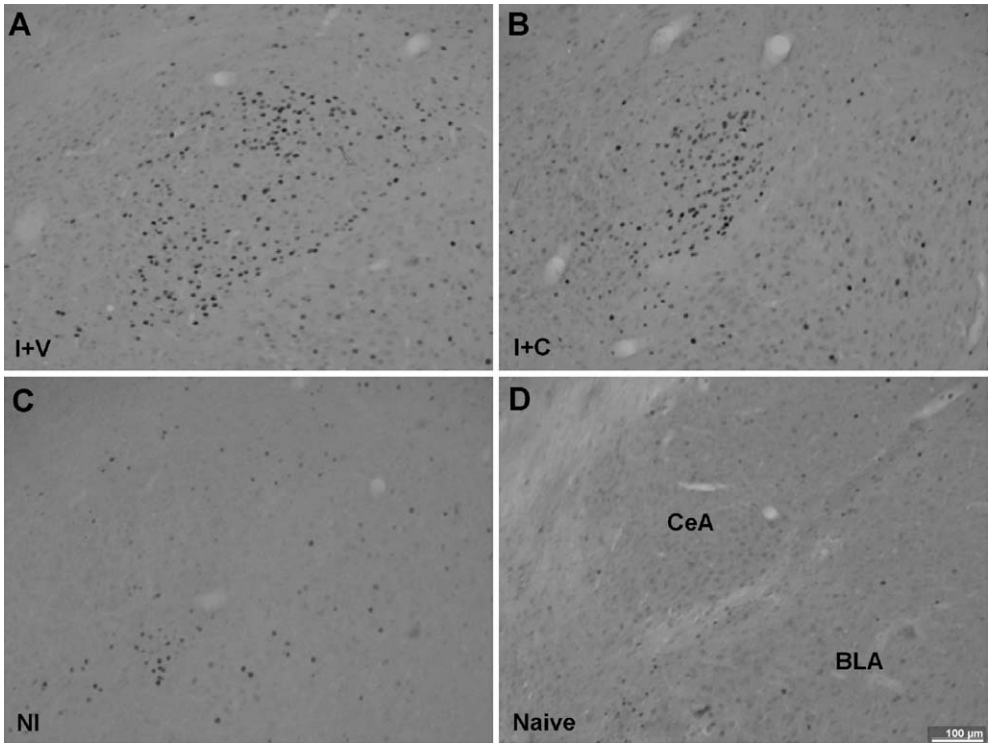

Fig. 4. Effects of neonatal capsaicin on food allergy-induced c-*fos* expression in the CeA. Representative brain coronal sections showing intense Fos staining in neurons of the central nucleus of the amygdala (CeA) after oral OVA challenge in immunized mice treated with vehicle (A) and in those treated with capsaicin (B). In contrast, Fos-positive nuclei were barely seen in non-immunized animals (C), and in naive mice (D). BLA, Basolateral nucleus; CeA, Central nucleus.

the NTS an important relay station integrating sensory information and underlying viscero-visceral reflexes. In particular, concomitant activation of the NTS and motor alterations in the GI tract have been described after antigen challenge of an isolated intestinal segment in OVA-sensitized rats [37,38]. Some of these studies raised the possibility of a role for the CNS in intestinal motor response while demonstrating that extrinsic neural pathways are required for full manifestation of anaphylaxis-induced alterations in GI motility and NTS activation [37]. Other non-noxious and noxious stimuli applied to the GI tract, such as presence of nutrients in the intestinal lumen, high threshold colon distension, and gastric acid solution have also been shown to evoke c-*fos* expression in the NTS [31,35,43].

Confirming previous findings, we also show that allergic mice present increased Fos immunoreactivity in the PVN and in the CeA following oral challenge with the antigen. Anatomical data showing that the efferent ascending targets of the NTS include the PVN and the CeA [9,32] corroborates our experimental findings and supports the notion that beyond inducing alterations in GI motor patterns, intestinal inflammation elicits activation of brain areas associated to neuroendocrine responses during stress. This is of particular interest since some studies have linked functional GI disorders to the emotional limbic system as well as to some psychiatric symptoms such as anxiety and depression [25,26]. Indeed, it has been shown that patients with IBS present higher prevalence of anxiety and depression than healthy controls [1]. Moreover, these patients show enhanced modulation of visceral perception by stress and augmented intestinal motor responses to exogenous CRH [13,15]. This is in agreement with our experimental findings that activation of the PVN and the CeA in allergic mice challenged by oral OVA seems to be correlated with the expression of emotional behaviors such as food aversion and anxiety [4].

Once we observed a specific pattern of brain activation following food allergy, our further step was to investigate possible pathways conveying this sensory information. Although several studies have investigated the routes involved in NTS activation following intestinal anaphylaxis, this issue is still controversial. Some authors have suggested that vagal afferent pathways are essential for brain stem activation and intestinal motor response following IgE-mediated mast cell degranulation. In fact, Castex et al. [8] reported that perivagal capsaicin treatment eliminated both Fos expression in the NTS and the alteration in fasting motility observed in OVA-sensitized rats challenged with the antigen. However, these findings have not been confirmed by others. In fact, it has been shown that subdiaphragmatic vagotomy not only failed to block anaphylaxis-induced disturbances in intestinal motility but also did not modify the degree of Fos immunoreactivity in the NTS [37]. The latter investigators argued that intestinal allergic response signaling to the brain stem occurs through spinal pathways. They have demonstrated that splanchnectomy abolished changes in jejunal motor responses and diminished the number of Fos-positive nuclei in the NTS of sensitized animals challenged with the antigen [38].

Our experimental approach does not allow any further analysis regarding the participation of spinal or vagal afferent fibers in the pattern of brain activation described in this study. Here, employing neonatal capsaicin treatment, we evaluated the role of unmyelinated primary afferent C-fibers on food allergy signaling to the mouse brain. Capsaicin is a widely used neurotoxin known to promote a deficit in sensory modalities subserved by these fibers [20]. We showed here that while neonatal capsaicin only diminished the number of Fos-positive nuclei in the NTS, it completely blocked c-*fos* expression in the PVN of OVA-sensitized mice challenged orally with the antigen. Thus, although there are extensive projections from the NTS to the PVN [32], it is unlikely that this pathway accounts for complete food allergy-induced PVN activation. Some studies have described that a large number of neurons in the spinal cord of rats project directly to the hypothalamus [6,11]. Since it has been shown that this spinohypothalamic tract conveys visceral sensory information [24,42], this could be an alternative route for food allergy signaling to the PVN. Whether the fibers composing the spinohypothalamic tract are more susceptible to the neonatal capsaicin treatment remains to be elucidated.

We also found that capsaicin treatment did not modify the degree of Fos immunoreactivity in the CeA. This could indicate that food allergy signaling to the PVN and to the CeA occurs through different pathways. Since the amygdala also receives afferent inputs from the NTS [32], this route could be involved in at least part of food allergy-induced c-*fos* expression in the CeA, even considering the lower activation seen in the NTS of capsaicin-treated animals. Despite the fact that neonatal capsaicin has been shown to destroy only 30% of the number of vagal neurons in the nodose ganglia [7] and 41–75% of unmyelinated fibers in spinal cord roots [19], the present results lead us to suggest that additional mechanisms, apart from the capsaicin-sensitive C-fibers, are involved in food allergy signaling to specific brain areas. This suggestion is in accordance with our previous data showing that, albeit diminishing the magnitude of food aversion in allergic mice, capsaicin treatment was not able to block its development [3]. Other studies have demonstrated that transmission of certain visceral sensory information is only partially dependent on capsaicin-sensitive C-fibers. Thus, colon distension-induced c-*fos* expression in the NTS was not completely abolished after neonatal capsaicin treatment in rats [31]. Similarly, while systemic capsaicin reduced the number of Fos-positive cells by 50% in the PVN 1 h after abdominal surgery, it did not modify Fos staining in the NTS and in the CeA [5].

In conclusion, this study provides experimental evidence showing that unmyelinated C-fibers are part of the neural pathways involved in food allergy-induced activation of specific brain areas, specially the PVN and to a lesser extent

the NTS. Additionally, these results from an experimental model focused on interactions between the immune and the nervous system emphasize the importance of knowledge of gut–brain communication for better understanding the pathophysiology of functional GI disorders.

Acknowledgements

We thank Adilson Alves for the technical assistance and Rosana Pagano for her expertise on the stretching test. This work was supported by Fapesp Grants 00/07126-0; 99/0428-7 and 01/13510-0.

References

[1] G. Addolorato, L. Marsigli, E. Capristo, F. Caputo, C. Dall'Aglio, P. Baudanza, Anxiety and depression: a common feature of health care seeking patients with irritable bowel syndrome and food allergy, Hepatogastroenterology 45 (1998) 1559–1564.

[2] S.M. Altschuler, X.M. Bao, D. Bieger, D.A. Hopkins, R.R. Miselis, Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the rat: sensory ganglia and nuclei of the solitary and spinal trigeminal tracts, J. Comp. Neurol. 283 (1989) 248–268.

[3] A.S. Basso, L.C. de Sa-Rocha, J. Palermo-Neto, Immune-induced flavor aversion in mice: modification by neonatal capsaicin treatment, Neuroimmunomodulation 9 (2001) 88–94.

[4] A.S. Basso, F.A. Pinto, M. Russo, L.R. Britto, L.C. de Sa-Rocha, J. Palermo Neto, Neural correlates of IgE-mediated food allergy, J. Neuroimmunol. 140 (2003) 69–77.

[5] B. Bonaz, Y. Tache, Corticotropin-releasing factor and systemic capsaicin-sensitive afferents are involved in abdominal surgery-induced Fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus, Brain Res. 748 (1997) 12–20.

[6] R. Burstein, K.D. Cliffer, G.J. Giesler Jr., Cells of origin of the spinohypothalamic tract in the rat, J. Comp. Neurol. 291 (1990) 329–344.

[7] C. Carobi, A quantitative investigation of the effects of neonatal capsaicin treatment on vagal afferent neurons in the rat, Cell Tissue Res. 283 (1996) 305–311.

[8] N. Castex, J. Fioramonti, M.J. Fargeas, L. Bueno, c-*fos* expression in specific rat brain nuclei after intestinal anaphylaxis: involvement of 5-HT3 receptors and vagal afferent fibers, Brain Res. 688 (1995) 149–160.

[9] D.F. Cechetto, Central representation of visceral function, Fed. Proc. 46 (1987) 17–23.

[10] F. Cervero, Visceral pain-central sensitisation, Gut. 47 Suppl. 4 (2000) iv56–iv57 (discussion iv58).

[11] K.D. Cliffer, R. Burstein, G.J. Giesler Jr., Distributions of spinothalamic, spinohypothalamic, and spinotelencephalic fibers revealed by anterograde transport of PHA-L in rats, J. Neurosci. 11 (1991) 852–868.

[12] S.V. Coutinho, X. Su, J.N. Sengupta, G.F. Gebhart, Role of sensitized pelvic nerve afferents from the inflamed rat colon in the maintenance of visceral hyperalgesia, Prog. Brain Res. 129 (2000) 375–387.

[13] B. Dickhaus, E.A. Mayer, N. Firooz, J. Stains, F. Conde, T.I. Olivas, R. Fass, L. Chang, M. Mayer, B.D. Naliboff, Irritable bowel syndrome patients show enhanced modulation of visceral perception by auditory stress, Am. J. Gastroenterol. 98 (2003) 135–143.

[14] K. Franklin, G. Paxinos, The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, first edn., Academic Press, San Diego, CA, 1996, 208 pp.

[15] S. Fukudo, T. Nomura, M. Hongo, Impact of corticotropin-releasing hormone on gastrointestinal motility and adrenocorticotropic hormone in normal controls and patients with irritable bowel syndrome, Gut 42 (1998) 845–849.

[16] J.B. Furness, W.A. Kunze, N. Clerc, Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut: II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses, Am. J. Physiol. 277 (1999) G922–G928.

[17] G.F. Gebhart, Visceral pain-peripheral sensitisation, Gut. 47 (Suppl. 4) (2000) iv54–iv55 (discussion iv58).

[18] D. Grundy, Neuroanatomy of visceral nociception: vagal and splanchnic afferent, Gut. 51 (Suppl. 1) (2002) i2–i5.

[19] A. Hiura, Y. Sakamoto, Quantitative estimation of the effects of capsaicin on the mouse primary sensory neurons, Neurosci. Lett. 76 (1987) 101–106.

[20] P. Holzer, Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons, Pharmacol. Rev. 43 (1991) 143–201.

[21] P. Holzer, Sensory neurone responses to mucosal noxae in the upper gut: relevance to mucosal integrity and gastrointestinal pain, Neurogastroenterol. Motil. 14 (2002) 459–475.

[22] H.H. Holzer, C.M. Turkelson, T.E. Solomon, H.E. Raybould, Intestinal lipid inhibits gastric emptying via CCK and a vagal capsaicin-sensitive afferent pathway in rats, Am. J. Physiol. 267 (1994) G625–G629.

[23] P. Holzer, T. Michl, M. Danzer, M. Jocic, R. Schicho, I.T. Lippe, Surveillance of the gastrointestinal mucosa by sensory neurons, J. Physiol. Pharmacol. 52 (2001) 505–521.

[24] J.T. Katter, R.J. Dado, E. Kostarczyk, G.J. Giesler Jr., Spinothalamic and spinohypothalamic tract neurons in the sacral spinal cord of rats: II. Responses to cutaneous and visceral stimuli, J. Neurophysiol. 75 (1996) 2606–2628.

[25] R.B. Lydiard, Irritable bowel syndrome, anxiety, and depression: what are the links? J. Clin. Psychiatry 62 (Suppl. 8) (2001) 38–45 (discussion 46–7).

[26] E.A. Mayer, M. Craske, B.D. Naliboff, Depression, anxiety, and the gastrointestinal system, J. Clin. Psychiatry 62 (Suppl. 8) (2001) 28–36 (discussion 37).

[27] D. Menetrey, A.I. Basbaum, Spinal and trigeminal projections to the nucleus of the solitary tract: a possible substrate for somatovisceral and viscerovisceral reflex activation, J. Comp. Neurol. 255 (1987) 439–450.

[28] H. Monnikes, B.G. Schmidt, H.E. Raybould, Y. Tache, CRF in the paraventricular nucleus mediates gastric and colonic motor response to restraint stress, Am. J. Physiol. 262 (1992) G137–G143.

[29] H. Monnikes, H.E. Raybould, B. Schmidt, Y. Tache, CRF in the paraventricular nucleus of the hypothalamus stimulates colonic motor activity in fasted rats, Peptides 14 (1993) 743–747.

[30] H. Monnikes, B.G. Schmidt, Y. Tache, Psychological stress-induced accelerated colonic transit in rats involves hypothalamic corticotropin-releasing factor, Gastroenterology 104 (1993) 716–723.

[31] H. Monnikes, J. Ruter, M. Konig, C. Grote, P. Kobelt, B.F. Klapp, R. Arnold, B. Wiedenmann, J.J. Tebbe, Differential induction of c-*fos* expression in brain nuclei by noxious and non-noxious colonic distension: role of afferent C-fibers and 5-HT3 receptors, Brain Res. 966 (2003) 253–264.

[32] T. Petrov, T.L. Krukoff, J.H. Jhamandas, Branching projections of catecholaminergic brainstem neurons to the paraventricular hypothalamic nucleus and the central nucleus of the amygdala in the rat, Brain Res. 609 (1993) 81–92.

[33] H.E. Raybould, Does your gut taste? Sensory transduction in the gastrointestinal tract, News Physiol. Sci. 13 (1998) 275–280.

[34] H.E. Raybould, Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut: I. Sensing of lipid by the intestinal mucosa, Am. J. Physiol. 277 (1999) G751–G755.

[35] R. Schuligoi, M. Jocic, A. Heinemann, E. Schoninkle, M.A. Pabst, P. Holzer, Gastric acid-evoked c-*fos* messenger RNA expression in rat brainstem is signaled by capsaicin-resistant vagal afferents, Gastroenterology 115 (1998) 649–660.

[36] G.J. Schwartz, The role of gastrointestinal vagal afferents in the

control of food intake: current prospects, Nutrition 16 (2000) 866–873.

[37] R.B. Scott, D.T. Tan, M. Miampamba, K.A. Sharkey, Anaphylaxis-induced alterations in intestinal motility: role of extrinsic neural pathways, Am. J. Physiol. 275 (1998) G812–G821.

[38] R.B. Scott, D.T. Tan, K.A. Sharkey, Effect of splanchnectomy on jejunal motility and fos expression in brain stem after intestinal anaphylaxis in rat, Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol. 279 (2000) G990–G997.

[39] K.A. Sharkey, G.M. Mawe, Neuroimmune and epithelial interactions in intestinal inflammation, Curr. Opin. Pharmacol. 2 (2002) 669–677.

[40] Y. Tache, H. Monnikes, B. Bonaz, J. Rivier, Role of CRF in stress-related alterations of gastric and colonic motor function, Ann. N.Y. Acad. Sci. 697 (1993) 233–243.

[41] Y. Tache, V. Martinez, M. Million, J. Rivier, Corticotropin-releasing factor and the brain–gut motor response to stress, Can. J. Gastroenterol. 13 (Suppl. A) (1999) 18A–25A.

[42] X. Zhang, A.P. Gokin, G.J. Giesler Jr., Responses of spinohypothalamic tract neurons in the thoracic spinal cord of rats to somatic stimuli and to graded distention of the bile duct, Somatosens. Motor Res. 19 (2002) 5–17.

[43] T.T. Zittel, R. De Giorgio, C. Sternini, H.E. Raybould, Fos protein expression in the nucleus of the solitary tract in response to intestinal nutrients in awake rats, Brain Res. 663 (1994) 266–270.