

2536  
Carlos de Paula Portela

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA  
PULMONAR DE RATOS SUBMETIDOS A  
ESTRESSE.**

*Tese apresentada ao Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paulo,  
para obtenção do título de Doutor em  
Farmacologia.*

**São Paulo**

**2004**

**Carlos de Paula Portela**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA  
PULMONAR EM RATOS SUBMETIDOS A  
ESTRESSE**

*Tese apresentada ao Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paulo,  
para obtenção do grau de Doutor em  
Farmacologia.*

**Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. João Palermo Neto**



**São Paulo**

**2004**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

T-ICB  
BMF Portela, Carlos de Paula.  
QV4 Avaliação da resposta inflamatória pulmonar de ratos submetidos a  
P843a estresse / Carlos de Paula Portela. -- São Paulo, 2004.  
2004 Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da  
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmacologia.  
Área de concentração: Farmacologia.  
Linha de pesquisa: Neuroimunomodulação.  
Orientador: Palermo-Neto, João.  
Versão do título para o inglês: Evaluation of lung inflammatory  
response in submitted-stress rats.

Descritores: 1. Asma 2. Neuroimunomodulação 3. Alergia  
4. Ansiedade e estresse 5. Vocalização ultrassônica 6. Capsaicina

*ICB/SBIB116/2004*

### **Autorização para Reprodução**

Para fins acadêmicos e científicos (  ) **está autorizada**, a partir de \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ a reprodução (  ) total ou (  ) parcial por processos fotocopiadores e a partir de \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ a disponibilização (  ) total ou (  ) parcial em meios eletrônicos

Se parcial, discriminar paginação, ilustração etc

---

---

---

(  ) **não está autorizada**

Assinatura do Autor: \_\_\_\_\_


Ciência do Orientador: \_\_\_\_\_




AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA  
PULMONAR EM RATOS SUBMETIDOS A  
ESTRESSE.

Carlos de Paula Portela

BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
(Nome e Assinatura)

Isclanda de Fatima Lopez Calvo Tibério

  
\_\_\_\_\_  
(Nome e Assinatura)


(Nome e Assinatura)

Sidercio Luiz Sinhorini




(Nome e Assinatura)

Susan Ades

  
\_\_\_\_\_  
(Nome e Assinatura)

(Nome e Assinatura)

Luciano Freitas Felício

  
\_\_\_\_\_  
(Nome e Assinatura)

(Nome e Assinatura)

João Salomão Neto

Tese defendida e aprovada em: 08 de dezembro de 2004




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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da resposta inflamatória pulmonar de ratos submetidos a um modelo de estresse", Protocolo nº 140/2002, 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 sendo aprovado "ad referendun".

(We certify that the Research "Effects of stress on long inflammatory response in rats" protocol number 140/2002, under the responsibility of Prof.Dr. João Palermo Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commision of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendun" meeting.)

São Paulo, 02 de julho de 2002

  
Prof.ª Dr.ª Júlia Maria Matera  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP

## **DEDICATÓRIAS**

***A meus pais,  
Eurípedes Alves Portela (in memoriam) e  
Cecília de Paula Souza Portela, pela minha  
formação e pela expectativa em mim depositada e  
que espero agora estar correspondendo.***

***A minha irmã Suzana, por tantos anos de  
convívio e solidariedade.***

***A meus filhos Marcos, Helena e Guilherme, por  
compreenderem meu empenho neste trabalho e  
minhas ausências. Que Deus me dê forças para  
continuar nesta batalha, pois as conquistas serão  
sempre deles.***

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

***A Deus,***

***Porque sei que continuará me guiando e  
não me abandonará nas dificuldades deste  
caminho incerto  
que é a vida...***

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

***Ao Dr. João Palermo Neto,***

***Pelo acolhimento, amizade e pelo carinho com que me transmite tantos valores e ensinamentos, os quais serão sempre ponto de referência para mim.***

***Ao Dr. Milton Arruda Martins e a Dra. Iolanda de Fátima Lopes Calvário Tibério,***

***Pela grande colaboração prestada no decorrer deste trabalho.***

## AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

- Ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP), onde foi desenvolvido este curso de Pós-Graduação de nível doutorado.
- À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), unidade da Universidade de São Paulo (USP) onde foram realizadas as etapas da elaboração deste trabalho.
- Às Disciplinas de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do Departamento de Patologia, em cujos laboratórios e demais dependências foi desenvolvida esta pesquisa.
- À Disciplina de Clínica Geral da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), onde também foram realizadas as etapas da elaboração deste trabalho.
- À Vice-Reitoria Acadêmica da Universidade de São Paulo, por ter proporcionado o apoio financeiro em congressos.
- Às Bibliotecárias do IP, FMVZ, FMUSP, HU e ICB, em especial a Maria José, por toda a colaboração nas buscas, pesquisas, empréstimos, normatização e demais serviços.
- Aos funcionários dos diversos setores da FMVZ/USP: em especial, Claudia Mori, Enio, Suly, Nelsinho, Dona Romeika, Carlos, entre outros pelo apoio e disposição.
- À Sellex Inc, e a Coulbourns Instruments - EUA, pela grande ajuda na instalação e configuração dos instrumentos de condicionamento e pelo apoio em diversas etapas deste trabalho.
- Meus agradecimentos ao apoio financeiro das agências CAPES e FAPESP - Proc. no 1999/04228-7.

## AGRADECIMENTOS PESSOAIS

- Aos Professores e Pesquisadores da Disciplina de Clínica Geral da FMUSP, em especial o Dr. Paulo Saldiva, Dra. Edna Maldonado, David Kasahara, Adriana, Carla Prado, Beatriz, Fernanda, Flávia, pela ajuda nas técnicas empregadas.
- Aos Professores do Departamento de Patologia, em especial à Dra. Maria Martha Bernardi, Dr. Jorge Flório, Dr. Idécio Senhorini, Dr. Luciano Felício, Dr. José Merusse, pelas grandes contribuições oferecidas no decorrer deste trabalho.
- Aos Professores do ICB em especial Dr. Wothan, Dra. Paulínia, Dra. Sonia Jancar pelo incentivo ao meu trabalho.
- Aos Professores do Instituto de Psicologia, especial à Dra. Teresa, Tatu e Dr. César Ades, pelo carinho e confiança depositados em mim desde meu ingresso na Pós-Graduação.
- Aos Professores e Pesquisadores convidados ao Brasil pelo grupo de neuroimunomodulação e pela FMVZ, Dr Hugo Oscar Besedovsky, Dra. Adriana Del Rey, Dr. Adrian Dunn e Dr. Craig Ckinsley pelas importantes reflexões.
- Às secretárias do Departamento de Farmacologia do ICB, Selma e Julieta, pela atenção e ajuda nos momentos em que mais precisei.
- À minha colega e doutoranda Christina Massoco, pelo grande carinho e dedicação ao me guiar e ajudar, desde os meus primeiros passos neste trabalho e a todos os colegas Pós-Graduandos do grupo de Neuroimunomodulação: Ricardo Lazzarini, Fábio Ribeiro, Sílvia Morgulis, Evelise Fonseca, Alexandre Basso, Marcos, Daniel e demais colegas da FMVZ e ICB: Luciana, Marcela, Diogo, Letícia, Renata, Paulo Mayorca, Fred, Fabio Karanievski.
- Aos meus amigos Carlos, Gisleine, Fábio, Angela, Juninho e Ivan.
- À Carolina, Fernando e Paulinho, meus ex-cunhados, por estarem sempre por perto e presentes nestes anos.
- À Aline Viana Paz e Maria Paula Borges Cruz e seus pais pela compreensão e pelo apoio que têm dado à meus filhos.
- Ao Dr. José Maria Paz e Dra. Maria Isabel de Carvalho Viana, pela amizade e apoio irrestritos.
- À minha querida, a Liliane Leopoldina D'Oliveira.

## SUMÁRIO

LISTA DAS FIGURAS

SIGLAS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

LISTA DE SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

RESUMEN

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	28
3 OBJETIVOS.....	52
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
4.1 Sujeitos.....	55
4.2 Drogas e reagentes.....	56
4.3 Aparelhamento.....	57
4.4 Metodologias.....	65
4.5 Delineamento experimental.....	74
4.6 Análise estatística.....	79
5 RESULTADOS.....	80
5.1 Experimento 1. Estudo dos efeitos do estresse social sobre a Vocalização Ultrassônica de ratos sensibilizados com OVA.....	81
5.2 Experimento 2. Estudo da resposta inflamatória alérgica pulmonar de ratos submetidos a um modelo de estresse social prolongado (14 dias).....	83
5.3 Experimento 3. Estudo da resposta inflamatória alérgica pulmonar de ratos tratados neonatalmente com capsaicina e submetidos a um modelo de estresse prolongado por choques (14 dias).....	94
6 DISCUSSÃO.....	105
7 CONCLUSÕES.....	144
REFERÊNCIAS.....	146
ANEXO.....	161



## LISTA DAS FIGURAS

- Figura 1.** Equipamentos controladores das caixas de esquiva ativa. Abaixo, em detalhe, rato em procedimento experimental em uma caixa de esquiva. ....58
- Figura 2.** Módulos das gaiolas grandes enriquecidas, conectadas, para o uso no estresse social. À direita, vista frontal de um dos oito módulos das gaiolas grande. ....60
- Figura 3.** Equipamento detector de vocalizações ultrassônicas, utilizado nos módulos das gaiolas grandes enriquecidas conectadas e nas caixas de esquiva ativa .....62
- Figura 4.** Registro e visualização, na tela do computador, de vocalizações ultrassônicas ocorridas durante estresse. ....62
- Figura 5.** Sistema de coleta, análise e determinação dos índices de função pulmonar (elastância e resistência do sistema respiratório). Notar o balão de coleta do ar exalado dos ratos, contendo NO.....64
- Figura 6.** Aparelho de análise do ar exalado contendo NO, coletado durante o procedimento de avaliação da mecânica pulmonar....64
- Figura 7.** Efeitos do estresse social agudo (2 horas), do estresse prolongado<sup>1</sup> (48 horas) e do estresse prolongado<sup>2</sup> (14 dias) sobre a porcentagem de detecção das vocalizações ultrassônicas de ratos sensibilizados com OVA, detectadas durante o estresse social na gaiola grande enriquecida.....82
- Figura 8.** Efeitos de um modelo de estresse social sobre os valores basais da elastância basal do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA. ....85
- Figura 9.** Efeitos de um modelo de estresse social sobre os valores máximos da elastância do sistema respiratório de ratos sensibilizados e desafiados com OVA.....86

<b>Figura 10.</b>	Efeitos de um modelo de estresse social sobre os percentuais de aumento da elastância do sistema respiratório sensibilizados e desafiados com OVA.....	87
<b>Figura 11.</b>	Efeitos de um modelo de estresse sobre os índices de resistência basal do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA .....	88
<b>Figura 12.</b>	Efeitos de um modelo de estresse social sobre os valores de resposta máxima na resistência do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA .....	89
<b>Figura 13.</b>	Efeitos de um modelo de estresse social sobre os percentuais de aumento nos índices de resistência do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA .....	90
<b>Figura 14.</b>	Efeitos de um modelo de estresse social sobre os valores basais de NO do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA.....	91
<b>Figura 15.</b>	Efeitos de um modelo de estresse social sobre os valores máximos de NO do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA .....	92
<b>Figura 16.</b>	Efeitos de um modelo de estresse sobre o percentual de aumento do NO do sistema respiratório de ratos sensibilizados e desafiados com OVA .....	93
<b>Figura 17.</b>	Efeitos de um modelo de estresse em esquiva ativa sobre os valores basais da elastância do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina .....	96
<b>Figura 18.</b>	Efeitos de um modelo de estresse em esquiva ativa sobre valores máximos da elastância do sistema respiratório de ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina .....	97

<b>Figura 19.</b>	Efeitos de um modelo de estresse em esquiva ativa sobre os percentuais de aumento da elastância do sistema respiratório de ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina .....	98
<b>Figura 20.</b>	Efeitos de um modelo de estresse em esquiva ativa sobre os índices de resistência basal do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina.....	99
<b>Figura 21.</b>	Efeitos de um modelo de estresse em esquiva ativa sobre os valores máximos de resistência do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina.....	100
<b>Figura 22.</b>	Efeitos de um modelo de estresse em esquiva ativa sobre os percentuais de aumento na resistência do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina.....	101
<b>Figura 23.</b>	Efeitos de um modelo de estresse em esquiva ativa sobre os valores basais de NO do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina.....	102
<b>Figura 24.</b>	Efeitos de um modelo de estresse sobre os valores máximos de NO do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina. ....	103
<b>Figura 25.</b>	Efeitos de um modelo de estresse em esquiva ativa sobre os percentuais de aumento de NO do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina.....	104

## SIGLAS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

- C -** Controle (*naive*)
- EA2 -** Estresse Agudo, por 2 (duas) horas;
- EP48 -** Estresse Prolongado, por 48 (quarenta e oito) horas;
- EP14d -** Estresse Prolongado, por 14 (quatorze) dias;
- 
- Sal-C -** Injetados quando adultos com *Safina*, Controles (não submetidos a estresse);
- OA-C -** Injetados quando adultos com Ovoalbumina, Controles (não submetidos a estresse);
- Sal-ES -** Injetados quando adultos com *Safina*, Submetidos a Estresse Social por 14 dias;
- OA-ES -** Injetados quando adultos com Ovoalbumina, Submetidos a Estresse Social por 14 dias;
- 
- C-Sal-C -** Tratados neonatalmente com Capsaicina, injetados quando adultos com *Safina*, Controles (não submetidos a estresse);
- C-OA-C -** Tratados neonatalmente com Capsaicina, injetados quando adultos com Ovoalbumina, Controles (não submetidos a estresse);
- C-Sal-EC -** Tratados neonatalmente com Capsaicina, injetados quando adultos com *Safina*, Submetidos a Estresse de Choque por 14 dias;
- C-OA-EC -** Tratados neonatalmente Com Capsaicina, injetados quando adultos com Ovoalbumina, Submetidos a Estresse de Choque por 14 dias.

## LISTA DE SIGLAS

- BDZ** – Benzodiazepínicos (*Benzodiazepines*);
- Ca<sup>+</sup>** – Cálcio (*Calcium*);
- DZP** – Diazepam (*Diazepam*)
- HPA** – Hipotálamo-Pituitário-Adrenal (*Hypothalamic-Pituitary-Adrenal*);
- ICAM-1** – Molécula de Adesão Intercelular-1 (*Intercellular Adhesion Molecule*)
- IFN- $\gamma$**  – Interferon- $\gamma$
- i.p.** – Intraperitonealmente (*Intraperitoneously*);
- Ig** – Imunoglobulina (*Immunoglobulin*);
- IL** – Interleucina (*Interleukin*);
- LBA** – Lavado Bronco Alveolar;
- LMN** – Linfomononucleares;
- LTB<sub>4</sub>** – Leucotrieno B4 (*Leucotrien*)
- NANC** – Não Adrenérgico Não Colinérgico;
- NIH** – Institutos Nacionais de Saúde (dos EUA) (*National Institutes of Health*)
- NKA** – Neurocinina A (*Neurokinin A*)
- NO** – Óxido Nítrico (*Nitric Oxide*)
- OVA** – Ovoalbumina;
- PAF** – Fator de Ativação Plaquetária (*Platelet-activating-factor*);
- PBR** – Receptor Benzodiazepínico Periférico (*Peripheral Benzodiazepine Receptor*);
- PBS** – Monofosfato Básico (*Phosphate-Buffered Saline*);
- PMN** – Polimorfonucleares;
- SNC** – Sistema Nervoso Central;
- SNP** – Sistema Nervoso Periférico;
- SP** – Substância P (*Substance P*);
- Th** – T auxiliar (*T helper*);
- TNF- $\alpha$**  – Fator de Necrose Tumoral (*Tumoral Necrosis Factor*)
- VCAM-1** – Molécula de Adesão Vascular -1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*)
- VU** – Vocalização Ultrassônica (*Ultrasonic Vocalization*);
- VIP** – Peptídeo Vaso Intestinal (*Vessel Intestinal Peptide*);

## RESUMO

PORTELA, Carlos de Paula. **Avaliação da resposta inflamatória pulmonar de ratos submetidos a estresse.** 2004. 161f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

---

O presente trabalho procurou avaliar a influência de dois modelos de estresse e do tratamento neonatal com capsaicina sobre a inflamação pulmonar em ratos Wistar. Através do registro de vocalizações ultrassônicas (VU's), constataram-se os níveis de ansiedade e de estresse. A resposta inflamatória foi induzida através de uma reação anafilática decorrente do desafio inalatório ao antígeno ovoalbumina, em ratos OVA-sensibilizados há 14 dias. Os modelos de estresse aplicados nos animais foram, respectivamente: 1- Estresse por confrontação social de ratos invasores contra ratos residentes dominantes e 2 – Estresse em esquiva ativa composta por 13 sessões diárias de choques escapáveis, pareados ao som de uma campainha, seguidas de uma sessão de choques inescapáveis, pareados ao mesmo som. Através de testes de função respiratória, avaliaram-se os índices de elastância e resistência do sistema respiratório. Observou-se maior intensidade da resposta inflamatória pulmonar de elastância e resistência nos animais submetidos aos modelos de estresse, em relação aos animais do grupo controle não submetidos aos modelos de estresse descritos; constatou-se que os animais tratados neonatalmente com capsaicina e submetidos ao modelo de estresse apresentaram uma diminuição nos índices de elastância basal do sistema respiratório, em relação aos não estressados. Não foram observadas diferenças significativas nos percentuais de aumento do óxido nítrico encontrado no ar exalado dos animais não tratados com capsaicina. Tomados em conjunto, os presentes resultados sugerem: 1- uma correlação positiva entre os níveis de ansiedade/estresse e a resposta inflamatória pulmonar; 2- um efeito inibitório do estresse, em animais tratados com capsaicina sobre os índices de elastância do sistema respiratório. Estes dados foram interpretados levando-se em conta as relações bidirecionais existentes entre os sistemas nervoso e imunológico, bem como uma ação de neuropeptídeos liberados junto ao tecido peribrônquico das vias aéreas.

**Palavras-chave:** Asma; Neuroimunomodulação; Alergia; Ansiedade e Estresse; Vocalização ultrassônica; Capsaicina.

## ABSTRACT

**PORTELA, Carlos de Paula. Evaluation of lung inflammatory response in submitted-stress rats. 2004. 161f. (PhD Thesis) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.**

---

The present work was designed to study the influence of two stress models and the capsaicin neonatal treatment on lung inflammation in Wistar rats. Stress and anxiety levels were measured through ultrasonic vocalizations. The inflammatory response was induced by anaphylatic reaction to an OVA-inhalatory challenge 14 days after a sensitization with OVA antigen. The stress models applied to the animals were respectively: 1 - Social confrontation of intruder rats vs dominant and resident rats; and 2 - 13 daily sessions of escapable shocks discriminated by a sound stimulus, and by one session of inescapable shocks discriminated by the same stimulus into a shuttle box chamber. The pulmonary indexes e.g. elastance and resistance of airway were increased in stressed rats. Moreover, stressed animals showed a larger elastance index of airways evaluated by respiratory function in mechanical ventilation when compared to non-stressed control groups. Capsaicin neonatally-treated animals that were submitted to stress exhibited decreased airways basal elastance indexes in relation to animals treated with control solution compared to non-stressed animals. Differences were not observed in the content of nitric oxide in the exhaled air of rats not treated with capsaicin. Taken together, these data suggest: 1. The existence of a positive correlation between anxiety and stress levels, and decrement of lung inflammatory response; 2. An inhibitory effect of capsaicin on airways elastance indexes. Data were discussed considering the bidirectional relationships between nervous and immune systems as well as the actions of neuropeptides, released in the proximity of the peribronchial airway tissues.

**Key-words:** Asthma; Neuroimmunomodulation; Allergy; Anxiety and Stress; Ultrasound vocalization; Capsaicin.

## RESUMEN

**PORTELA, Carlos de Paula. Evaluación de la respuesta inflamatoria pulmonar em ratas sometidos a estrés. 2004. 161f. Tesis (Doctorado en Farmacología) - Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.**

---

El presente trabajo buscó evaluar la influencia de dos modelos de estrés sobre la inflamación pulmonar en ratas macho de la línea Wistar, tratados neonatalmente con capsaicina o solución control. Mediante el registro de las vocalizaciones ultrasónicas (VU's), se hubieron constatado los niveles de ansiedad y de estrés. La respuesta inflamatoria fue inducida por una reacción anafilática decurrente del desafío inalatório al antígeno ovoalbumina, en animais sensibilizados hace 14 días. Los modelos de estrés aplicados a los animales consistió, respectivamente: 1- Estrés por confrontación social de ratas macho invasores contra residentes dominantes y 2 – Estrés en esquivia activa compuesta por 13 sesiones diarias de choques escapables, simultáneamente acompañados del sonido de una campanilla, seguidas de una sesión de choques inescapables, acompañados del mismo sonido. Mediante el análisis de pruebas de función respiratoria, se hubieron evaluado los índices de elastancia y resistencia del sistema respiratorio; se observó mayor intensidad de la respuesta inflamatoria pulmonar en los animales sometidos a los modelos de estrés, en relación a los animales del grupo control no sometidos a los modelos de estrés descritos: se constató que los animales tratados neonatalmente con capsaicina y sometidos al modelo de estrés em esquivia presentaron una disminución en los índices de elastancia basal del sistema respiratorio, en relación a los animales no tratados. No fueron observadas entre los grupos diferencias significativas en los índices de óxido nítrico encontrado en el aire exhalado de los animales de los grupos sin capsaicina. Tomados en conjunto, los presentes resultados sugieren: 1- una correlación positiva entre los niveles de ansiedad/estrés y la respuesta inflamatoria pulmonar; 2- un efecto inhibitorio del estrés, en animales tratados con capsaicina sobre los índices de elastancia de las vías aéreas. Estos datos fueron interpretados teniendo en cuenta las relaciones bidireccionales existentes entre los sistemas nervioso e inmunológico, así como una acción de neuropeptídeos liberados junto al tejido peribrônquico de las vías aéreas.

**Palabras-llave:** Asma; Neuroimmunomodulación; Alergia; Ansiedad y Estrés; Vocalización ultrasónica; Capsaicina.



# 1 INTRODUÇÃO

Ao longo da evolução, as diversas espécies têm procurado adaptar-se e sobreviver aos desafios e às necessidades, impostos pela natureza. Por conta disto e, de acordo com o ponto de vista evolucionista, grande parte dos seres vivos desenvolveu comportamentos e reações somático-viscerais, fundamentais para sua sobrevivência. Assim, nas situações de risco, medo, apreensão e agressividade, órgãos e sistemas colocam em ação mecanismos aprimorados para enfrentar as adversidades e competições inerentes aos ecossistemas em que vivem.

Os seres humanos, sobretudo os que vivem nas grandes metrópoles, convivem diariamente com situações peculiarmente adversas, do ponto de vista emocional e psicológico. Os diversos problemas financeiros, as crises nas relações sociais, o medo da violência crescente, a fome e a falta de trabalho e de moradia são alguns dos inúmeros exemplos das difíceis condições que acometem, de forma prolongada, muitas pessoas. São disparados, nestas condições, os mesmos mecanismos de defesa apresentados acima. As conseqüências psicológicas e orgânicas da ansiedade e do estresse, assim gerados, no entanto, repercutem na fisiopatologia dos organismos, conforme verificação e notificação dos serviços de saúde do nosso e de diversos países. De fato, estes serviços têm relacionado a causa e o agravamento de diversas patologias ao estresse e à ansiedade, que podem influenciar, inclusive, os tratamentos e as resoluções a serem adotadas.

Somam-se a estes aspectos, os expressivos custos sociais, previdenciários e, até mesmo aqueles decorrentes de perdas na produtividade, por causa do absenteísmo no trabalho e na escola, entre outros.

Na busca por um melhor conhecimento sobre as conseqüências fisiológicas da ansiedade e do estresse, pesquisadores de nossos laboratórios e de diversas instituições têm usado alguns conceitos, pertinentes ao paradigma de interação dos sistemas nervoso, endócrino e imune, isto é, da área de estudo que investiga os fenômenos de neuroimunomodulação ou psiconeuroimunologia.

De fato, um grande número de estudos, conduzidos por pesquisadores de diferentes áreas, busca clarificar alguns dos aspectos bio-psico-sociais subjacentes ao estresse, à ansiedade e à depressão, correlacionando-os às disfunções imunológicas e patologias sob um ponto de vista dinâmico e interdisciplinar. Vários distúrbios psicopatológicos têm sido, assim, associados a problemas detectados, por exemplo, em diversos órgãos dos sistemas cardiovascular, respiratório, gastrintestinal e da pele. Neste sentido, disfunções nestes sistemas parecem ser bastante afetadas por fatores emocionais. Permanecem no entanto e, a despeito de todo o avanço na área biomédica, pontos obscuros ou contraditórios quanto às relações existentes entre estes fenômenos.

A psiconeuroimunologia e a psicossomática são áreas de conhecimento que têm investigado em profundidade estas relações. Observou-se, à título de exemplo, que na asma há um forte componente emocional envolvendo episódios de ansiedade ou estresse próximos ao surgimento de crises. A asma é uma doença crônica de origem alérgica pulmonar, cujos complexos mecanismos de neurotransmissão e de mediação química envolvidos, estão sujeitos a diferentes estímulos internos e externos. Por esta razão, os modelos *in vivo* parecem ser os mais adequados para a investigação dos fenômenos de neuroimunomodulação ligados a esta doença, uma vez que permitem uma análise abrangente de variáveis endógenas e exógenas, que atuam conjuntamente.

Assim sendo, o presente estudo dá continuidade aos trabalhos realizados anteriormente e, também *in vivo* e que resultaram tanto em nosso trabalho de mestrado, como em publicações, anexadas no final desta tese, e cujo delineamento e principais resultados experimentais obtidos podem ser assim descritos:

Ratos Wistar machos foram sensibilizados i.p. com antígeno ovoalbumina (OVA); decorridas 24 horas, os animais foram submetidos a um estresse produzido em caixa de esquiva ativa, conforme descrito por Millenson e Leslie (1979). Foram registradas as emissões de vocalização ultrassônica (VU), durante os dez minutos iniciais das sessões de estresse

e, realizado o teste de interação social no campo aberto, uma hora após a última sessão. Realizou-se, também, o lavado broncoalveolar (LBA) e a subsequente contagem total de células em câmara de Neubauer, proveniente desses animais.

Observou-se, neste 1º experimento que:

1.1 – Os ratos submetidos ao estresse emitiram VU's nos intervalos dos estímulos e nos períodos de adaptação; estes fatos sugeriram que o estímulo estressor desencadeava esta resposta, caracterizadamente ansiogênica, pois nenhum dos grupos de ratos não estressados emitiu VU's;

1.2 – O tempo de interação social das duplas de animais sensibilizados e estressados foi significativamente menor do que o das duplas de animais sensibilizados, não estressados;

1.3 – A quantidade total de células presentes no LBA dos animais sensibilizados e estressados, foi estatisticamente maior do que o de animais sensibilizados e não estressados;

Num segundo estudo, que empregou o mesmo desenho experimental de sensibilização e estresse, os animais foram tratados diariamente com

diazepam (DZP) (2,0 mg/kg i.p.) uma hora antes de serem colocados no aparelho de esquia e, também, foram monitorados para registro das VU's. Foram verificados os níveis de anticorpos anti-OVA específicos (anafilaxia cutânea passiva) e mensurados os índices de edema peribrônquico, por histometria, em microscopia de imersão.

Neste 2º experimento, verificou-se que:

2.1 – A exemplo do que ocorreu no primeiro experimento, todos os animais submetidos ao estresse emitiram VU's e nenhum dos animais dos grupos controle (sensibilizados, não estressados e tratados tanto com o DZP ou com a solução controle) expressaram este comportamento;

2.2 – Não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de anticorpos anti-OVA específicos dos animais de todos os grupos;

2.3 – Houve um aumento nos índices de edema peribrônquico nos animais do grupo sensibilizado, estressado, mas não tratado com o DZP em relação aos do grupo de animais sensibilizados, estressados e tratados com o DZP; diferenças foram também encontradas entre os resultados dos animais do grupo de sensibilizados, não estressados e não tratados com DZP, em relação aos animais sensibilizados, não estressados e tratados com o DZP. Diferenças significantes foram ainda encontradas comparando-se: a) o grupo

de sensibilizados, estressados e não tratados com o DZP, cujos índices foram mais elevados do que aqueles do grupo de sensibilizados, estressados e tratados com o DZP e, b) dos animais sensibilizados, não estressados e tratados com o DZP, que foram menores do que os do grupo de sensibilizados, não estressados e tratados com solução controle.

É oportuno lembrar, que posteriormente foram publicados (PORTELA *et al.*, 2001) dados complementares aos da dissertação de mestrado, nos quais mostrou-se que:

a) – Não havia diferença estatisticamente significativa no número de células polimorfonucleares (PMN) encontradas próximo às vias aéreas dos ratos dos quatro grupos estudados;

b) – O número de células linfomononucleares (LMN) encontradas na parede das vias aéreas de ratos do grupo de sensibilizados, estressados e não tratados com o DZP era significativamente maior que aquele encontrado nos animais do grupo de sensibilizados, estressados e tratados com o DZP, bem como nos ratos dos grupos de sensibilizados, não estressados, tratados ou não com o DZP;

c) – O tratamento com o diazepam reduziu a infiltração de células LMN dos animais do grupo de sensibilizados, estressados e tratados com o DZP

comparado ao que foi encontrado nos animais do grupo de sensibilizados, estressados, mas não tratados com o DZP. Finalmente, não se observaram diferenças estatisticamente significantes entre os dados dos grupos de animais sensibilizados, não estressados, e tratados tanto com o DZP como com a solução controle.

Estes dados sugeriram, por um lado, que o estresse poderia ter sido responsável por uma intensificação da resposta inflamatória e, por outro, que o diazepam poderia ter tido efeito imunomodulador sobre a inflamação, particularmente sobre a atividade celular envolvida.

Tais resultados mostram-se intrigantes se levarmos em conta também outros trabalhos conduzidos em nossos laboratórios, que apontaram aspectos imunomodulatórios para o estresse e para este e outros fármacos benzodiazepínicos. Assim, observou-se:

- Após estresse, diminuição da atividade de macrófagos (FONSECA *et al.*, 2002; PALERMO-NETO *et al.*, 2003) além de alterações no crescimento de tumor ascítico de Ehrlich (PALERMO-NETO *et al.*, 2001; MORGULIS *et al.*, 2004);

- Que ansiolíticos da classe dos benzodiazepínicos, mostraram-se capazes de diminuir a atividade de macrófagos e de neutrófilos (SILVA *et al.*, 2003,



2004; MASSOCO *et al.*, 2003), bem como reduzir o edema de pata induzido por carragenina (LAZZARINI *et al.*, 2001, 2003).

Estes e outros estudos, do nosso e de outros grupos, ilustram a importância da investigação a cerca dos eventos que envolvem o estresse e a ação de fármacos, na neuroimunomodulação.

De fato, há diversos mecanismos, compreendendo mediadores químicos e neurotransmissores, os quais estão envolvidos na neuroimunomodulação. Observou-se, por exemplo, que as terminações nervosas do tipo "fibras C" têm um importante papel na modulação das respostas comportamentais induzidas imunologicamente (BASSO *et al.*, 2001, 2003, 2004). Além disso, verificou-se que animais, previamente expostos ao antígeno OVA em local escuro e protegido, aprenderam a evitar o local de contato com este antígeno, preferindo locais claros e desprotegidos, demonstrando que a ansiedade devido à reação alérgica, os condicionou a evitar até mesmo os locais que são normalmente preferidos pelos ratos, a fim de evitarem o estímulo aversivo antigênico experienciado nestes ambientes (COSTA-PINTO *et al* 2004).

Estes e outros trabalhos da área têm direcionado a atenção para um possível papel regulador dos neuropeptídeos, os quais são liberados por estas terminações nervosas, existentes inclusive nas vias aéreas, cuja

atividade está relacionada ao tônus muscular, atuando como broncoconstrictor, em termos de função pulmonar.

Levando-se em conta a pesquisa, os resultados e os questionamentos gerados pelos trabalhos acima mencionados, bem como a relevância do problema relacionado à asma e ao estresse, considerou-se oportuno e interessante analisar *“in vivo”* a resposta inflamatória alérgica pulmonar de ratos adultos sensibilizados com OVA e submetidos a dois modelos de estresse, um caracterizado pelo contato social estressante com um rato “ameaçador” e, outro desencadeado por estímulos ambientais estressantes. Decidiu-se, também, avaliar a participação de neuropeptídeos nestes processos, através do tratamento neonatal com capsaicina.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

A importância atribuída às relações mente-corpo e saúde é citada desde a antiguidade, como se depreende da leitura de registros da milenar medicina chinesa (MACIOCIA, 1996) e das teorias dos humores de Hipócrates e Galeno (STERNBERG, 1998); nestas, ressaltavam-se as relações entre o sistema nervoso e os órgãos de defesa do organismo. Em nosso meio acadêmico, é de amplo conhecimento que tanto o sistema nervoso central (SNC) e o periférico (SNP), quanto o sistema imunológico estão implicados mutuamente na manutenção da homeostase (McEWEN, 1998) formando a base dos fenômenos observados e analisados na assim chamada neuroimunomodulação.

De acordo com Blalock (1984), as interações dos sistemas imune e neuro-endócrino, atuantes na neuroimunomodulação, compreendem diferentes modulações bioquímicas. De fato, estes sistemas 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 Sistema Nervoso Central (SNC) e também hormônios, tais como o Hormônio Adreno-Corticotrópico e o Hormônio Estimulante da Tireóide, sendo sintetizados em células linfóides (BESEDOVSKY e DEL REY, 1996). A partir destas observações, começa-se a delinear o conceito de que há comunicações 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 e FELTEN, 1995, DHABHAR e McEWEN, 1997, BASSO *et al.*, 2003).

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 (PALERMO-NETO e GUIMARÃES, 2000, MORGULIS *et al.*, 2004; PALERMO-NETO *et al.*, 2003), mas também aqueles de natureza física (FONSECA *et al.*, 2002; PALERMO-NETO *et al.*, 2003), são capazes de promover uma redução da fagocitose realizada por macrófagos e de tornar camundongos mais susceptíveis ao desenvolvimento do tumor de Ehrlich.

Por conta disso, o estresse e a ansiedade, considerados fatores potencialmente neuroimunomoduladores, têm sido associados à problemas respiratórios, cardiovasculares, dermatológicos, psicopatológicos, sexuais, etc. Sabe-se que o estresse pode suprimir alguns mecanismos de defesa enquanto estimula outros (SHU *et al.*, 1993; APANIUS, 1998; GONZALEZ-QUIJANO, 1998).

As conseqüências do estresse podem variar de acordo com a intensidade, predictibilidade e a controlabilidade do agente estressante. A

percepção de estressores como previsíveis ou imprevisíveis, bem como a possibilidade de controlar ou não os estímulos aversivos são os maiores determinantes do estresse psicológico, modulando suas conseqüências (PARÉ e GLAVIN, 1993<sup>1</sup> apud BAUM *et al.*, 1981). Os modelos de estimulação aversiva em aparelhos de esQUIVA são considerados como capazes de produzir boa parte das reações e respostas típicas do estresse, com interessante potencial imunomodulatório (COOVER *et al.*, 1971).

A liberação de glicocorticóides, esteróides importantes para a atividade do sistema imunológico, está relacionada ao mecanismo conhecido como eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) que é ativado em maior escala durante situações de estresse. Além disso, diferentes neurohormônios, neuropeptídeos, citocinas e catecolaminas participam da reação ao estresse e dos processos inflamatórios, interligando funções periféricas e centrais (DUNN e SWIERGEL, 1998). Alguns produtos celulares, como as interleucinas (IL's) e o hormônio liberador de corticotrofina podem atuar em linfócitos, mastócitos e nervos periféricos, favorecendo a resposta inflamatória de origem alérgica como a asma, o que levanta a hipótese de um papel relevante para o estresse na neuroimunomodulação (WEBSTER *et al.*, 1998).

---

<sup>1</sup> Paré WP, Glavin GB. Animal models of stress in pharmacology. In: van Haaren F, editor. *Methods in Behavioral Pharmacology*. New York: Elsevier Science Publisher; 1993. p. 413-41

De fato, a liberação de neurotransmissores, hormônios e citocinas, durante situações estressantes, modula respostas inflamatórias (PERSOONS *et al.*, 1995; HOLSBOER, 1995; DUNN e SWIERGEL, 1998). Estudos indicam que estados de estresse e ansiedade (LEONARD e SONG, 1996; FONSECA *et al.*, 2002; PALERMO-NETO *et al.*, 2003), bem como ansiolíticos (SCHLUMPF *et al.*, 1992; MASSOCO e PALERMO-NETO, 2003), mostram-se imunomodulatórios, tanto em animais de laboratório como no homem (DOHMS e METZ, 1991).

Além disso, as neurocininas, em especial a substância P (SP) e a neurocinina A (NKA), também têm sido implicadas com os processos alérgicos (MARTINS *et al.*, 1991c), parecendo mesmo ter a capacidade de exacerbá-los em situações de estresse (BASCUM e MEGGS, 1995; JOOS e PAUWELS, 2000).

Cabe lembrar, inicialmente, que a resposta inflamatória de origem alérgica pulmonar pode ser induzida por um modelo experimental de sensibilização e desafio antigênico. De acordo com a literatura, a sensibilização pode ocorrer quando o organismo entra em contato com um determinado antígeno, o que estimula a ativação de células T, de grande importância em diversos processos alérgicos que envolvem o trato respiratório (HACZKU *et al.*, 1995b). Segundo Holgate (1999), estas células T, após o estímulo decorrente do contato antigênico, produzem um conjunto restrito de citocinas consideradas pró-alérgicas, pois estão relacionadas à

produção de anticorpos específicos, existentes em processos alérgicos, como é o caso das imunoglobulinas da classe "E" (IgE), por exemplo. A presença destas Ig's, devido à produção das citocinas pró-alérgicas regula, por exemplo, a resposta de migração celular ao foco inflamatório após a reexposição ao antígeno, ou seja: o desafio antigênico (MAES *et al.* 1999; MOSMANN *et al.* 1996).

Nos seres humanos, os anticorpos ou Ig's estão particularmente ligados ao desenvolvimento da asma (BECKER e AUSTEN, 1966; TURNER, 1997). Inclusive, foi estabelecido que o desencadeamento das crises de asma, após o contato com ácaros, pólenes, fungos, pêlos de animais, entre outros antígenos, esteja relacionado à existência de anticorpos para estas substâncias (VOORHORST *et al.*, 1967; POLLART e PLATTS-MILLS, 1989, POLLART *et al.*, 1989). Além disso, outros fatores contribuem para a piora e a reincidência das crises de asma, tais como: a fumaça, o ar poluído e, ainda, infecções virais (para revisão, ver SIBBALD *et al.*, 1992; POPP *et al.*, 1993).

Assim, alguns modelos experimentais de estresse oferecem dados particularmente interessantes para a análise desta questão, em virtude das alterações deflagradas em modelos de inflamação alérgica pulmonar, nos quais alguns parâmetros costumam ser necessariamente verificados, caso por exemplo da produção de anticorpos e do aumento, após o desafio antigênico, no número de eosinófilos, mastócitos, neutrófilos, linfócitos e de



células epiteliais no fluido do LBA (ELWOOD *et al.*, 1991). Estes parâmetros guardam estreita relação com diversos fenômenos observados na asma.

Em especial, a asma, foi definida no *workshop* do *International Consensus Report on National Asthma Education and Prevention Program* do *National Institutes of Health* (NIH), como uma doença inflamatória crônica de vias aéreas. Dentre os aspectos imunopatológicos decorrentes do quadro asmático salienta-se: descamação de epitélio; deposição de colágeno abaixo da membrana basal; edema ao redor das vias aéreas; ativação de mastócitos; infiltração inflamatória composta de neutrófilos (particularmente nos quadros agudos fatais), eosinófilos e linfócitos.

A prevalência e mortalidade da asma têm aumentado em diversos países nas últimas décadas (BARNES e ADCOCK, 1997). Em 1994 havia cerca de 12 milhões de portadores de asma nos EUA; este país e, também aqueles da Europa registraram um aumento de 30% de casos de asma na última década (GILMOUR, 1995).

Vale ressaltar que a hiperresponsividade do trato respiratório, característica típica da asma, envolve limitação da ventilação do fluxo aéreo pulmonar devido, principalmente, a fatores como hipersecreção mucosa, edema peribrônquico e infiltração inflamatória na região bronquial, que tornam a membrana basal e o epitélio brônquico espessos, participando, ainda, das contrações das vias aéreas (KOBZIK e SCHOEN, 1994).

Por outro lado, desordens de ansiedade, como o transtorno de pânico e a agorafobia podem atuar no desencadeamento da asma (COWLEY e ROY-BYRNE, 1987; RIETVELD *et al.*, 1999). Corroboram para isto dados que sustentam a hipótese de que as desordens de ansiedade são mais predominantes em asmáticos do que na população saudável (YELLOWLEES e KALUCY, 1990; VILA *et al.*, 2000). Além disso, em testes de personalidade foram detectadas escalas maiores de ansiedade, pânico e medo em pacientes asmáticos (NEUHAUS, 1958; DIRKS *et al.*, 1979), o que ressalta a importância de se considerar outros aspectos que transcendem à complexa relação antígeno-anticorpo. Estes fatos, atuando em conjunto, levam alguns pacientes a uma incapacitação e dependência cada vez maior dos serviços médicos e do uso de medicamentos (DIRKS *et al.*, 1977).

A contração das vias aéreas, por sua vez, responde a estímulos nervosos, cujos mecanismos de neurotransmissão parecem ser dependentes do sistema nervoso colinérgico, adrenérgico e do sistema nervoso não-adrenérgico e não-colinérgico (NANC) (BARNES e DIXON, 1984; WIGGS, *et al.*, 1991; BARNES e LIEW, 1995). A broncoconstrição pode ser estimulada por acetilcolina, proveniente de fibras eferentes do nervo vago, que atua em receptores muscarínicos (RICHARDSON, 1991) ou pode ser estimulada via receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos existentes na musculatura lisa brônquica, cuja fibras, presentes principalmente na árvore brônquica, recebem inervação noradrenérgica ou respondem à adrenalina liberada pela medula da glândula adrenal (WIGGS *et al.*, 1991).

O sistema NANC apresenta dois grandes grupos: um componente inibitório que causa broncodilatação e outro excitatório cuja estimulação resulta em broncoconstrição (JOOS e PAUWELS, 2000). Neste sentido, a identidade precisa dos neurotransmissores do componente inibitório do sistema NANC ainda não está totalmente definida. Acredita-se hoje que estes efeitos sejam exercidos, provavelmente, pelo peptídeo vasoativo intestinal (VIP), peptídeos relacionados (peptídeo histidina-metionina ou isoleucina e peptídeo histidina-valina) e pelo óxido nítrico (NO) (BELVISI *et al.*, 1992). A liberação do VIP resulta em broncodilatação, sendo 50 a 100 vezes mais potente na produção deste efeito que o isoproterenol em preparações de brônquio isolado (BARNES e DIXON, 1984). Embora a inalação com VIP por animais de experimentação resulte em broncodilatação, este efeito não foi evidenciado em humanos (SAID, 1982; BARNES e DIXON, 1984).

Neste contexto, Joos e Pauwels (2000), em seus estudos sobre a fisiopatogenia da asma brônquica mostraram que alguns dos efeitos broncoconstritores e inflamatórios da asma estão intimamente ligados à liberação de neurocininas por fibras nervosas sensitivas não mielinizadas denominadas de "fibras C". As principais neurocininas, a nível pulmonar são a SP e a NKA (BURNSTOCK, 1969; UCHIDA *et al.*, 1987).

Entre as ferramentas farmacológicas existentes para o estudo das neurocininas - tanto da SP, como da NKA – pode-se citar a depleção das fibras C. Esta depleção pode ser obtida experimentalmente mediante o tratamento com altas doses de capsaicina; este tratamento resultou, por exemplo, na diminuição de mais de 90% do conteúdo pulmonar de neurocininas SP e NKA (MARTINS *et al.*, 1991a).

A capsaicina é um componente da pimenta vermelha do gênero *Capsium*. Jancsó *et al.* (1967) constataram que a capsaicina purificada apresentava uma função bloqueadora sensitiva. A degeneração neurotóxica das terminações nervosas sensitivas não mielinizadas (fibras C) mediante administração de altas doses de capsaicina em animais de experimentação é um importante modelo para estudos dos efeitos fisiológicos das neurocininas (KRÖLL *et al.*, 1990; HOLZER, 1991; MARTINS *et al.*, 1991a; MARTINS *et al.*, 1991b).

A ação da capsaicina nas terminações sensitivas decorre da sua ligação com receptores específicos chamados de vanilóides (SZALLASI e BLUMBERG, 1991). Estes receptores foram descobertos a partir de estudos com a proteína resinaferotoxina, que despolariza a membrana de neurônios em cultura, liberando neuropeptídeos (MAGGI, 1995). Quando a capsaicina se liga aos receptores vanilóides, ocorre inibição de canais catiônicos voltagem-dependente, com posterior influxo de Cálcio ( $Ca^{+}$ ) e de Sódio e

efluxo de Potássio. Esses eventos culminam com a liberação maciça de neurotransmissores, que determinam, em função da concentração, a neurotoxicidade (KRÖLL *et al.*, 1990; SZALLASI e BLUMBERG, 1991).

Martins *et al.* (1993) estudaram os efeitos, na mecânica pulmonar, decorrentes da infusão de capsaicina por via intravenosa em cobaias, utilizando a técnica da cápsula alveolar modificada para pequenos animais, conforme proposto por Saldiva *et al.*, (1992). Demonstraram que a infusão de capsaicina resultou em aumentos significativos, e de maneira dose dependente, na resposta mecânica e viscoelástica pulmonar. A explicação para o aumento da resistência do sistema respiratório tissular após infusão de capsaicina poderia estar relacionada à ativação da musculatura lisa presente em bronquíolos terminais e ductos alveolares.

Vários modelos experimentais têm demonstrado que a SP pode agir como quimiotática para eosinófilos, *in vivo* e *in vitro* (DUNZENDORFER, *et al.*, 1998). WEINSTOCK *et al.* (1988) demonstraram que eosinófilos são capazes de expressar gene para a SP. Weinstock e Blum (1990) demonstraram que eosinófilos presentes em granulomas esquistossomóticos foram capazes de sintetizar SP. Sagara *et al.* (1993) estudaram os efeitos da liberação aguda de neurocininas, como a SP, em cobaias por exposição à capsaicina por via inalatória; observaram um aumento significativo da resistência do sistema respiratório após a inalação com capsaicina. Na

avaliação histopatológica de fragmentos do brônquio fonte direito, estes autores observaram um intenso infiltrado eosinofílico.

Kroegel *et al.* (1990) estudaram a capacidade da SP e de outros peptídeos de ativar eosinófilos obtidos da cavidade abdominal de cobaias. Houve aumento da liberação de peroxidase eosinofílica com concentrações de SP de 10 nM a 100 mM. O mecanismo pelo qual a SP induz liberação de peroxidase por eosinófilos não é conhecido. Esta liberação ocorre independente de haver lesão celular; neste sentido, ela parece não depender da liberação de  $Ca^{+}$  ou mesmo de um mecanismo receptor-dependente, visto que não é inibida pela associação de um antagonista do receptor para SP. Wiedermann *et al.* (1993) demonstraram que a SP estimula a migração de eosinófilos *in vitro* sendo a EC50 encontrada de aproximadamente 1-10 pM e a resposta máxima obtida com 100 pM.

Numao e Agrawal (1992) estudaram o efeito quimiotático de quatro neuropeptídeos para eosinófilos purificados do sangue de pacientes alérgicos e de sujeitos controles. Os peptídeos isoladamente não exerceram atividade quimiotática significativa para eosinófilos. Quando estas células foram pré-tratadas com Fator de Ativação Plaquetária (PAF) ou Leucotrieno B4 (LTB<sub>4</sub>) houve potencialização significativa da resposta quimiotática para SP e NKA. Estes achados sugeriram que provavelmente a SP devia estar envolvida nos mecanismos de ativação destas células e no ajuste fino para o

desencadeamento dos processos de degranulação celular. Deste modo, a SP deveria contribuir para a perpetuação do processo inflamatório que ocorre em várias doenças, particularmente na asma brônquica.

Existem algumas evidências adquiridas de experimentos conduzidos *in vivo* e *in vitro* sugerindo que as neurocininas, particularmente a SP, possam contribuir para a formação de um infiltrado inflamatório, visto que podem interagir com linfócitos, mastócitos e eosinófilos (WIEDERMANN *et al.*, 1989). Assim, sugeriu-se que estas substâncias estimulem a produção de citocinas por linfócitos, particularmente IL-2, IL-6, Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (WAGNER *et al.*, 1987; NIO *et al.*, 1993; RAMESHWAR *et al.*, 1993). Stanisiz *et al.* (1987) estudaram linfócitos de placas de Peyer e de baço de ratos. Utilizando citofluorimetria, observaram que houve ligação da SP com linfócitos T e B provenientes destes dois locais, sem haver expressão diferencial nas duas populações celulares. Estes resultados sugeriram que os efeitos da SP em linfócitos eram provavelmente mediados via ligação a receptores específicos de membrana.

Foster *et al.* (1991) sugeriam que a SP estimulava a proliferação e agia como quimiotático para linfócitos. Moore *et al.* (1990) administraram SP em ovelhas através da canulação de vias aferentes de linfonodos periféricos e observaram, nesta situação, a ocorrência de um estímulo para a liberação

de linfócitos CD4+ destes linfonodos. Este estímulo se mantinha até 96 horas após uma única infusão de SP. Caso os animais recebessem uma infusão da mesma dose de SP, seis dias antes de serem sensibilizados a um determinado antígeno, ocorria abolição do período de latência para a produção de anticorpos. Estes efeitos sugeriram potencialização da resposta imune pela SP, tanto celular como daquela ligada à produção de imunoglobulinas.

Tibério *et al.* (1997) mostraram que cobaias depletadas de neurocininas e expostas cronicamente à OVA apresentavam redução significativa no número de células mononucleares ao redor das vias aéreas, particularmente de linfócitos CD4+. Por outro lado, havia uma tendência à redução do número de eosinófilos tanto no lavado broncoalveolar quanto ao redor das vias aéreas. Estes fatos sugeriram que, neste modelo experimental, as neurocininas influenciavam a formação do infiltrado linfocitário CD4+ de modo mais significativo do que o eosinofílico. Estes achados pareciam confirmar evidências indiretas, descritas anteriormente, de que os efeitos das neurocininas nos eosinófilos estariam relacionados à ativação dos linfócitos CD4+, sendo que outros mediadores apresentariam um efeito quimiotático mais significativo em relação a estas células.

Como discutido previamente, muitas evidências têm sugerido que a interação de eosinófilos e linfócitos representa um papel fundamental no



desenvolvimento da inflamação e da hiperresponsividade brônquica, possivelmente via ativação de linfócitos CD4<sup>+</sup> (AZZAWI *et al.*, 1990; CORRIGAN e KAY, 1991; ROBINSON *et al.*, 1993). Acredita-se que as neurocininas possam representar um via alternativa de ativação linfocitária, uma vez que atuam diretamente via ligação a receptores específicos de membrana, exercendo um efeito quimiotático direto e mais efetivo nestas células.

Estudos dos mediadores químicos envolvidos nas crises de asma apontam para um papel crucial do sistema nervoso autônomo pulmonar, tendo-se sugerido que a broncoconstrição seria decorrente da uma ação de neurotransmissores e neuropeptídeos em fibras nervosas presentes nas vias aéreas (para revisão ver BOCHNER, 1994).

Um outro aspecto importante a ser considerado sobre a asma, diz respeito às alterações linfocitárias, especificamente relacionadas à população de células CD4<sup>+</sup> nesta doença. Foi observado que existe ativação destas células no sangue de pacientes asmáticos e que existe correlação positiva delas com a gravidade da doença. Relatou-se, também, um aumento da expressão de receptores para IL-2 (CD25) (WALKER *et al.*, 1991; WILSON *et al.*, 1992). Em pacientes asmáticos submetidos à biópsias endobrônquicas e lavado broncoalveolar, observou-se aumento de expressão de receptores para IL-5 e para moléculas de adesão (ICAM-1 e

VCAM-1), indicando este fato, ocorrência de ativação de linfócitos nestes pacientes (BENTLEY *et al.*, 1993a; BENTLEY *et al.*, 1993b).

Os linfócitos, como se sabe, podem ser divididos em dois subgrupos maiores, a saber: CD4+ e CD8+. Os linfócitos CD4+ são células envolvidas nos processos inflamatórios, enquanto os linfócitos CD8+ são responsáveis pela resposta citotóxica, destruindo as células do hospedeiro que expressam novos antígenos desencadeados por ação viral, bacteriana, transformação maligna, assim como atuam nos processos de rejeição. Metzger *et al.* (1987), estudando o lavado broncoalveolar de asmáticos atópicos, observaram que, após 48 horas da broncoprovocação, havia um aumento da população de linfócitos T CD4+. Além disto, este aumento só ocorria em pacientes que apresentavam a reação tardia. Gerblich *et al.* (1984) observaram, após a broncoprovocação, diminuição do número de linfócitos CD4+ no sangue periférico de pacientes asmáticos atópicos. Estes achados sugeriram a existência de um recrutamento seletivo destas células na reação asmática tardia. Por outro lado, Stock *et al.* (2004) mostraram, em pacientes asmáticos atópicos que só apresentam a reação imediata, a ocorrência de um aumento da subpopulação CD8+ no fluido do lavado broncoalveolar após a broncoprovocação.

Após a ativação por contato com antígenos, os linfócitos CD4+ são capazes de elaborar uma série de mediadores protéicos, as assim

chamadas citocinas. Estudando especificamente sua interação com eosinófilos, estes peptídeos mostraram-se capazes de promover a maturação daquelas células (ROTHENBERG *et al.*, 1987), bem como de aumentar a sua sobrevivência *in vitro* (ROTHENBERG *et al.*, 1989), e sua atividade quimiotática (WANG *et al.*, 1989) e efetora (ROTHENBERG *et al.*, 1989). Assim sendo, os linfócitos CD4+ ativados são capazes de desencadear um processo inflamatório independente da presença de IgE. Tal fato permitiu que se levantasse a possibilidade de haver uma hipótese única para explicar a patogênese da asma em pacientes não atópicos e atópicos (CORRIGAN e KAY, 1991).

Parte desta hipótese diz respeito às neurocininas liberadas; sabe-se que elas podem proporcionar aumento na quimiotaxia e na ativação de células do sistema imunológico e aumento na liberação de histamina e citocinas por parte de linfócitos T, macrófagos e mastócitos (MOORE *et al.*, 1990; SAGARA *et al.*, 1993).

A infiltração celular e a hiperreatividade brônquica são também verificadas na asma em humanos. Considerando-se que a hiperreatividade brônquica pode persistir mesmo na ausência das células inflamatórias, Elwood *et al.* (1991) sugeriu que a infiltração celular seria apenas parte do complexo processo de hiperresponsividade brônquica.

Já com relação aos níveis de anticorpos, Persoons *et al.* (1995) observaram um aumento significativo nos títulos de anticorpos ou de Ig's das classes E em ratos sensibilizados e expostos a um estresse inescapável em esQUIVA ativa. De acordo com os autores, as diferenças observadas foram conseqüentes de interações do SNC com a atividade do sistema imunológico; macrófagos alveolares estimulados por endotoxina, por exemplo, produziram níveis mais elevados da citocina IL-1. Vale lembrar que esta citocina tem importante papel nas funções do SNC em processos inflamatórios (DE VRIES *et al.*, 1991; KAPSENBERG *et al.*, 1992; DUNN e SWIERGEL, 1998; COHN e SÁ-ROCHA, 2004). Por fim, é importante citar que as Ig's, em especial IgE e IgG - estão intimamente relacionadas com a degranulação de mastócitos, verificada em quadros alérgicos e na asma, como estudado por Basso *et al.* (2003) e Corrigan (1992), respectivamente.

Por outro lado, a gravidade, o tipo de estresse e a resposta comportamental do animal ao agente estressor, podem determinar o grau das alterações do sistema imunológico observadas diante de uma estimulação estressante. Entre as técnicas para a avaliação do estresse sobre a resposta imunológica, encontram-se aquelas relacionadas ao condicionamento pavloviano (ADER e COHEN, 1993; PALERMO-NETO e GUIMARÃES, 2000) e aquelas que induzem comportamentos sociais típicos, como é o caso do modelo de confrontação social, modelo que consiste na exposição de animais intrusos com animais residentes, no ambiente destes últimos (STEFANSKI e BEN-ELIYAHU, 1996).

De acordo com Stefanski e Engler (1998), no modelo de confrontação social, ratos machos e fêmeas nomeados "residentes" devem ser colocados em gaiolas grandes desde o nascimento. Na idade adulta, ou com cerca de 3 meses, os machos maiores presentes na gaiola tornam-se dominantes, estabelecendo-se uma hierarquia social e desencadeando-se uma reação a ratos invasores de seu território. Assim, quando são colocados ratos "naive" neste ambiente, estes animais são tratados como intrusos. Além disso e, para a confrontação social, os ratos intrusos devem ser mantidos em ambiente diferente da gaiola grande onde formou-se a hierarquia social; assim, têm-se optado por manter os animais "intrusos" nas gaiolas padrão comuns (gaiolas de moradia) até o momento no qual são introduzidos na gaiola grande, ambiente dos residentes.

O modelo de confrontação social: intruso x residente, em ratos de laboratório, tem sido considerado válido para o estudo dos efeitos de condições estressantes sobre os sistemas endócrinos, cardiovasculares e imunológicos (STEFANSKI e ENGLER, 1998). Esses autores observaram que o tempo de interação social entre os ratos intrusos e os ratos residentes/dominantes implica em diferentes alterações na imunidade celular.

Assim, Stefanski e Engler (1998) observaram que na estimulação estressante aguda da confrontação social por 2 horas houve um aumento no

número de granulócitos e um aumento no número de linfócitos T CD4 e CD8 nos animais intrusos, ao passo que, na estimulação estressante prolongada (por 48 horas), não houve alteração no número destas células nos animais intrusos. Os autores atribuem as diferenças quantitativas encontradas à migração das células sanguíneas, ou seja: à redistribuição celular. De fato, as diferenças entre o tempo de exposição ao estresse por confrontação social parecem ser determinantes para a avaliação de diversos parâmetros fisiológicos e celulares; assim, Stefanski (1997) observou que o estresse por confrontação social prolongado sem interrupções (por 7 dias) resultou em aumento de noradrenalina e adrenalina no plasma sanguíneo e decréscimo no número de células CD4+ e CD8+, bem como em níveis reduzidos de testosterona. Soube-se, neste contexto, que a interação social acompanhada pela agressividade foi associada a elevados níveis de glicocorticóides (HENRY, 1982). É de amplo conhecimento que estes hormônios atuam suprimindo a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2 (CHROUSOS, 1995).

O estresse também pode ser produzido em aparelho de esquiva ativa. Neste caso, utiliza-se uma caixa que possui dois lados iguais e que possibilita ao animal esquivar-se e/ou escapar de estimulações aversivas, ao se locomover de um lado para o outro da caixa. Assim, e de acordo com a metodologia descrita por Millenson e Leslie (1979), cada rato é colocado em um dos lados da esquiva, podendo explorá-la por 3 minutos; em seguida, uma campainha é acionada, sinalizando que ocorrerá uma estimulação

elétrica no piso da caixa, do lado em que o animal estiver. De acordo com a programação do equipamento, geralmente automático, a cada campainha e/ou estimulação elétrica é possível para o animal passar para o outro lado da caixa, sendo que ao fazê-lo, evita o estímulo aversivo. Estas seqüências são repetidas e aprendidas pelo animal, e produzem estresse (COOVER et al, 1971), além de modificar a resposta inflamatória alérgica pulmonar (PORTELA et al., 2001, 2002).

Cabe ressaltar que nestes e, em outros modelos de estresse, a avaliação comportamental deve incluir a constatação da ansiedade produzida pelos procedimentos adotados. Assim, aparelhos para registro da ansiedade e do estresse têm sido amplamente utilizados como ferramenta em estudos farmacológicos; um destes aparelhos permite a detecção de VU's emitidas pelos ratos (MICZEK et al., 1995). Estes modelos têm se mostrado, aliás, extremamente eficazes para a investigação dos efeitos de fármacos que reduzem ou abolem a ansiedade, como os ansiolíticos.

Trabalhos conduzidos pelo grupo de Chang (1991) mostraram que o DZP e o alprazolam diminuíram a formação de IL-2 e de seus receptores. Estes dados levaram à sugestão de que a IL-2 participa, de maneira direta, dos efeitos inibitórios dos benzodiazepínicos (BDZ's) na proliferação de linfócitos T e B. Além da IL-2, a IL-6 também é influenciada pelos BDZ's, os quais são capazes de diminuir sua liberação por linfócitos esplênicos

estimulados (SCHREIBER *et al.*, 1993). Vale lembrar que agonistas de receptores BDZ's periféricos e centrais interferem, também, com a fagocitose dessas células (COVELLI *et al.*, 1991; KRUMHOLZ *et al.*, 1987; MASSOCO e PALERMO-NETO, 1999; SILVA e PALERMO-NETO, 1999).

Conforme já mencionado anteriormente, o estado emocional pode interferir com o desencadeamento da resposta alérgica de origem imunológica. Partindo dessa premissa, Bonamin e Malucelli (1995) mostraram que o estresse do isolamento social induzido em camundongos modificou a resposta imunológica e o desenvolvimento do edema induzido por carragenina na pata. Outros trabalhos mostraram que um estresse físico produzida por uma estimulação aversiva na pata (FONSECA *et al.*, 2002) bem como outros de natureza psicológica (PALERMO-NETO *et al.*, 2003; MORGULIS *et al.*, 2004) são capazes de diminuir a atividade de macrófagos, caracterizando este fato redução da imunidade inata. Além disso, considera-se que possa haver uma possível participação dos linfócitos em alterações decorrentes da apresentação do antígeno. De fato, Irwin *et al.*, (1990) e Jain *et al.*, (1991) observaram diminuição na proliferação de linfócitos em ratos submetidos a estímulos estressantes por tempo prolongado.

Por conta destes dados, é correto supor que a duração, o tipo e a intensidade do estímulo estressante conduzem a resultados diferenciados na



resposta comportamental e imune, sendo que a estimulação intensa, por curtos períodos de tempo parece reduzir parâmetros da resposta inflamatória, ao passo que uma estimulação menos intensa, porém administrada continuamente parece exacerbar certos parâmetros da mesma resposta inflamatória.

Diante dos dados apresentados, parece claro que o meio ambiente e os fatores comportamentais podem interferir com a resposta inflamatória alérgica, inclusive com aquela que ocorre em nível pulmonar. No entanto, apesar dos estudos realizados até o presente momento, existem dados conflitantes no que concerne à questão. Assim sendo, este projeto pretendeu colaborar para um maior esclarecimento de alguns desses pontos.

Especificamente, levando-se em conta a pesquisa, os resultados e os questionamentos gerados pelos trabalhos mencionados anteriormente, bem como a relevância do problema relacionado à asma e ao estresse, considerou-se oportuno e interessante analisar "*in vivo*" a resposta inflamatória alérgica pulmonar de ratos adultos sensibilizados com OVA e submetidos a dois modelos diferentes de estresse, um caracterizado pelo contato social estressante com um rato "ameaçador" e, outro desencadeado por estímulos ambientais estressantes. Pretendeu-se, ainda, tratar os

animais neonatalmente com capsaicina com vistas a avaliar os efeitos da redução dos neuropeptídeos nestes processos.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo geral**

Estudar os efeitos do estresse sobre a resposta inflamatória de origem alérgica pulmonar em ratos adultos, tratados ou não neonatalmente com capsaicina, sensibilizados com OVA e submetidos a dois modelos de estresse.

### **3.2 Objetivos específicos**

- 3.2.1 Estudar os efeitos do estresse social agudo (2 horas) e prolongado por 48 horas ou 14 dias sobre a resposta comportamental de ratos sensibilizados com OVA.
- 3.2.2 Estudar a resposta inflamatória de origem alérgica pulmonar em ratos sensibilizados e desafiados com OVA, submetidos a um estresse social, prolongado por 14 dias.
- 3.2.3 Estudar a resposta inflamatória de origem alérgica pulmonar em ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina, e submetidos a um estresse por choques em caixa de esquivas ativa por 14 dias.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 4.1 Sujeitos

Foram utilizados 94 ratos "Wistar" (*Rattus norvegicus*), machos, com idade aproximada de 3 meses, peso médio de 350 g, geneticamente similares e provenientes de uma prole obtida nos Biotérios da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Os animais foram utilizados e tratados em conformidade com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia na Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), que são semelhantes às normas e regimentos internacionais descritos pelo *Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources, National Research Council*, EUA. Todos os animais permaneceram em biotério, constituído por sala com ventilação, umidade (45 a 60%) e temperatura (24° - 26°C) controladas. A iluminação artificial proporcionou aos animais um ciclo claro-escuro de 12 horas. As lâmpadas utilizadas foram do tipo fluorescente (1200 lux). Água e comida foram fornecidas aos animais *ad libitum* durante todo o experimento, sendo retiradas durante as observações experimentais. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, medindo 41 x 34 x 16 cm forradas por maravalha e tampadas por grade metálica (gaiola padrão).

## 4.2 Drogas e reagentes

- Capsaicina – (Spectrum Chemical MFG Corp, Gardena.);
- Hidróxido de Alumínio em forma de gel coloidal (Pepsamar® - *Whitehall labs*);
- Ovoalbumina - grau II (Egg *albumin* grade II - Sigma®);
- Pentobarbitol Sódico (*Cristália*®);
- Solução de PBS – pH 7,4;
- Solução de Ringer (*Aster*®).

### 4.3. Aparelhamento

#### 4.3.1 Esquiva ativa

Caixa de esquiva tipo *shuttle box* (modelo E 10-16 *Coubourn Instruments*, EUA) mantida no interior de um compartimento modular, para atenuação sonora. A regulação proporcionou um tempo de espera de 3 minutos (período de habituação). Uma campainha de 6 dB era acionada por 2 segundos, quando então seguia-se a liberação de uma pequena corrente elétrica de 0,5 mA no piso da caixa de esquiva, ou nenhuma estimulação (grupo controle). A esquiva durante a campainha ou durante o choque, interrompia a estimulação elétrica. Após o tempo máximo de 5 segundos o choque também era interrompido. Em ambos os casos, após 28 segundos de espera, era emitida nova campainha seguida ou não de choque e assim por diante, até o total de 50 estimulações. Esse procedimento repetido diariamente até o 13º dia proporcionou o condicionamento dos animais. No 14º dia os animais já condicionados foram submetidos a uma sessão na mesma caixa de esquiva, com 50 choques inescapáveis, pareados à mesma campainha.

A Figura 1 mostra os equipamentos controladores das caixas de esquiva ativa. Ainda nesta Figura, em detalhe, é apresentado um animal dentro de uma caixa de esquiva, em procedimento idêntico ao deste estudo,



com a finalidade de ilustrar, no referido equipamento, as mesmas circunstâncias nas quais os experimentos transcorreram.



**Figura 1.** Equipamentos controladores das caixas de esquia ativa. Abaixo, em detalhe, rato em procedimento experimental em uma caixa de esquia.

### 4.3.2 Gaiolas grandes enriquecidas

As gaiolas grandes enriquecidas foram construídas para proporcionar aos animais, além do conforto e condições sanitárias adequadas, um ambiente que estimulasse um dos comportamentos naturais de sua espécie, qual seja: o da territorialidade. Este comportamento consiste de confrontações entre os animais, representando uma situação de estresse social, bastante apropriada para a presente investigação (STEFANSKI, 1997).

As gaiolas são compostas por oito módulos metálicos, idênticos, cada um medindo 78 X 65 X 40 cm, contendo em seu interior duas rampas, três abrigos, um comedouro, um bebedouro, e um brinquedo (tubo-cotovelo metálico).

Para reproduzirmos experimentalmente as condições do estresse social, foi importante manter animais *naive* (8 casais) nos módulos, para que estes escolhessem e estabelecessem seus territórios nas gaiolas; assim, todos os módulos foram interligados por rampas, passagens e tubulações em PVC. A Figura 2 mostra os módulos e seus dispositivos para água e comida, além dos componentes de estimulação para a locomoção, exploração e abrigo (rampas, tubos, conexões, cilindros metálicos, etc.) os

quais também estão melhor detalhados em uma ilustração maior de um dos módulos da gaiola grande enriquecida.



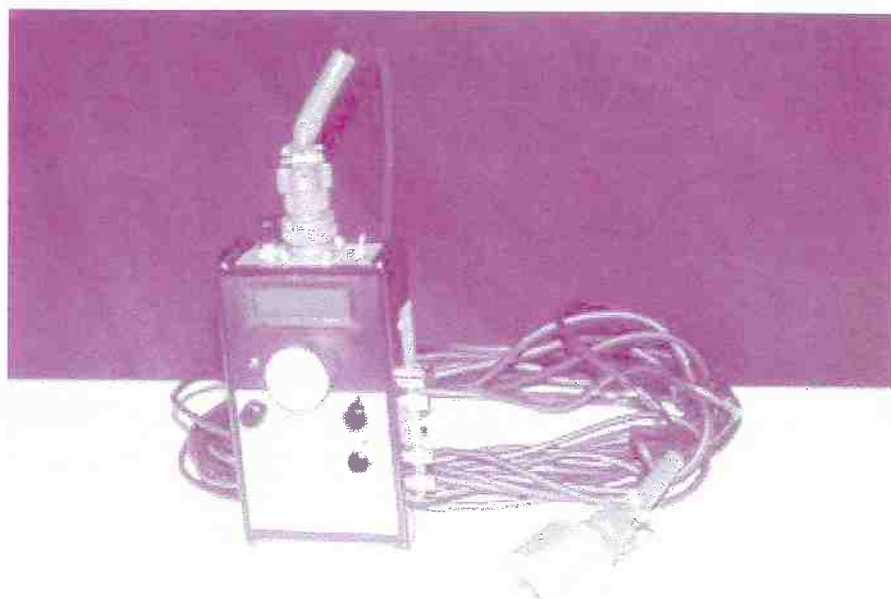
**Figura 2.** Módulos das gaiolas grandes enriquecidas, conectadas, para o uso no estresse social. À direita, vista frontal de um dos oito módulos das gaiolas grande.

### 4.3.3 Microfone captador de vocalizações ultrassônicas

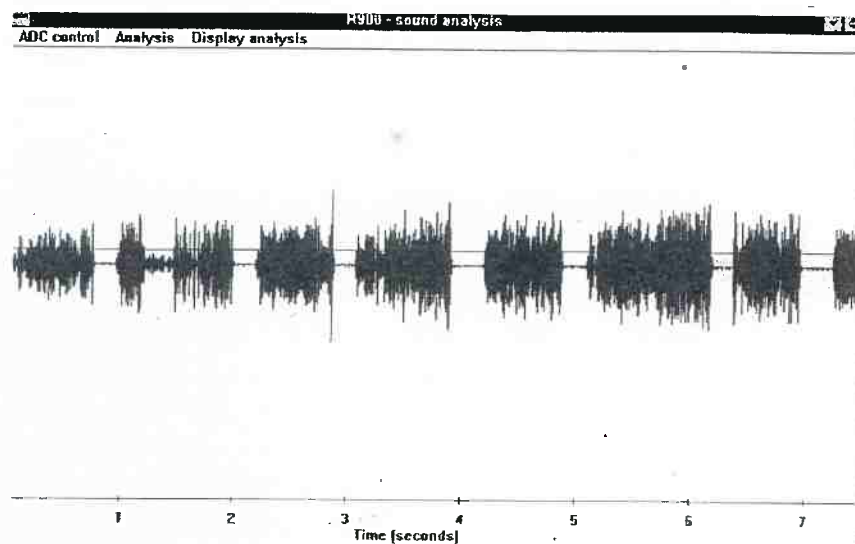
Afim de monitorar emissões de VU's, em decorrência do estado de ansiedade e estresse, foi utilizado o aparelho D 940 *Ultrasound Detector*, da empresa Petterson Elektronik AB (Holanda). O equipamento, um detector de vocalização ultrassônica, esteve conectado a um computador do tipo PC, que registrou a frequência e a intensidade das VU's emitidas pelos animais.

A Figura 3 mostra o equipamento completo, detalhando o microfone captador (à direita) e o amplificador, o qual foi programado para filtrar as VU's, selecionando e coletando VU's de 35 dB, na faixa de 20 a 35 kHz, considerada como típica de ansiedade e de estresse.

O equipamento ainda permitia a transformação das vocalizações em sinais sonoros (audíveis por fone de ouvido) e sinais visíveis (através da tela de um computador), podendo, estes últimos, serem vistos na figura 4. O mesmo computador controlava a duração da sessão de gravação das VU's, a frequência e a amplitude, através do uso do software (R900 *Petterson Electroniks* (Holanda).



**Figura 3.** Equipamento detector de vocalizações ultrassônicas, utilizado nos módulos das gaiolas grandes enriquecidas conectadas e nas caixas de esquiva ativa.



**Figura 4.** Registro e visualização, na tela do computador, de vocalizações ultrassônicas ocorridas durante estresse.

#### 4.3.4 Aparelhos para a Avaliação da mecânica pulmonar e dos níveis de óxido nítrico

A responsividade do sistema respiratório foi verificada através do desafio antigênico por inalação de OVA. A pressão da câmara foi medida por um transdutor (modelo TRD 5700) conectado a módulos de amplificação (modelo CHA 0150, EUA) e analisada por um Sistema de *software* BioSystem XA (modelo SFT 1810, EUA). O ar exalado pelos ratos foi armazenado em balões de coleta e analisados em no máximo 12 horas através do aparelho *Nitric Oxide Analyser* (modelo NOA 280, Sievers®, EUA).

As Figuras 4 e 5 mostraram, respectivamente, os aparelhos utilizados na avaliação da mecânica pulmonar e na mensuração do NO presente no ar exalado dos animais. Na Figura 4 os equipamentos estão dispostos da mesma forma como estiveram durante o procedimento experimental de ventilação mecânica pulmonar, detalhando, inclusive, o balão estéril inflado com o ar exalado do animal, o qual foi conectado e exaurido no aparelho de análise, ilustrado na Figura 5.



**Figura 5.** Sistema de coleta, análise e determinação dos índices de função pulmonar (elastância e resistência do sistema respiratório). Notar o balão de coleta do ar exalado dos ratos, contendo NO.



**Figura 6.** Aparelho de análise do ar exalado contendo NO, coletado durante o procedimento de avaliação da mecânica pulmonar.

## 4.4 Metodologias

### 4.4.1 Depleção de neurocininas.

Foi realizada no 2º dia de vida, mediante injeção i.p. de capsaicina (50 mg/kg), na concentração de 50 mg/ml, diluída em 10% de etanol e 10% de tween 80 em solução de NaCl 0,9%. Ratos do grupo controle receberam somente o veículo da capsaicina.

### 4.4.2 Protocolo de inflamação alérgica pulmonar

Os procedimentos de Sensibilização e desafio foram realizados de acordo com Coleman *et al.*, (1983). Cada rato foi ativamente sensibilizado por uma injeção i.p. de 0,66 ml contendo uma suspensão de 15 µg de OVA [Grau II - albumina de ovo - SIGMA] acrescidos de 300 mg de hidróxido de alumínio [Al(OH<sub>3</sub>)] em 0,9% (wt/vol) de cloreto de sódio. Este foi considerado o dia 0 de sensibilização. Sete dias após, os animais foram submetidos ao reforço antigênico, injetados subcutaneamente com dose e concentrações idênticas as da sensibilização de OVA + Al(OH<sub>3</sub>). O Hidróxido de Alumínio foi acrescido por atuar como adjuvante, favorecendo a produção de IgE específica à OVA (MACQUEEN *et al.*, 1989).



O desafio com OVA foi feito individualmente; para tanto, os animais já completamente anestesiados, foram traqueostomizados. Através de uma cânula de poliuretano e de um inalador (modelo S3; Inalamax NS Indústria de Aparelhos Médicos, Brasil) era gerada uma névoa de aerosol, contendo uma solução de OVA (10%) em salina, bombeada através do sistema de entrada de um aparelho para ventilação pulmonar artificial para animais de pequeno porte (item 4.3.4).

#### **4.4.3 Modelos de estresse**

##### **4.4.3.1 Estresse em esquiiva ativa**

A estimulação aversiva nas patas (por envio de corrente elétrica às mesmas) é um conhecido modelo indutor de ansiedade e estresse. Este estímulo foi utilizado como sugerido por De Vry *et al.*, (1993), com modificações. Os animais foram colocados individualmente dentro da caixa de esquiiva ativa, onde permaneceram por 3 minutos para habituarem-se ao ambiente, podendo caminhar livremente pelos dois lados da esquiiva. Após este período, um estímulo sonoro (campainha) era acionado por dois segundos, sendo seguido pela estimulação aversiva.

Este esquema foi repetido 50 vezes, totalizando um total de permanência na caixa de esquiiva de aproximadamente 30 minutos,

dependendo da performance do animal, nas fugas e esquivas, programadas para intervalos de 28 segundos entre cada tentativa. Este esquema foi seguido diariamente até o 13º dia.

Em todas as tentativas, a resposta esperada (a de passar para o outro lado da caixa), durante o aviso sonoro, cancelava a liberação de choque e interrompia o estímulo sonoro. A passagem para o outro lado durante a liberação da estimulação elétrica, também interrompia a estimulação aversiva. Por razões óbvias de segurança, ao tempo máximo de 5 segundos a estimulação era interrompida automaticamente.

Observou-se que após poucas sessões os animais já esquivavam-se da maioria das estimulações aversivas. Este procedimento de esquiva em que há um aviso sonoro, denominado estímulo discriminatório, fornece altos níveis de aquisição e manutenção de respostas esperadas neste modelo de condicionamento (MILLENSON e LESLIE, 1979).

Os ratos dos grupos de animais não submetidos a estresse (controle para o estresse) eram submetidos ao mesmo esquema na caixa de esquiva, sem receber a estimulação aversiva.

#### 4.4.3.2 Estresse social em gaiola grande enriquecida

Os animais a serem submetidos ao estresse social foram colocados individualmente nas gaiolas grande enriquecidas, conforme o modelo desenvolvido por Stefanski (1997) com algumas modificações.

Em resumo, o procedimento consiste em manter oito casais de ratos *naive* dentro da Gaiola Grande, pelo tempo necessário para que seja estabelecido o comportamento de territorialidade, o que coincide com o aparecimento das ninhadas e representa o momento em que a "hierarquia" entre os ratos foi estabelecida. Os machos que se tornam dominantes, geralmente os maiores, são denominados na literatura como residentes, e mantêm parte da Gaiola Grande como seu território e o defendem dos outros ratos. Ratos nunca antes colocados neste ambiente, quando são introduzidos são considerados pelos ratos residentes como "intrusos". Como o efeito do estresse se faz mais acentuado nos intrusos, estes foram os animais estudados no presente trabalho.

Assim sendo, 24 horas após a sensibilização, os grupos de ratos intrusos, doravante denominados grupos Estresse, foram divididos igualmente e aleatoriamente em quatro subgrupos, de acordo com o tempo de exposição à estimulação estressante:

Subgrupo Controle – cada rato foi colocado individualmente na gaiola grande enriquecida vazia;

Subgrupo estresse social agudo – cada rato foi colocado individualmente na gaiola grande enriquecida pelo período de 2h;

Subgrupo estresse social prolongado 1 – cada rato foi colocado individualmente na gaiola grande enriquecida pelo período de 48h;

Subgrupo estresse social prolongado 2 – cada rato foi colocado individualmente na gaiola grande enriquecida pelo período de 14d.

Nenhum dos animais apresentou comportamentos violentos ou que pusessem em risco sua integridade física durante o experimento.

#### 4.4.4 Avaliação de parâmetros da emocionalidade

Composta pela análise de vocalizações ultrassônicas. O registro da VU é um conhecido modelo de avaliação do estado emocional de ratos, sendo expresso em situações de ansiedade e estresse acentuados (DE VRY *et al.*, 1993). Este parâmetro comportamental consiste de muitas chamadas curtas, homogeneamente distribuídas ao longo das sessões nas esquivas ativas (MICZEK *et al.*, 1991), bem como pelos machos intrusos, em sinal de submissão aos ratos residentes dominantes.

Para efetuar o presente estudo, o microfone (descrito no item 4.3.3) foi erguido sobre o módulo, em sua lateral, a fim de aproximar-se o máximo possível dos animais em confrontação social, sem interferir com seus comportamentos, mas de forma tal a captar as VU's que os ratos intrusos emitiriam para os ratos residentes, de acordo com o modelo proposto por Stefanski (1997) com algumas modificações.

O aparelho também esteve ligado durante cada sessão de estresse na esquiva ativa, tendo sido conectado à tampa superior da mesma.

Em ambas situações, as gravações foram feitas entre 8:00h e 12:00h.

#### **4.4.5 Avaliação da mecânica pulmonar.**

Respeitando-se o rodízio entre animais dos diferentes grupos, todos os animais foram anestesiados profundamente através de uma injeção i.p. de Pentobarbital Sódico (50 mg/kg). Cada animal era conduzido a uma sala onde eram feitos os procedimentos cirúrgicos. Foi feita uma abertura de cerca de 1 centímetro de diâmetro no pescoço de cada rato, com vistas a devulsionar o tecido e expor parte da traquéia, na qual foram inseridos cerca de 7 mm de uma cânula de polietileno, de 3 mm de diâmetro.

Esta cânula era conectada a uma bifurcação, do mesmo material que, por sua vez, estava conectada ao aparelho de ventilação (item 4.3.4). Este aparelho regulava a entrada e saída de ar, pelos pulmões dos animais e, por estar acoplado a um transdutor de sinais, registrava e calculava os índices de elastância e resistência do sistema respiratório dos mesmos. Logo após a tomada dessas medidas antes dos desafios antigênicos (medida basal), a conexão de saída do aparelho de ventilação pulmonar era temporariamente desconectada, sendo ligada a um balão especial para coleta de ar, a partir do qual foram medidos os níveis de NO basal.

Depois de reconectada a cânula de saída no aparelho de ventilação, sua entrada era ligada ao aparelho de inalação, através do qual se nebulizava a solução salina controle ou de OVA (10%) por 60 segundos,

configurando-se no desafio antigênico, conforme item 4.4.2. Imediatamente após o desafio, trocavam-se as conexões e esperavam-se alguns segundos (limpeza do sistema) para coletar os índices de elastância e resistência do sistema respiratório novamente.

Decorridos 5 minutos, contados a partir do desafio antigênico, foram feitas as mesmas reconexões desta feita para inflar os balões com o ar exalado dos animais após o desafio, contendo NO.

Terminados estes procedimentos, era feita uma abertura na cavidade abdominal dos animais, sendo estes sacrificados por exsanguinação.

#### **4.4.6 Avaliação da concentração de amônia.**

A concentração de amônia foi determinada mediante a utilização de um kit comercial (Matheson® – 8014KA, NL, EUA). Este kit é composto por uma bomba de sucção manual de 100ml de ar, acoplada a um tubo de dosagem contendo reagentes - em forma de grânulos - específicos para a amônia. O tubo era descartável e possuía em seu exterior uma escala de valores em partes por milhão (ppm).

Em sua utilização, o ar é succionado pela bomba e passa pelo tubo de dosagem; devido ao contato da amônia com os reagentes químicos existentes no interior do tubo ocorre alteração da cor dos grânulos, que passam da cor rosa inicial para a cor amarela. Quanto maior a concentração da amônia no ambiente, onde o aparelho foi utilizado, maior serão as escalas de preenchimento com a coloração amarela.



## **4.5 Delineamento experimental**

### **4.5.1 Experimento 1. Estudo dos efeitos do estresse social agudo (2 horas), prolongado<sup>1</sup> (48 horas) e prolongado<sup>2</sup> (14 dias) sobre a resposta comportamental de ratos sensibilizados com OVA.**

Após um período de adaptação de 14 dias, 32 ratos foram divididos ao acaso, em quatro grupos conforme segue:

#### **Grupo Controle\***

8 animais foram injetados i.p. com Solução controle(1,0 mg/Kg). Decorridas 24 horas, os animais foram apenas mantidos na gaiola grande enriquecida vazia, conforme Item 4.4.3.2 (grupo Controle).

#### **Grupo EA\***

8 ratos foram injetados i.p. com OVA, conforme item 4.4.2. Decorridas 24 horas, os animais foram submetidos ao estresse agudo, por duas horas na gaiola grande enriquecida, conforme Item 4.4.3.2 (grupo EA2h).

#### **Grupo EP1\***

8 ratos foram injetados i.p. com OVA, conforme item 4.4.2. Decorridas 24 horas, os animais foram submetidos ao estresse prolongado por 48 horas na gaiola grande enriquecida, conforme Item 4.4.3.2 (grupo EP48h).

### **Grupo EP2\***

8 ratos foram injetados i.p. com OVA, conforme item 4.4.2. Decorridas 24 horas, os animais foram submetidos ao estresse prolongado por 14 dias na gaiola grande enriquecida, conforme Item 4.4.3.2 (EP14d).

\* Durante os dez minutos do estresse social nas gaiolas grandes enriquecidas, foi feito o registro das VU's emitidas pelos ratos, conforme descrito no item 4.4.4.

### **4.5.2 Experimento 2. Estudo da resposta inflamatória alérgica pulmonar de ratos submetidos a um modelo de estresse prolongado (14 dias).**

Após um período de adaptação de 14 dias, 31 ratos foram divididos ao acaso, em quatro grupos conforme segue:

### **Grupo Sal-C\***

6 animais foram sensibilizados (dia 0) com Solução controle(1,0 mg/Kg). Por 14 dias, foram apenas colocados na gaiola grande enriquecida vazia\*. No 14º dia foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos, destinados a avaliar a mecânica pulmonar antes e após o desafio com Solução controle, bem como coletar o ar exalado dos animais, contendo NO, conforme descrito no item 4.4.5.

**Grupo OA-C\***

8 animais foram sensibilizados (dia 0) com OVA, conforme item 4.4.2. Por 14 dias, foram apenas colocados na gaiola grande enriquecida vazia\*. No 14<sup>o</sup> dia foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos, destinados a avaliar a mecânica pulmonar antes e após o desafio com OVA, bem como coletar o ar exalado dos animais, contendo NO, conforme descrito no item 4.4.5.

**Grupo Sal-EP\***

7 animais foram sensibilizados (dia 0) com Solução controle(1,0 mg/Kg). Por 14 dias, foram submetidos ao estresse prolongado na gaiola grande enriquecida\*. No 14<sup>o</sup> dia foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos, destinados a avaliar a mecânica pulmonar antes e após o desafio com Solução controle, bem como coletar o NO, conforme descrito no item 4.4.5.

**Grupo OA-EP\***

10 animais foram sensibilizados (dia 0) com OVA, conforme item 4.4.2. Por 14 dias, foram submetidos ao estresse prolongado na gaiola grande enriquecida\*. No 14<sup>o</sup> dia foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos, destinados a avaliar a mecânica pulmonar antes e após o desafio com OVA e coletar o ar exalado dos animais, contendo NO, conforme descrito no item 4.4.5.

\* Durante os dez minutos do estresse social nas gaiolas grandes enriquecidas, foi feito o registro das VU's emitidas pelos ratos, conforme descrito no item 4.4.4.

### **4.5.3 Experimento 3. Estudo dos efeitos do tratamento neonatal com capsaicina, sobre a resposta inflamatória de origem alérgica pulmonar em ratos submetidos ao estresse em caixa de esquiva ativa.**

Aos 2 (dois) dias de idade, 31 ratos foram tratados neonatalmente com capsaicina, conforme assinalado no item 4.4.1 e, aos 90 dias de idade foram divididos ao acaso, em quatro grupos conforme segue:

#### **Grupo C-Sal-C\***

7 animais foram sensibilizados i.p. com Solução controle(1,0 mg/Kg) (dia 0). A partir do dia 1, foram colocados na caixa de esquiva\*\* ativa apenas para ouvir a campainha (som discriminatório).

#### **Grupo C-OA-C\***

9 animais foram sensibilizados i.p. com OVA, conforme item 4.4.2 (dia 0). A partir do dia 1, foram colocados na caixa de esquiva\*\* apenas para ouvir a campainha (som discriminatório).

#### **Grupo C-Sal-EC\***

7 animais foram sensibilizados i.p. com Solução controle(1,0 mg/Kg) (dia 0). A partir do dia 1, foram submetidos ao estresse na esquiva ativa\*\*, conforme descrito no item 4.4.3.1.

### **Grupo C-OA-EC\***

8 animais foram sensibilizados i.p. com OVA, conforme item 4.4.2 (dia 0). A partir do dia 1, foram submetidos ao estresse na esquiva ativa\*\*, conforme descrito no item 4.4.3.1.

\* No 14<sup>o</sup> dia foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos, destinados a avaliar a mecânica pulmonar antes e após o desafio com OVA e coletar o ar exalado dos animais, contendo NO, conforme descrito no item 4.4.5.

\*\* Durante os dez minutos do estresse social nas esquivas ativas, foi feito o registro das VU's emitidas pelos ratos, conforme descrito no item 4.4.4.

#### 4.6 Análise estatística.

Para a análise estatística dos dados experimentais foi inicialmente aplicado o teste de *Bartlett* (JOHNSON e LEONE, 1997), para verificar se os mesmos apresentam ou não uma distribuição normal, ou seja, determinar se os dados eram paramétricos ou não-paramétricos. Para a análise dos dados paramétricos foi empregado o teste "t" de Student ou, quando de comparações múltiplas entre grupos, ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer. Nos casos de dados não paramétricos, utilizou-se o teste "U" de Mann-Whitney ou a análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunnett, para a determinação das possíveis diferenças entre os grupos.

Os dados da Vocalização Ultrassônica foram transformados em porcentagens e analisados pelo Teste Exato de Fisher.

Em todos os cálculos estatísticos foi utilizado o *software Graphpad InStat* (versão 3.06; 2003) para verificação de possíveis diferenças entre os grupos. O nível de significância a ser adotado foi de 5%, ou seja, a probabilidade  $P < 0,05$  foi considerada capaz de revelar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

## **5 RESULTADOS**

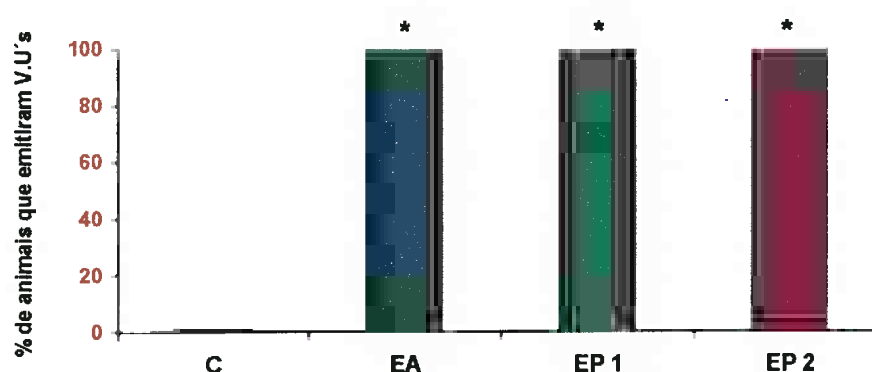
## **Experimento 1**

**Efeitos do estresse social sobre a vocalização ultrassônica  
de ratos sensibilizados com OVA.**



### 5.1 Experimento 1. Estudo dos efeitos do estresse social sobre a vocalização ultrassônica de ratos sensibilizados com OVA.

Conforme mostra a Figura 7, todos os animais submetidos ao estresse social exibiram o comportamento de VU, o qual foi detectado nas ocasiões de confrontação, nas quais possivelmente os ratos intrusos emitiram o aviso ultrassônico em resposta aos estímulos advindos do rato residente, daquele território.



**Figura 7.** Efeitos do estresse social agudo (2 horas), do estresse prolongado<sup>1</sup> (48 horas) e do estresse prolongado<sup>2</sup> (14 dias) sobre a porcentagem de detecção das vocalizações ultrassônicas de ratos sensibilizados com OVA, detectadas durante o estresse social na gaiola grande enriquecida.

Estão ilustradas as médias por grupo.

Teste Exato de Fisher. N=8

\*P<0,0001 em relação ao grupo Controle.

## **Experimento 2**

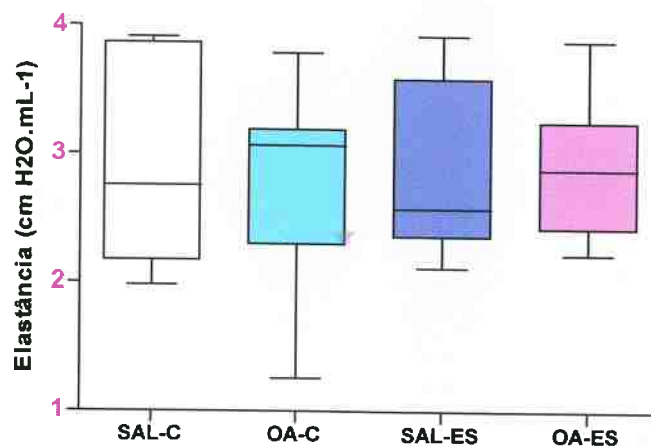
**Estudo da resposta inflamatória alérgica pulmonar de ratos submetidos a um modelo de estresse prolongado (14 dias).**

## **5.2 Experimento 2. Estudo dos efeitos do estresse social sobre a vocalização ultrassônica de ratos sensibilizados com OVA.**

Todos os ratos sensibilizados com OVA e submetidos ao estresse prolongado (14 dias) reagiram ao estímulo estressante emitindo vocalizações ultrassônicas detectadas durante o estresse social na gaiola grande enriquecida (dados não mostrados).

### 5.2.1 Efeitos de um modelo de estresse social sobre os valores basais da elastância do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA.

Conforme ilustra a Figura 8, não houve diferença significativa entre os valores basais da elastância do sistema respiratório entre os animais de todos os grupos, demonstrando este fato que a sensibilização *per se* não produziu alterações perceptíveis na função pulmonar basal, sobretudo nas vias aéreas distais.



**Figura 8.** Efeitos de um modelo de estresse social sobre os valores basais da elastância do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA.

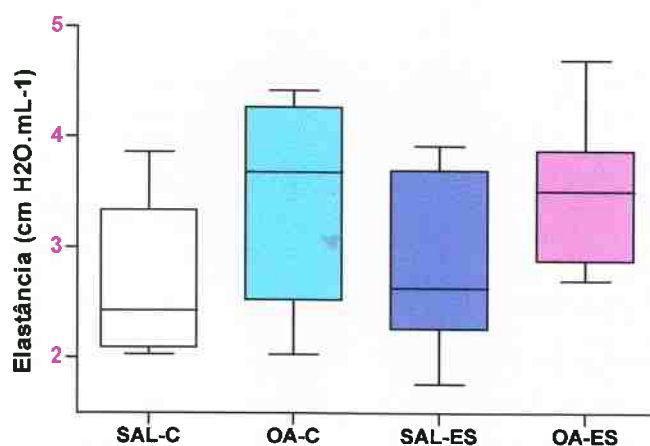
Estão ilustrados a mediana e os percentis dos grupos.

Anova não paramétrica, Kruskal Wallis,  $n = 6 - 10$

$P = 0,9713$

### 5.2.2 Efeitos de um modelo de estresse social sobre os valores máximos da elastância do sistema respiratório de ratos sensibilizados e desafiados com OVA.

Conforme ilustra a Figura 9, não houve diferença significativa entre os valores máximos da elastância do sistema respiratório, demonstrando que o modelo de estresse social não produziu alterações suficientes para afetar a função pulmonar, sobretudo nas porções distais das vias aéreas dos animais.

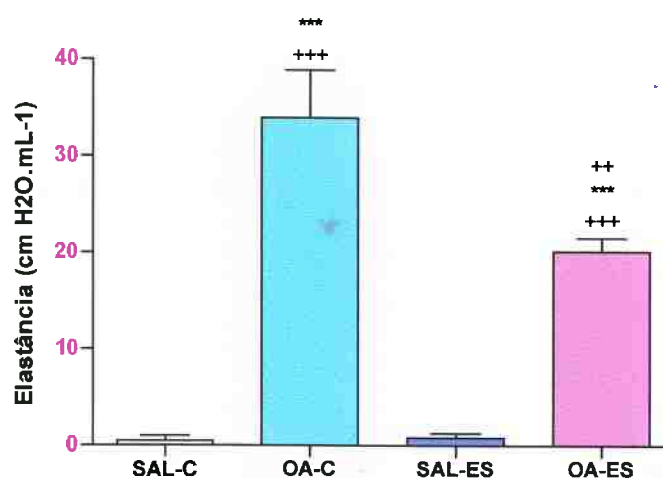


**Figura 9.** Efeitos de um modelo de estresse social sobre os valores máximos da elastância do sistema respiratório de ratos sensibilizados e desafiados com OVA.

Estão ilustrados a mediana e os percentis dos grupos.  
Anova não paramétrica. Kruskal Wallis, N = 6 - 10  
P = 0,0567

### 5.2.3 Efeitos de um modelo de estresse social sobre o percentual de aumento da elastância do sistema respiratório de ratos sensibilizados e desafiados com OVA.

Conforme ilustra a Figura 10, houve diferença significativa entre os percentuais de aumento da elastância do sistema respiratório, demonstrando este fato que o modelo de sensibilização ao antígeno produziu alterações suficientes para afetar a função pulmonar, sobretudo nas vias distais, quando comparados os percentuais de aumento entre os grupos sensibilizados e não sensibilizados. O modelo de estresse social atenuou este percentual de aumento.



**Figura 10.** Efeitos de um modelo de estresse social sobre os percentuais de aumento da elastância do sistema respiratório sensibilizados e desafiados com OVA.

Anova Paramétrica. Teste de Tukey-Kramer; N = 6 - 10;  
Estão ilustrados a média e o erro padrão dos grupos.

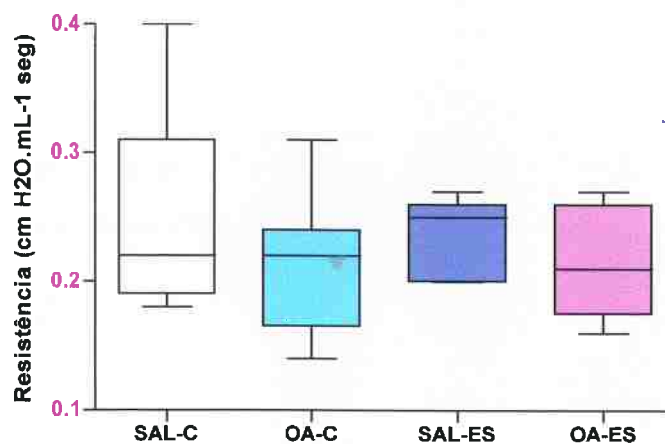
\*\* P < 0,01, em relação a OA-C,

\*\*\* P < 0,001, em relação a SAL-C,

+++ P < 0,001 em relação a SAL-ES.

#### 5.2.4 Efeitos de um modelo de estresse sobre os índices de resistência basal do sistema respiratório do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA.

Conforme ilustra a Figura 11, não houve diferença significativa entre os índices de resistência basal do sistema respiratório, demonstrando que a sensibilização *per se* não produziu alterações perceptíveis na função pulmonar basal, sobretudo nas vias aéreas proximais.

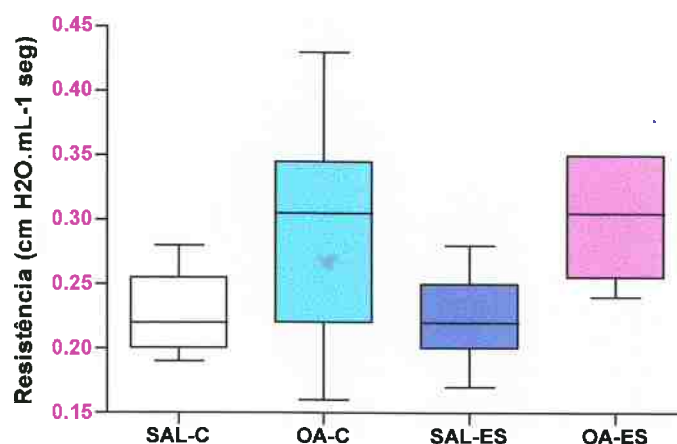


**Figura 11.** Efeitos de um modelo de estresse sobre os índices de resistência basal do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA.

Estão ilustrados a mediana e os percentis dos grupos.  
Anova não paramétrica, Krauskal Wallis, N = 6 – 10  
P = 0,603

### 5.2.5 Efeitos de um modelo de estresse social sobre os valores de resposta máxima na resistência do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA.

Conforme ilustra a Figura 12, houve diferença significativa entre os valores de resposta máxima na resistência do sistema respiratório, demonstrando que o modelo de estresse social produziu alterações suficientes para afetar a função pulmonar, sobretudo nas porções proximais das vias aéreas dos animais.



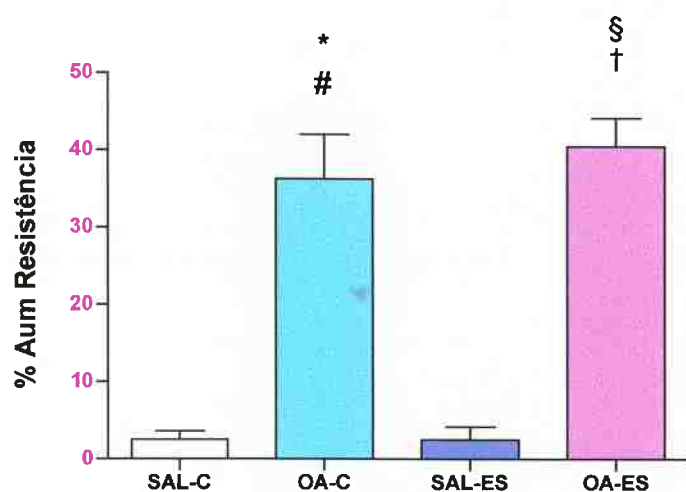
**Figura 12.** Efeitos de um modelo de estresse social sobre os valores de resposta máxima na resistência do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA.

Estão ilustrados a mediana e os percentis dos grupos.  
Anova não paramétrica, Kruskal Wallis, N = 6 - 10  
P = 0,07



### 5.2.6 Efeitos de um modelo de estresse social sobre os percentuais de aumento da resistência do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA.

Conforme ilustra a Figura 13, houve diferença significativa entre os percentuais de aumento nos valores de resposta máxima da resistência do sistema respiratório, demonstrando que o modelo de sensibilização ao antígeno produziu alterações suficientes para afetar a função pulmonar, sobretudo nas vias proximais, quando comparados os percentuais de aumento entre os grupos sensibilizados e não sensibilizados. O modelo de estresse social não atenuou este percentual de aumento.



**Figura 13.** Efeitos de um modelo de estresse social sobre os percentuais de aumento nos índices de resistência do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA.

Anova Paramétrica. Teste de Tukey-Kramer; N = 6 - 10;  
Estão ilustrados a média e o erro padrão dos grupos.

\* P < 0,001 em relação ao grupo SAL-C

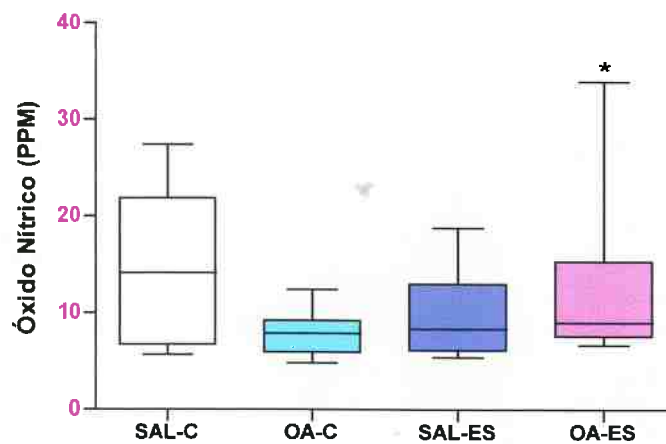
# P < 0,001 em relação ao grupo SAL-EP

§ P < 0,001 em relação ao grupo SAL-C

† P < 0,001 em relação ao grupo SAL-EP

### 5.2.7 Efeitos de um modelo de estresse social sobre os índices de NO pulmonar basal do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA.

Conforme ilustra a Figura 14, houve diferença significativa entre os valores basais de NO encontrado no ar exalado dos animais, demonstrando que a sensibilização *per se* e/ou o estresse social poderiam ter produzido alterações perceptíveis através da liberação desse gás.



**Figura 14.** Efeitos de um modelo de estresse social sobre os índices de NO pulmonar basal do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA.

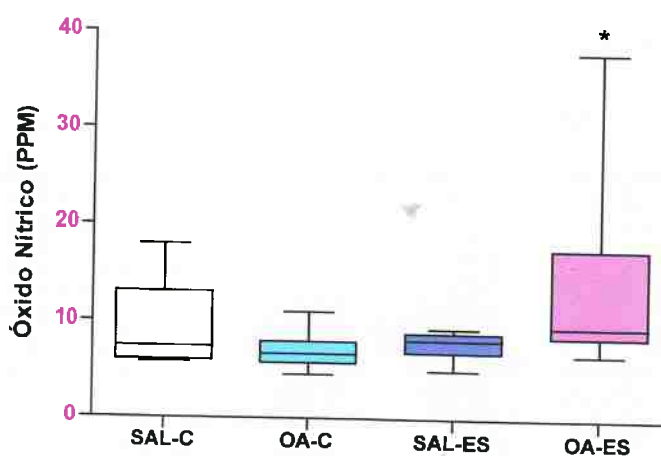
Estão ilustrados a mediana e os percentis dos grupos.

Anova não paramétrica, Kruskal Wallis, N = 6 – 10

\* P < 0,05 em relação ao grupo OA-C

### 5.2.8 Efeitos de um modelo de estresse social sobre os valores máximos de NO do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA.

Conforme ilustra a Figura 15, houve diferença significativa entre os valores máximos de NO encontrados no ar exalado dos animais, demonstrando que a sensibilização e o desafio ao antígeno *per se* produziram alterações suficientes para afetar a produção desse gás, comparando-se os grupos de ratos não sensibilizados e o grupo de ratos sensibilizados e desafiados, não estressados.



**Figura 15.** Efeitos de um modelo de estresse social sobre os valores máximos de NO do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA.

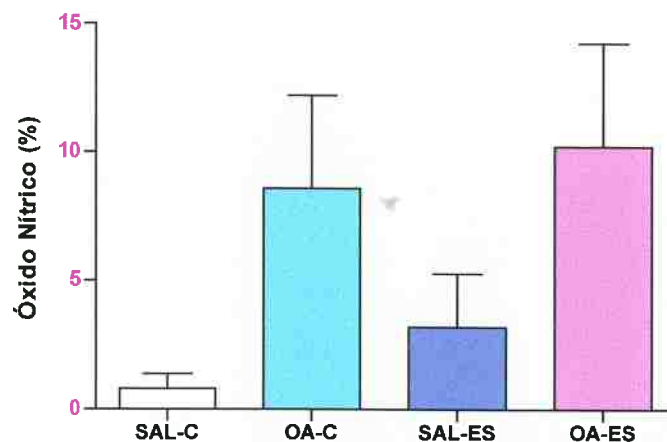
Estão ilustrados a mediana e os percentis dos grupos.

Anova não paramétrica, Kruskal Wallis, N = 6 - 10

\* P < 0,05 em relação ao grupo SAL-C

**5.2.9** Efeitos de um modelo de estresse social sobre o percentual de aumento dos níveis de NO pulmonar do sistema respiratório de ratos sensibilizados e desafiados com OVA.

Conforme ilustra a Figura 16, não houve diferença significativa entre os percentuais de aumento nos valores de NO, encontrado no ar exalado dos animais, demonstrando que o modelo de sensibilização ao antígeno não produziu alterações suficientes para afetar a produção desse gás.



**Figura 16.** Efeitos de um modelo de estresse sobre o percentual de aumento dos níveis de NO do sistema respiratório de ratos sensibilizados e desafiados com OVA.

Anova Paramétrica. Teste de Tukey-Kramer; N = 6 - 10;  
Estão ilustrados a média e o erro padrão dos grupos.  
P = 0,232

## **Experimento 3**

**Estudo da resposta inflamatória alérgica pulmonar de ratos tratados neonatalmente com capsaicina e submetidos a um modelo de estresse prolongado por choques (14 dias).**

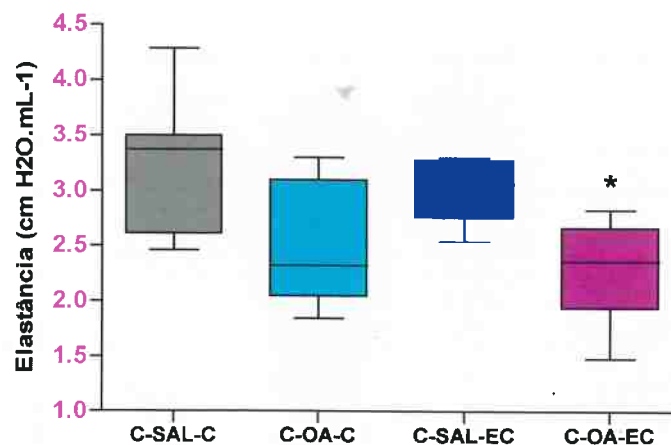
### **5.3 Experimento 3. Estudo da resposta inflamatória alérgica pulmonar de ratos tratados neonatalmente com capsaicina e submetidos a um modelo de estresse prolongado por choques (14 dias).**

Todos os ratos submetidos ao estresse na esQUIVA ativa emitiram vocalização ultrassônica durante os 28 segundos em que duraram os intervalos entre um estímulo elétrico e outro, em todos os 14 dias em que os animais foram colocados no aparelho. Além disso, os animais reagiram ao estímulo estressante emitindo VU's inclusive durante os 3 primeiros minutos de adaptação ao aparelho de esQUIVA, antes dos estímulos auditivo e elétrico serem liberados. Os animais dos grupos não submetidos aos estímulos elétricos não emitiram vocalização ultrassônica em nenhuma circunstância experimental (dados não mostrados).

### 5.3.1 Efeitos de um modelo de estresse em esquiva ativa sobre os valores basais da elastância do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina.

Conforme ilustra a Figura 17, houve diferença significativa entre os valores basais da elastância do sistema respiratório, comparando-se os grupos de animais não sensibilizados e o grupo sensibilizado, não estressado, demonstrando que a sensibilização *per se* não produziu alterações perceptíveis na função pulmonar basal, sobretudo nas vias aéreas distais.

Todavia, os valores basais da elastância do sistema respiratório dos animais do grupo sensibilizado e submetido ao estresse por choques foram menores que os dos demais grupos demonstrando este achado que o modelo de estresse pode ter exercido influência sobre a função pulmonar, sobretudo nas vias aéreas distais.



**Figura 17.** Efeitos de um modelo de estresse em esquiva ativa sobre os valores basais da elastância do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina.

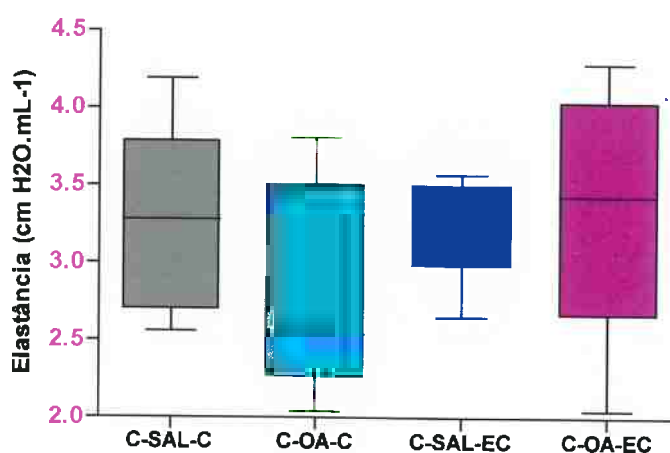
Estão ilustrados a mediana e os percentis dos grupos.

Anova não Paramétrica. Kruskal-Wallis; N = 7 - 9;

\* P < 0,05 em relação ao grupo C-SAL-C,

**5.3.2** Efeitos de um modelo de estresse em esquiva ativa sobre os valores máximos da elastância do sistema respiratório de ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina.

Conforme ilustra a Figura 18, não houve diferença significativa entre os valores máximos da elastância do sistema respiratório, demonstrando que o modelo de estresse em esquiva ativa não produziu alterações suficientes para afetar a função pulmonar, sobretudo nas porções distais das vias aéreas dos animais.



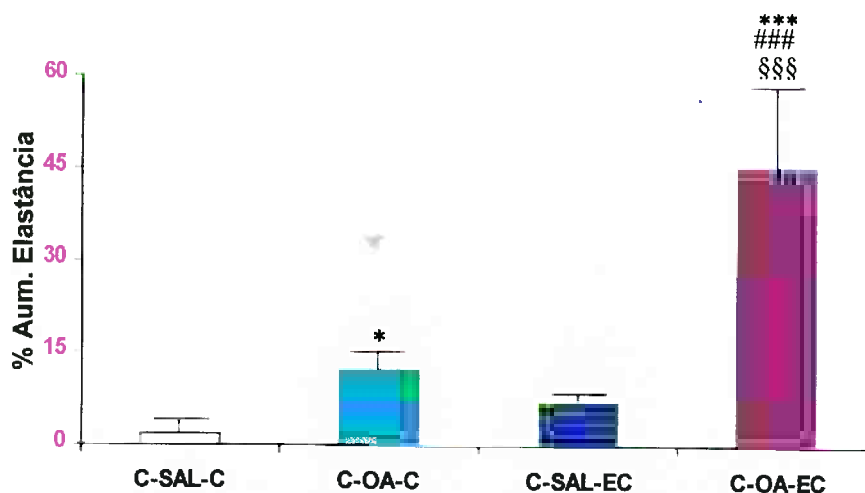
**Figura 18.** Efeitos de um modelo de estresse em esquiva ativa sobre valores máximos da elastância do sistema respiratório de ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina.

Estão ilustrados a mediana e os percentis dos grupos.  
Anova não paramétrica. Kruskal Wallis,  $N = 7 - 9$   
 $P = 0,339$



### 5.3.3 Efeitos de um modelo de estresse em esquiva ativa sobre o percentual de aumento da elastância do sistema respiratório de ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina.

Observamos, na Figura 19, que houve elevação nos percentuais de aumento da elastância do sistema respiratório dos animais submetidos ao desafio antigênico com a OVA, demonstrando que o modelo de sensibilização ao antígeno produziu alterações suficientes para afetar a função pulmonar, sobretudo nas vias distais, quando comparados os percentuais de aumento entre os grupos sensibilizados e não sensibilizados. O modelo de estresse em esquiva ativa não atenuou este percentual de aumento.



**Figura 19.** Efeitos de um modelo de estresse em esquiva ativa sobre os percentuais de aumento da elastância do sistema respiratório de ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina.

Anova Paramétrica. Teste de Tukey-Kramer; N = 7 - 9;  
Estão ilustrados a média e o erro padrão dos grupos.

\* P < 0,05, em relação a C-SAL-C,

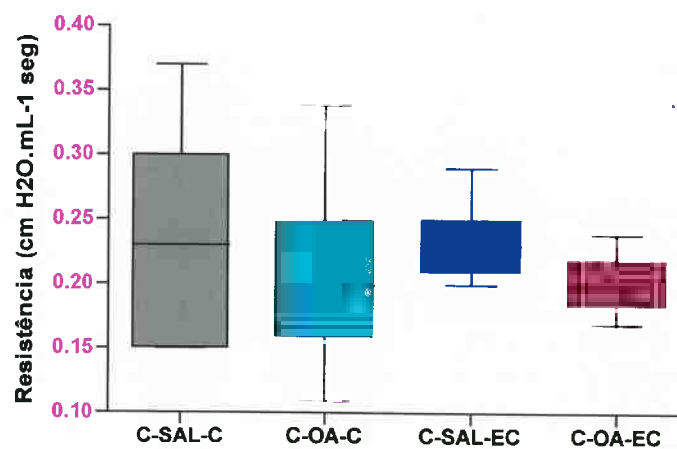
\*\*\* P < 0,001, em relação a C-SAL-C,

### P < 0,001 em relação a C-OA-C,

§§§ P < 0,001, em relação a C-SAL-EC.

**5.3.4** Efeitos de um modelo de estresse em esquiva ativa sobre os índices de resistência basal do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina.

Conforme ilustra a Figura 20, não houve diferença significativa entre os índices de resistência basal do sistema respiratório, demonstrando que a sensibilização *per se* não produziu alterações perceptíveis na função pulmonar basal, sobretudo nas vias aéreas proximais.

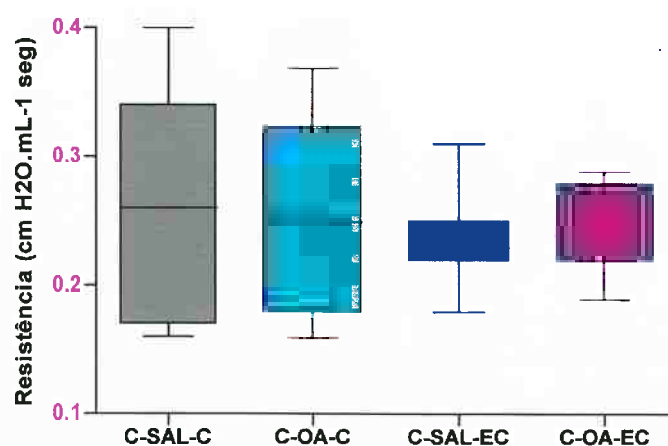


**Figura 20.** Efeitos de um modelo de estresse em esquiva ativa sobre os índices de resistência basal do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina.

Estão ilustrados a mediana e os percentis dos grupos.  
Anova não paramétrica, Kruskal Wallis, N = 7 – 9  
P = 0,582

**5.3.5** Efeitos de um modelo de estresse em esquiva ativa sobre os valores máximos de resistência do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina.

Através da Figura 21 verifica-se que não houve diferença nos valores máximos de resistência do sistema respiratório em ratos sensibilizados e desafiados com OVA, independente de serem submetidos ao estresse na esquiva ativa.

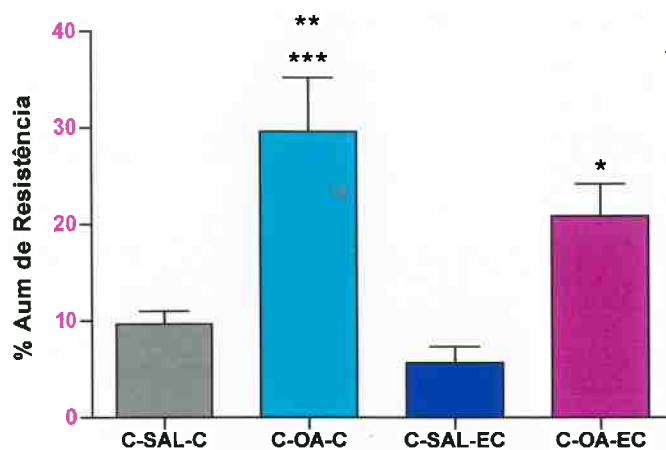


**Figura 21.** Efeitos de um modelo de estresse em esquiva ativa sobre os valores máximos de resistência do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina.

Estão ilustrados a mediana e os percentis dos grupos.  
Anova não paramétrica, Kruskal Wallis, N = 7 – 9  
P = 0,986

### 5.3.6 Efeitos de um modelo de estresse em esquiva ativa sobre o percentual de aumento na resistência do sistema respiratório de ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina.

Conforme ilustra a Figura 22, houve elevação nos percentuais de aumento dos valores de resistência do sistema respiratório dos animais submetidos à sensibilização e ao desafio com OVA, demonstrando que o modelo de sensibilização ao antígeno produziu alterações suficientes para afetar a função pulmonar, sobretudo nas vias proximais, quando comparados os percentuais de aumento entre os grupos sensibilizados e não sensibilizados. O modelo de estresse em esquiva ativa atenuou este percentual de aumento.



**Figura 22.** Efeitos de um modelo de estresse em esquiva ativa sobre os percentuais de aumento na resistência do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina.

Anova Paramétrica. Teste de Tukey-Kramer; N = 7 - 9;  
Estão ilustrados a média e o erro padrão dos grupos.

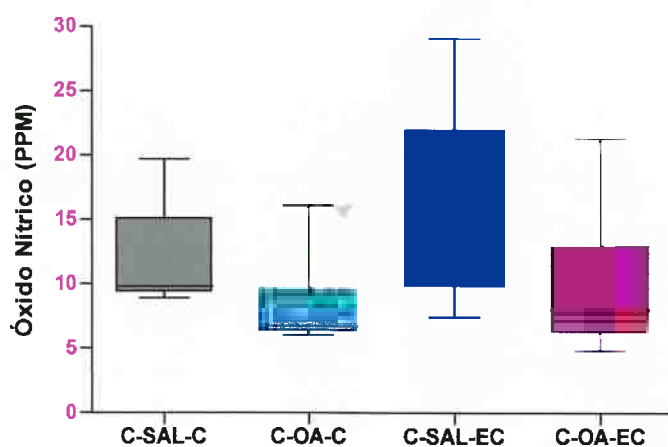
\* P < 0,05, em relação a C-SAL-EC,

\*\* P < 0,01, em relação a C-SAL-C,

\*\*\* P < 0,001, em relação a C-SAL-EC.

**5.3.7** Efeitos de um modelo de estresse em esquiva ativa sobre os índices de NO basal do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina.

Conforme ilustra a Figura 23, não houve diferença significativa entre os valores basais de NO presente no ar exalado dos animais, demonstrando este achado que a sensibilização *per se* não produziu alterações perceptíveis através da liberação desse gás, sobretudo nos animais submetidos ao estresse em esquiva ativa.

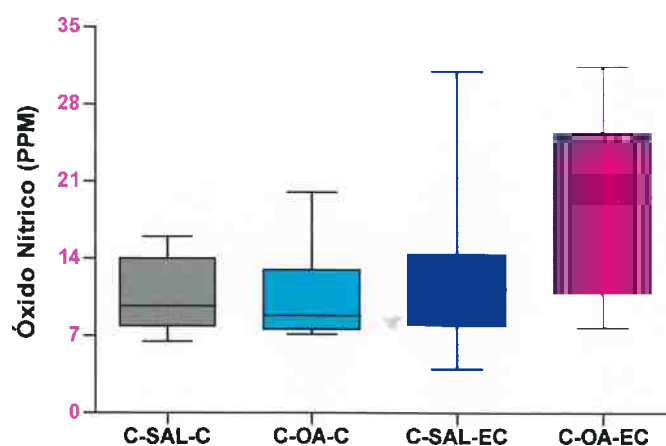


**Figura 23.** Efeitos de um modelo de estresse em esquiva ativa sobre os índices de NO basal do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina.

Estão ilustrados a mediana e os percentis dos grupos.  
Anova não paramétrica, Kruskal Wallis,  $n = 7 - 9$   
 $P = 0,1482$ .

**5.3.8** Efeitos de um modelo de Estresse sobre os valores máximos de NO do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina.

Através da Figura 24 observa-se que não foram verificadas diferenças significativas entre os valores máximos de NO, presente no ar exalado dos animais após o desafio antigênico, comparando-se os animais de todos os grupos do presente estudo.

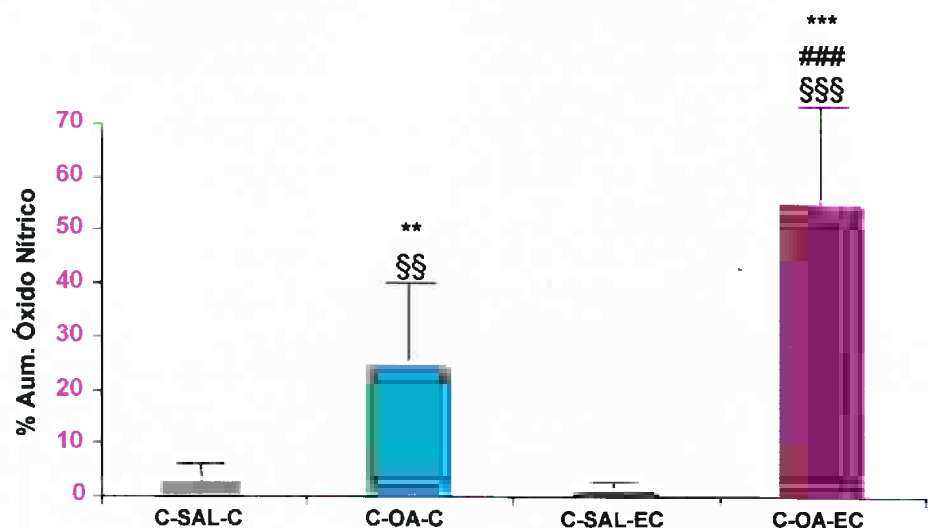


**Figura 24.** Efeitos de um modelo de estresse sobre os valores máximos de NO do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina.

Estão ilustrados a mediana e os percentis dos grupos.  
Anova não paramétrica, Kruskal Wallis, N = 7 – 9  
P = 0,270

### 5.3.9 Efeitos de um modelo de Estresse sobre o percentual de aumento no NO do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina.

Através da Figura 25 observa-se que houve diferença significativa entre os percentuais de aumento dos índices de NO presente no ar exalado dos animais, nos quais o estresse, em animais sensibilizados amplificou a resposta inflamatória após o desafio, comparando-se aos percentuais de aumento dos animais sensibilizados e desafiados com a OVA, mas não estressados.



**Figura 25.** Efeitos de um modelo de estresse em esquiva ativa sobre os percentuais de aumento nos índices de NO do sistema respiratório de ratos sensibilizados com OVA, tratados neonatalmente com capsaicina.

Estão ilustrados a média e o desvio padrão dos grupos.

Anova paramétrica, Teste de Tukey-Kramer, n = 7-9

\*\* P < 0,01 em relação ao grupo C-SAL-C,

§§ P < P 0,01 em relação ao grupo C-SAL-EC

\*\*\* P < 0,001 em relação ao grupo C-SAL-C

+++ < P 0,001 em relação ao grupo C-SAL-EC

§§§ p < P 0,00 em relação ao grupo C-OA-C

## **6 DISCUSSÃO**



Os presentes resultados demonstram que 1 – ratos estressados por confrontação social, reagem a este estresse exibindo o comportamento de VU; que este comportamento ocorre em todos os animais submetidos a este modelo de estresse e não é registrado em nenhum dos animais do grupo controle, não submetidos a estresse; 2 – a sensibilização com OVA determina uma reação diante da reexposição a este antígeno (desafio) por via inalatória, na qual observa-se aumento nos valores de elastância e resistência do sistema respiratório; 3 – quando animais sensibilizados e desafiados com OVA são também submetidos ao estresse por confrontação social prolongado, apresentam uma diminuição da elastância, mas não da resistência do sistema respiratório; 4 – Ratos submetidos à sensibilização com a OVA e submetidos ao estresse social prolongado, apresentam maiores concentrações de NO, presente no ar exalado antes e após o desafio antigênico; 5 – o tratamento neonatal com capsaicina não interfere com a emissão de VU's induzida pelo estresse em aparelho de esquiva em ratos; 6 – o estresse em aparelho de esquiva tem características psicológicas que são aprendidas pelo animal; 7 – o tratamento neonatal com capsaicina reduz os valores basais da elastância do sistema respiratório em ratos adultos, sensibilizados com a OVA e submetidos ao estresse em esquiva, antes do desafio antigênico; 8 – o tratamento neonatal com capsaicina não interfere com os valores máximos da elastância do sistema respiratório, em resposta ao desafio antigênico com OVA em ratos adultos sensibilizados e estressados; 9 - o aumento da elastância do sistema respiratório é amplificado nos animais submetidos ao estresse em esquiva;

10 – O tratamento com capsaicina e a sensibilização com OVA determinam atenuação nos percentuais de aumento dos valores de resistência do sistema respiratório, em animais estressados em esquiva ativa; 11 – O tratamento com capsaicina e o estresse em esquiva ativa determinam aumento nas concentrações de NO basais; 12 – o tratamento com capsaicina aumenta os valores de NO, após o desafio antigênico; 13 - os percentuais de aumento nos valores de NO são maiores nos animais estressados.

Estes resultados, tomados em seu conjunto permitem sugerir, em um primeiro momento, que o estresse - induzido experimentalmente - tenha a capacidade de modificar parâmetros de uma inflamação alérgica pulmonar, determinada ou induzida por um modelo de sensibilização e reexposição a uma substância antigênica. Sugerem também, um envolvimento de fibras nervosas do sistema NANC.

Ressalte-se, inicialmente, que considerou-se cuidadosamente no presente trabalho a escolha dos modelos experimentais de estresse, de forma tal que os estímulos aplicados não fossem letais nem lesivos aos animais, mas que pudessem fornecer evidências observáveis de que esta variável, de fato implica em eventos psico-fisiológicos, que exercem considerável influência sobre aspectos da saúde, tanto dos animais como do homem. Assim, pode-se concluir, pela análise dos dados do primeiro experimento, que o modelo de estresse por confrontação social agora usado

foi, de fato, ansiogênico e estressante, uma vez que apenas os animais submetidos a este tipo de situação, emitiram os comportamentos típicos desta condição e agora registrados.

Diversas espécies de animais dispõem de estruturas vocais que as habilitam a emitir ruídos. Entretanto, alguns destes ruídos são compostos por ondas sonoras, as quais, devido à frequência e amplitude específicas, não são perceptíveis pelo homem (SALES e PYE, 1974). Esta produção sonora, denominada "vocalização ultrassônica" (VU) acompanha desde o nascimento alguns roedores e, em especial, os ratos. Filhotes destas espécies, quando afastados da mãe, respondem ao estresse desta separação emitindo um chamado com características individuais, o qual é reconhecido pela respectiva mãe (ALLIN e BANKS, 1972; NOIROT, 1972). Quando adultos, os ratos - no caso, os machos - também emitem VU's sob outras circunstâncias, como é o caso, por exemplo, das VU's observadas durante o período pós-ejaculatório, no acasalamento (BARFIELD e GEYER, 1975, THOMAS *et al.*, 1982a, WHITE e BARFIELD, 1990).

No presente estudo, foi importante registrar a ocorrência de VU's devido ao modelo de estresse social empregado. Neste modelo, a colocação de um rato diante de um outro, da mesma espécie e gênero, mas mantido previamente no ambiente, fez com que um deles emitisse as VU's. De acordo com dados da literatura (STEFANSKI, 1997), o rato anteriormente colocado no ambiente (rato "residente") seria o animal responsável pela

situação de estresse e, conseqüentemente, pela estimulação das VU's emitidas pelos ratos intrusos. Assim, a detecção destas VU's observada no presente trabalho na gaiola grande enriquecida seria explicada, ao menos em termos comportamentais, pela presença de um estresse, resultante, neste caso, da confrontação de um rato territorialmente dominante, com um rato que teria "invadido" seu território.

A vocalização ultrassônica que costuma ser observada no estresse social tem sido apontada como um comportamento que é tipicamente executado por um rato macho, em sinal de submissão a outro rato macho, previamente ambientado, inclusive posicionado na hierarquia social como dominante.

É oportuno lembrar que as dimensões e condições do ambiente experimental poderiam ser importantes para o estabelecimento do comportamento territorial. Por conta disto, o tamanho e as características dos módulos das gaiolas grandes enriquecidas empregadas procuraram criar as condições necessárias ao estabelecimento deste comportamento territorial. No presente experimento, foram observados comportamentos que permitiram identificar os ratos que seriam os possíveis animais dominantes na gaiola grande enriquecida, visto que estes exibiram comportamentos típicos de defesa territorial. Além disso, os ratos dominantes da gaiola grande enriquecida mostraram tendência para apresentar pesos corporais maiores, sendo que esta diferença não foi observada nos animais mantidos

nas gaiolas padrão (de moradia); os ratos mantidos nestas gaiolas eram menores e mais leves do que os dominantes da gaiola grande enriquecida e iguais em peso aos não dominantes desta. Estes dados corroboram com os resultados obtidos por ADAMS e BOICE, 1989 sobre estas características corporais e ratos dominantes.

Durante os embates resultantes da confrontação social na gaiola grande enriquecida, ambos os ratos posicionavam-se sobre as patas traseiras (posição de "boxear", ou em pé). De acordo com a literatura (VIVIAN e MICZEK, 1993), observa-se com freqüência a presença de vocalização ultrassônica nestes momentos de embate (TAKEUCHI e KAWASHIMA, 1986), fato que contribuiu para o uso deste parâmetro para a avaliação comportamental feita neste estudo.

De fato, como já salientado, as VU's têm sido consideradas relevantes para caracterizar o estado emocional dos animais durante o modelo de estresse social (VIVIAN e MICZEK, 1999).

Foi interessante notar uma diferenciação nos comportamentos e na postura corporal dos animais, comparando-se os ratos dominantes da gaiola grande enriquecida com os ratos intrusos das gaiolas padrão comuns (de moradia). Esta distinção pôde ser feita através de inspeção visual e sem muita dificuldade. Conforme esperado, os ratos intrusos, que eram menores e desconhecedores do ambiente, arquejavam mais o corpo em sinal de

submissão. Tal postura é relevante no contexto do presente trabalho, uma vez que, de acordo com Olivier (1998) esta é a postura corporal em que o rato permanece ao emitir VU's, as quais são importantes neste tipo de comunicação social. Para estas e outras informações relevantes acerca dos comportamentos e posturas corporais que acompanham as VU's em ratos, ver (VIVIAN e MICZEK, 1993).

A despeito das evidências e dados da literatura, uma questão a ser levantada e considerada no presente contexto é: qual rato seria o emissor das VU's? De acordo com a literatura, e mediante técnicas cirúrgicas foi possível remover as estruturas vocais dos ratos e, desta forma, identificar quais deles – os ratos dominantes ou os intrusos - vocalizavam. A este respeito, Thomas *et al.*, (1982b) confirmaram serem os intrusos os responsáveis pelo comportamento. Esta técnica invasiva teria sido a única capaz de assegurar a autoria da vocalização ultrassônica captada no presente experimento, ou seja: de caracterizar se este comportamento seria emitido pelo rato macho invasor ou pelo macho residente.

Entretanto, e conforme os objetivos do presente trabalho, não foram feitas duplicatas dos presentes resultados com grupos de animais "desvocalizados", a fim de identificá-los de forma mais segura. De fato, esta decisão implicaria não só em custos e tempo para desenvolvimento de técnicas cirúrgicas delicadas, mas também representaria um procedimento invasivo, que de *per se* poderia afetar os animais, representando, no

mínimo, um estresse a mais. Complementariamente, nestes animais poderiam ser observadas, inclusive, alterações na resposta à estimulação antigênica, as quais poderiam comprometer os resultados das avaliações da mecânica respiratória, uma vez que os animais teriam sido submetidos a mais de um procedimento experimental.

Cabe aqui registrar a ocorrência, durante os embates, de vocalizações não ultrassônicas, as quais podiam ser ouvidas na forma de guinchados, emitidos por ambos os ratos, principalmente quando estes estavam apoiados sobre as patas traseiras.

Outro dado a ser considerado é o fato de que, durante estes embates, os ratos "intrusos", assumiam posição corporal muito semelhante àquela em que ficam os ratos submetidos a uma situação de estresse em um aparelho de esquiva ativa, nos momentos em que são registradas VU's, conforme pode ser verificado no presente experimento e também nos trabalhos por nós publicados, e que estão anexos a esta tese (PORTELA *et al.*, 2001, 2002).

Estas constatações, resultantes da aplicação do modelo experimental de confrontação social, mostram-se relevantes, uma vez que corroboram com os resultados obtidos por Tornatzky e Miczek (1995); além disso, é bastante plausível supor que a estimulação utilizada no presente estudo teria induzido ansiedade e estresse de forma similar àquela que supostamente

ocorre na espécie humana, onde em certas ocasiões, uma determinada pessoa precisa deparar-se com alguma outra pessoa, supostamente controladora e dominadora, capaz de infligir este tipo de estresse, por vezes incontrolável e constante. Evidentemente, no entanto, que ao fazer tal assertiva, resvalamos por terrenos da antropomorfização; as similaridades, porém, são interessantes e merecem consideração, pois este tipo de “ansiedade” gerada em humanos sabidamente interfere com a homeostase do sistema imunológico (ADER e COHEN, 1993, MILLER, 1998).

No que concerne às variáveis “psico-emocionais” associadas ao estresse/ansiedade, o fato de o animal poder exercer controle sobre elas, constitui fator preponderante sobre as conseqüências psico-fisiológicas do organismo. De fato, considerando-se este ponto de vista, um grande número de estudos demonstraram que animais que não tinham a possibilidade de controlar os estímulos estressores aos quais foram submetidos, apresentaram respostas imunológicas interessantes, tais como: um maior crescimento tumoral e maior número de tumores, bem como maior número e maior intensidade de úlceras gástricas, comparados aos que podiam controlar os estímulos estressantes (PALERMO-NETO *et al.*, 2003; MORGULIS *et al.*, 2004).

Uma vez que, neste modelo experimental, o estresse é fortemente determinado pela posição hierárquica na escala social, foram feitas diversas observações comportamentais dos ratos. Assim, ao acompanhar os animais



durante sua adaptação ao território, alguns machos e fêmeas separam-se dos demais, como que "optando" pelos módulos superiores da gaiola grande enriquecida, onde aparentemente firmaram seu território.

De fato, os módulos superiores (último andar) da gaiola grande enriquecida apresentaram-se sempre mais limpos e com quantidade maior de água e de comida que os demais módulos, no decorrer do período experimental, demonstrando que por alguma razão a maioria dos ratos não puderam ou não preferiram permanecer e utilizar os recursos alimentares dos módulos superiores.

Em adição a estes dados, através destas observações e, em virtude das marcas de identificação que existiam naqueles animais, verificou-se que a maioria dos ratos machos e fêmeas permanecia nos módulos intermediários (segundo e terceiro "andares") enquanto que poucos ficavam nos módulos mais baixos do "térreo".

Cabe lembrar, que embora a quantidade de ratos colocada inicialmente em cada módulo tenha sido a mesma (um macho por módulo), após 5 dias era possível verificar uma quantidade maior de ratos, permanecendo nos módulos dos segundo e terceiros "andares"; estes ratos, inclusive, identificados depois através de suas marcas, apresentaram peso final tendendo para valores inferiores aos dos que ficavam nos andares mais altos.

Todavia, a decisão dos ratos menores por permanecer em módulos afastados dos ratos maiores pareceu ser, no presente trabalho, decorrente de uma decisão por um local no qual estes animais (menores/não dominantes) podiam afastar-se da permanência junto aos ratos maiores (dominantes) e, por tanto, evitariam a situação que os estava submetendo ao estresse social. Estes dados ganham respaldo se considerarmos o conhecido fato de que o peso e o tamanho maiores, nos ratos machos, determinam sua posição como dominantes, na hierarquia social destes roedores.

Em contrapartida, nos últimos módulos da gaiola grande enriquecida - os ainda mais baixos e mais escuros - sempre houve pouco número de ratos. Neles, a inspeção visual não revelou sinais da existência de ninhos. Entretanto, na limpeza desses módulos, foram constatadas maiores concentrações de bolos fecais, restos de alimentos e urina, misturado à palha existente no piso dos módulos (maravalha), como se aquele local tivesse sido eleito como a região destinada às excreções e materiais descartados pelos ratos. Estes registros são importantes nestes e em outros estudos, nos quais o estresse resultante da inalação de partículas ou gases provenientes de urina e fezes em decomposição, bem como da ação de microorganismos presentes nestes materiais, poderia alterar os comportamentos dos animais. Neste sentido, o possível acúmulo de agentes patógenos como micoplasmas nestes locais, poderia afetar a função e a integridade do aparelho respiratório dos animais ali residentes (GAMBLE e

CLOUGH, 1976) e, até mesmo, dos usuários de biotérios (HUNSKAAR e FOSSE, 1993).

Em última análise, estes dados sugerem que os ratos desenvolvem, naturalmente, comportamentos que preservam higienicamente seu ambiente, ao manterem favoráveis às condições do local em que costumam se alimentar e dormir.

É prudente frisar, neste momento, o fato de que os odores do ambiente poderiam constituir importante informação sensorial para os machos, durante o comportamento de territorialidade. Assim, optou-se por manter inalteradas as características do ambiente tanto quanto possível; foram feitas, por esta razão, poucas trocas do material de forragem (maravalha) do piso da gaiola grande enriquecida. Apesar disso, através de coletas e análises com aparelho específico, verificou-se que os índices de amônia permaneceram pelo menos dez vezes inferiores aos encontrados em gaiolas do tipo padrão, quando estas permaneceram quatro ou cinco dias sem a troca da maravalha (dados não mostrados).

A amônia é resultado da decomposição da urina, cuja elevação da concentração, conforme comentado anteriormente, tem sido correlacionada a irritação e patologias do aparelho respiratório (BRODESON, 1976; SHOEB, 1982). Assim sendo, outros estudos envolvendo ambientes alternativos - como esta gaiola grande enriquecida - poderiam contribuir

tanto no que diz respeito à salubridade dos biotérios como também para um uso mais racional e econômico de recursos alocados na rotina de manutenção e limpeza dos mesmos (SCHARMANN, 1991; SCHMORROW e ULRICH, 1991). Em adição a estes fatos, vários grupos de pesquisadores têm defendido a idéia de que o bem estar do animal de laboratório implica favoravelmente, inclusive, na qualidade dos dados obtidos nos experimentos (ANZALDO *et al.*, 1994; CHMIEL e NOONAN, 1996). Neste sentido, o uso de gaiolas grandes enriquecidas têm sido citado por estes pesquisadores, que sugerem, até mesmo, que neste tipo de ambiente o animal tem estimulação física e psicológica semelhantes às que ocorrem sob condições naturais (BRAIN *et al.*, 1993; HAEMINSH *et al.*, 1994).

Tanto os ratos machos quanto as fêmeas, de maneira, geral parecem ter se adaptado ao ambiente, proporcionado pela gaiola grande. Foram colocadas pequenas caixas plásticas com maravalha, dentro de cada um dos módulos, com a finalidade de servirem como ninhos. Entretanto e, surpreendentemente, nenhuma fêmea manteve sua ninhada nestas caixas. Ao invés disto, os ninhos foram montados pelos animais, num reduzido espaço localizado próximo à parede dos módulos intermediários, ou aqueles do segundo e do terceiro andar, junto a um cilindro metálico, colocado em cada módulo, com o propósito de servir como "brinquedo" ou esconderijo para os animais. Neste local pouco acessível, com espaço e dimensões suficientes apenas para um rato adulto, os ninhos foram construídos com maravalha e com vários *pellets* (cilindros de ração prensada) que serviram

de "tijolos", constituindo verdadeiras barreiras na entrada dos mesmos. Além disso, até mesmo nos espaços existentes entre os *pellets*, foi depositada boa quantidade de maravalha, de maneira que o interior do ninho ficou quase totalmente protegido da ação de correntes de ar e de animais intrusos ou indesejáveis.

Estas constatações, em seu conjunto, sugerem que os ratos estariam exibindo comportamentos típicos daqueles que os membros de sua espécie desempenham na natureza, em condições selvagens. Tais dados confirmaram outros achados da literatura sobre esta parte do repertório comportamental maternal dos roedores e, em especial, nos ratos, nas quais verifica-se o cuidado da mãe na construção e manutenção dos ninhos, incluindo-se aqui a preservação da temperatura e outros cuidados e suprimentos à ninhada, como citado por Palermo-Neto *et al.* (1994) e por Bridges e Ronsheim, 1990).

Um outro aspecto a ser considerado é o fato de que os animais de laboratório, em condições naturais, interagem socialmente. Por conta disso, faz parte do seu repertório comportamental deparar-se, desde o nascimento, com a mãe, os irmãos e mais tarde com outros adultos, em suas disputas territoriais.

De fato, durante as colocações dos intrusos no território dos residentes, foram constatados os comportamentos de levantar, boxear e

emitir vocalizações audíveis, ou seja, sem auxílio de aparelhos. Entretanto, a VU detectada por ocasião da colocação dos ratos intrusos dentro da gaiola, poderia ter ocorrido como resposta ou sinal de submissão, diante de um rato dominante, o que teria respaldo na literatura. De fato, Corrigan e Flannelly (1979); Thomas *et al.* (1983) e posteriormente Miczec *et al.* (1991) também determinaram, que os intrusos são os responsáveis pela VU.

Por outro lado, se esta resposta ocorreu em virtude da estimulação aversiva, conforme verificado em animais estressados em um aparelho de esQUIVA ativa, seria prudente considerarmos o estabelecimento de uma resposta emocional condicionada, já que significaria que uma estimulação ambiental prévia e, portanto aprendida, teve um significado emocional bastante intenso para o animal. Neste caso específico, o próprio comportamento instintivo do animal, e não lembranças de fatos recém vividos, explicaria a emissão das VU's na gaiola grande enriquecida. Mesmo assim, em termos etológicos, havia, na presente situação experimental, todo um conjunto de estímulos ambientais que poderiam corroborar para que os ratos os relacionassem a um "instinto coletivo", sinalizando assim para aqueles animais que a sua entrada representava uma "invasão" em território ocupado. De fato, entre estes possíveis estímulos sinalizadores ambientais poderiam estar as fêmeas e suas ninhadas, a maravalha com urina, dejetos e demarcações do macho residente, e, por último, outros machos também próximos do local, junto com seus odores e demarcações.

Entretanto e, no contexto da presente discussão, verificou-se que experiências prévias ao estresse são capazes de desencadear - em ratos - respostas condicionadas nas quais registram-se VU's, quando estes roedores são novamente submetidos ao estresse. Thomas *et al.* (1983), reexpôs, ao mesmo ambiente, ratos que foram previamente submetidos ao estresse da presença de um gato. O autor constatou que aqueles ratos emitiram a VU ao serem colocados no ambiente onde ocorreu o estresse, mesmo sem o predador e sem o odor do mesmo. Este fato sugeriu que a VU naquele ambiente pudesse ter sido decorrente de uma resposta emocional condicionada, devido à associação ao estresse da presença do predador.

No presente experimento os animais das gaiolas padrão foram colocados na gaiola grande enriquecida, para a confrontação social, por diferentes períodos de tempo. Assim, o estresse dos animais por 2 horas foi considerado agudo, enquanto que o mesmo estímulo, com duração de 48 horas ou de 14 dias foi considerado prolongado. Estes períodos foram determinados a partir dos trabalhos de Stefanski e Engler (1998) e, poderiam implicar em respostas comportamentais diferenciadas.

Observou-se, porém, que não houve variação na intensidade, quantidade ou qualidade das emissões de VU's, a despeito dos diferentes períodos de estresse. Em função disto e, apesar de haverem sido relatadas diferenças do quadro imune/celular de ratos expostos a esta situação por diferentes períodos (Stefanski e Engler, 1998) optou-se por estudar os

parâmetros de imunidade nos animais mantidos na gaiola grande enriquecida pelo período prolongado de 14 dias, visto que em trabalhos anteriores utilizamos este mesmo período para a avaliação de parâmetros inflamatórios alérgicos pulmonares, uma vez que o período de sensibilização com OVA compreende a 14 dias (PORTELA *et al.*, 2001, 2002).

Em relação aos dados correspondentes aos parâmetros inflamatórios estudados, verificou-se que a sensibilização com o antígeno OVA, acrescida do reforço, após sete dias, determinou uma alteração nos parâmetros de função pulmonar, após o desafio antigênico realizado por via inalatória, no 14<sup>o</sup> dia. Estes dados replicaram uma considerável quantidade de estudos desenvolvidos em vários laboratórios desta universidade e de outras instituições, que fazem uso deste modelo de sensibilização e desafio antigênicos em estudos de processos alérgicos e inflamatórios, que afetam tanto o trato gastrintestinal (BASSO *et al.*, 2001, 2003, 2004) quanto o sistema respiratório (HACZKU *et al.*, 1995a; PORTELA *et al.*, 2001, 2002; LIGEIRO *et al.*, 2004; COSTA-PINTO *et al.*, 2004).

Cabe lembrar, inicialmente, que a resposta inflamatória pulmonar, induzida pelo modelo experimental utilizado neste trabalho, é decorrente da reexposição à OVA de animais sensibilizados com OVA. De acordo com a literatura, esta observação experimental é explicada, inicialmente, pelo fato de que, quando o organismo entra em contato com um determinado antígeno, conseqüentemente ocorre a ativação de células T, células estas



de grande importância em diversos processos alérgicos (HACZKU *et al.*, 1995b), incluindo-se aqui aqueles que envolvem o trato respiratório. Segundo Holgate (1999), as células T, após o estímulo decorrente do contato antigênico, produzem um conjunto restrito de citocinas, codificadas em um pequeno cluster do braço longo do cromossomo 5, bandas 31-33, cluster do gene para a IL-4. Especificamente, foi relatado que estas e outras citocinas, consideradas pró-alérgicas, são produzidas por um subtipo de células T, do tipo auxiliares (helper) conhecidas como Th2, ao passo que um outro subtipo de células T helper, o Th1, atuam contrabalanceando a resposta alérgica, favorecendo respostas inflamatórias não associadas diretamente a quadros alérgicos (WILDER, 1995). A este respeito, é conhecido que numa inflamação alérgica pulmonar, mediada por Ig's da classe "E" (IgE), o balanço entre as citocinas Th1/Th2 regula a resposta de migração celular ao foco inflamatório após o desafio antigênico (MAES *et al.* 1999; MOSMANN *et al.* 1996).

Neste contexto, Laitinen *et al.*, (1993) descreveu em pacientes com asma moderada, um aumento no número de linfócitos na mucosa da parede do sistema respiratório. Esses linfócitos, descritos em seres humanos, eram principalmente do tipo T (CD4+), que localizavam-se próximos aos sítios de ligação e ativação destas células; neste sentido, o aumento do número destes linfócitos foi positivamente correlacionado à severidade do quadro da asma dos pacientes (ROBINSON *et al.*, 1993).

O aumento no número de linfócitos na região peribronquial das vias aéreas de ratos OVA-sensibilizados e desafiados foi também apontado em ratos, como por exemplo, nos estudos conduzidos em nossos laboratórios (PORTELA, 2001, 2002); verificamos também nestes trabalhos que o estresse foi o agente favorecedor da resposta inflamatória pulmonar observada nestes parâmetros, o que sugeriu que outras substâncias inibidas ou estimuladas de forma diferente nos animais estressados estariam atuando na função pulmonar dos animais, determinando uma potenciação dos resultados registrados.

Neste sentido, Stefanski e Engler (1998) observaram efeitos diferenciais relacionados à população de linfócitos T CD4 e CD8 em ratos expostos à confrontação social por diferentes períodos. Assim, mostraram que enquanto uma situação de confrontação social aguda (2 horas) produziu aumento no número de linfócitos T CD4 e CD8 nos animais intrusos, uma situação estressante por 7 dias resultava em decréscimo do número destas células, fato por eles atribuídos à redistribuição celular.

De fato, uma análise da resposta inflamatória alérgica sobre a função do aparelho respiratório pode ser verificada através de diferentes parâmetros. Dentre eles, ressalta, para efeito desta discussão, aqueles relacionados à "mecânica" do aparelho respiratório. Esta variável pode ser estudada por dados relacionados à pressão intra-traqueal, inferida pelo volume e fluxo do ar que segue pela luz das vias aéreas dos animais, os

quais, como nós, dependem da hematose por difusão, para realizarem a troca gasosa pulmonar de CO<sub>2</sub> por O<sub>2</sub>, vital ao organismo. Assim, a determinação do volume e fluxo correntes do ar que preenche os pulmões fornece dados que foram relacionados à função pulmonar, permitindo a análise dos mesmos inferir alterações no fechamento das vias aéreas, ocorrência comum à asma e aos modelos de inflamação alérgica pulmonar em animais de laboratório. A análise destas variáveis seria, portanto, marcadora da responsividade do sistema respiratório (MARTINS 1991a, 1993).

A responsividade do sistema respiratório foi analisada no presente trabalho após o desafio antigênico por inalação de ovalbumina. Nesta situação, a pressão da câmara, conectada ao transdutor, mediu a elastância e a resistência do sistema respiratório dos ratos, antes e após o desafio com a OVA. Além disso, pelo fato de o aparelho contar com um balão de coleta para o ar exalado, pode-se avaliar também a concentração de NO neste ar; neste contexto o NO tem sido implicado com a função pulmonar durante reações anafiláticas pulmonares, sendo assim um importante marcador da inflamação alérgica do aparelho respiratório (XIONG *et al.*, 1999, TRIFILIEFF *et al.*, 2000).

Conforme descrito nos resultados deste trabalho, os índices de função pulmonar por nós analisados, a elastância e a resistência do sistema respiratório, medidos no experimento 2, apresentaram-se aumentados nos

animais sensibilizados e submetidos ao desafio antigênico, quando comparados aos animais não sensibilizados.

Além disso, ao se observar no presente trabalho que o estresse por confrontação social determinou uma diminuição do percentual de aumento da elastância do sistema respiratório, produzido pelo desafio antigênico, sugere-se que aspectos emocionais estejam envolvidos com a reação alérgica pulmonar e que, neste caso, teriam efeito protetor; estes dados indicariam que o modelo de estresse por confrontação social agora empregado por 14 dias tenha exercido redução no tônus das vias aéreas distais, após o desafio antigênico.

É possível sugerir, pois, que alterações na população de linfócitos CD4 possam ter sido observadas em nossos experimentos, visto que empregamos estresse prolongado por 14 dias de confrontação social, isto é, uma redução, nos animais estressados do presente experimento, da população de linfócitos T CD4 e CD8. De fato, e como já comentado, a redução desta população de linfócitos foi constatada por Stefanski e Engler (1998) após uso por 7 dias de um estresse semelhante ao agora aplicado. Uma vez que estes linfócitos já foram correlacionados positivamente com a severidade dos processos inflamatórios, citotóxicos e, estando estes linfócitos CD4 aumentados 48 h após uma broncoprovocação em asmáticos atópicos (METZGER et al., 1987) é possível supor estejam eles de alguma forma ligados à redução do percentual de aumento da elastância do sistema

respiratório agora observada. Este fato concorda, em essência, ao relatado por Tibério et al. (1997) em cobaias depletadas de neurocininas.

Estes efeitos do estresse estariam também relacionados à ativação do Sistema Nervoso Autônomo Simpático e/ou ao aumento da liberação de corticosteróides? Por outro lado, estaria o sistema NANC envolvido também com este achados?

Estudos prévios mostraram que os níveis de estresse e de ansiedade foram relevantes para o início, a intensidade e a duração de uma resposta anafilática do pulmão (PALERMO-NETO e GUIMARÃES, 2000). É de conhecimento comum que altos níveis de estresse são positivamente correlacionados com altos níveis séricos de glicocorticoides; além disso, altos níveis de corticosterona ou cortisol foram encontrados durante o curso de uma resposta de estresse (BESEDOVSKY *et al.*, 1986; BESEDOVSKY e DEL REY, 1996). Neste sentido, embora os hormônios glicocorticoides sejam bastante reconhecidos por suas propriedades anti-inflamatórias (BESEDOVSKY *et al.*, 1986; WEBSTER *et al.*, 1998), atuam, também exacerbando-as em algumas situações (WIEGERS e REUL, 1998), o que têm levado à sugestão de um papel modulatório para os mesmos (WILDER, 1995; CHROUSOS, 1995). A direção desta modulação dependeria grandemente dos níveis circulantes deste hormônio.

Assim, parece oportuno salientar que as interações entre o estresse, corticosteróides e respostas inflamatórias devam ser realizadas com cautela, para a compreensão dos achados observados e conseqüentemente, expressão de conceitos.

No contexto desta discussão, estresse é definido como um processo complexo pelo qual um organismo responde a eventos psicológicos ou ambientais externos, podendo representar um desafio ou perigo ao organismo (PARÉ e GLAVIN, 1993); desta forma, um estímulo pode ter a característica ou ser considerado potencialmente como estressor, enquanto que a conseqüência deste para o organismo é que determina a sua "resposta ao estresse".

Uma resposta de estresse, enquanto condição adaptativa do indivíduo frente a uma situação potencialmente ameaçadora implica em ativação neural, amplamente descrita nos principais livros e compêndios de fisiologia animal e humana. Tal ativação, proveniente da estimulação de estruturas límbicas, ou seja, aquelas destinadas aos processos e funções relacionadas à emocionalidade, desencadeia estímulos nervosos, que percorrem as fibras nervosas do Sistema Nervoso Autônomo Simpático, o qual medeia a liberação de noradrenalina por terminações nervosas presentes em diversos órgãos, entre eles os pulmões, com o propósito de preparar o organismo para uma possível necessidade emergente, na qual o aumento na disponibilidade de oxigênio, resultante da taquipnéia autonômica, é crucial

para a resposta de fuga e luta (TORNATZKY e MICZEK, 1994). Nestas condições ocorre, também, liberação de adrenalina da medula das glândulas adrenais (CHROUSOS, 1995). Neste contexto, lembramos que a estimulação de receptores  $\beta_2$  presentes na musculatura lisa do trato respiratório produz broncodilatação. Este fato poderia ter relação com os achados do presente trabalho relativos à diminuição do percentual de aumento da elastância e da diminuição dos valores máximos de resistência, do sistema respiratório nos animais estressados por confrontação social.

Por outro lado, e como já comentado, uma resposta ao estresse determina também uma ativação neuroendócrina igualmente importante para a sobrevivência de diversas espécies de animais. Esta ativação envolve a secreção e a liberação de glicocorticóides, os quais também modificam a expressão, produção, e liberação, não unicamente de citocinas, mas também de moléculas de adesão e Ig's (DESCOTES *et al.*, 1982). Além disso, os glicocorticóides, já mencionados, mas em especial a corticosterona, parecem atuar sinergicamente com citocinas endógenas, como a IL-1 e o TNF- $\alpha$ , dentre outros agentes (ZAVALA, 1990). Assim, no contexto do presente experimento o estresse poderia estar diretamente ou indiretamente alterando a produção e liberação de citocinas, as quais modulariam a resposta inflamatória pulmonar e, conseqüentemente, os parâmetros registrados neste trabalho.

Os glicocorticoides modificam tanto a expressão como a liberação de citocinas (ELENKOV *et al.*, 1996; WIEGERS e REUL, 1998). Conforme já salientado, por ocasião do estresse, estes hormônios poderiam atuar sobre a cascata de citocinas, modulando o balanço Th1 X Th2. Esta ação modulatória induzida pelo estresse poderia então, favorecer as respostas Th1 ou prevenir aquelas do tipo Th2, diminuindo, assim, a intensidade da resposta imuno-inflamatória (WILDER, 1995; CHROUSOS, 1995). Essa assertiva, no entanto, contrastaria com aquelas relatadas por nós anteriormente (PORTELA *et al.*, 2001, 2002) e ligadas à presença de leucócitos no lavado bronco alveolar de ratos OVA-sensibilizados, submetidos a estresse em esquiva ativa e ao desafio antigênico.

Entretanto, os presentes dados não nos permitem concluir que os efeitos da estimulação na gaiola grande ou na esquiva tenham deslocado o balanço Th1/Th2, ativado o SNAS e/ou modificado a população de linfócitos CD4 para as respostas pulmonares agora registradas nestes modelos. Contudo, as respostas obtidas mostram mais uma vez e claramente um efeito do estresse sobre a resposta inflamatória pulmonar dos ratos, o que sugere e reforça a idéia de interferência com estes mecanismos. Este fato destaca a relevância deste e de outros estudos que analisam o relacionamento dos sistemas nervoso e imune.

Já com relação aos níveis de NO presentes no ar exalado dos animais, observou-se que os valores basais - antes do desafio - foram



maiores nos animais sensibilizados com a OVA e estressados, sugerindo este fato e mais uma vez que este parâmetro inflamatório possa ter sido modulado pela ansiedade induzida pelo modelo de estresse social. Cabe ressaltar que esta possível ação amplificatória do estresse sobre os níveis de NO manteve-se após o desafio antigênico, ou seja: os animais estressados apresentaram também níveis maiores de NO no ar exalado após o desafio com o antígeno.

Estes resultados indicam uma possível participação de mediadores químicos na modulação da resposta inflamatória pulmonar, cuja atividade pode ser registrada pela produção e/ou liberação deste gás medido no ar exalado e, por tanto, proveniente do aparelho respiratório dos animais.

Conforme apontado por Tibério *et al.* (1997), cobaias submetidas a tratamento com capsaicina, para a depleção de neurocininas, apresentavam redução significativa no número de linfócitos CD4+ ao redor das vias aéreas, após terem sido expostas cronicamente à OVA. Em contrapartida, no lavado broncoalveolar, bem como ao redor das vias aéreas destes animais, não observou-se redução estatisticamente significante no número de eosinófilos. Estes fatos sugeriram que as neurocininas influenciavam a formação do infiltrado mononuclear, particularmente de linfócitos CD4+, de modo mais significativo do que o do infiltrado polimorfonuclear, de eosinófilos. Estes achados experimentais pareciam confirmar evidências sobre os efeitos das neurocininas na ativação dos linfócitos CD4+, ao passo que outros

mediadores poderiam exercer efeitos quimiotáticos e ativadores mais significativos em relação aos eosinófilos.

Assim sugeriu-se que os presentes achados após estresse social estivessem ligados a mediadores químicos do sistema NANC implicados no tônus muscular das vias aéreas, motivo pelo qual planejou-se – no terceiro experimento – a utilização da capsaicina, substância capaz de reduzir os teores da SP e da NKA, os quais são tidos como neuropeptídeos pulmonares com ação broncoconstritora no sistema NANC.

É relevante comentar, neste momento, e antes de analisar os efeitos da capsaicina, que utilizou-se neste terceiro experimento, de um modelo de estresse em esquiva ativa. Optou-se pelo uso deste modelo, em virtude de o mesmo atuar como favorecedor da aprendizagem dos animais, resultando em maior eficácia, com menor sofrimento, conforme sugerido por Millenson e Leslie (1979). Por outro lado, a escolha pelo aparelho de esquiva ativa deve-se, fundamentalmente, ao fato de já ter sido o mesmo utilizado em pesquisa anterior, da qual resultaram os trabalhos por nós publicados e que encontram-se anexos a esta tese (PORTELA *et al.*, 2001, 2002). Estes trabalhos mostram que o procedimento em esquiva é efetivo como modulador da resposta inflamatória alérgica pulmonar e, principalmente, que é replicável com pequeno número de animais. A possibilidade de um “n” pequeno, no contexto do tratamento neonatal com capsaicina, foi considerada como relevante, determinando a escolha pelo método.

Confirmamos, mais uma vez que o estresse no aparelho de esquiva ativa eliciou respostas de VU de 20-35 kHz, as quais são tidas como ansiogênicas (TONOUE *et al.*, 1986; CUOMO *et al.*, 1988). A série de frequências e a duração longa das chamadas maiores registradas no estudo presente estão ambas de acordo com dados descritos previamente (AUBIN e BREMOND, 1992; MICZEK *et al.*, 1995; PORTELA, 1999; PORTELA *et al.*, 2001, 2002.). De fato, da mesma forma que ocorreu no experimento 1, no qual os animais foram submetidos ao estresse social, todos os animais - agora estressados na esquiva ativa - exibiram o comportamento de VU. Assim, como discutido anteriormente, a VU ocorreu tanto nos intervalos dos estímulos estressantes, como durante os 3 minutos de adaptação na esquiva, o que replicou resultados idênticos obtidos anteriormente (PORTELA *et al.*, 1999, 2001, 2002); este fato, mais uma vez, sugeriu o estabelecimento de uma resposta emocional condicionada (CER) na qual os ratos aprenderam que o ambiente *per se* "representava" uma condição aversiva e responderam a esta lembrança reagindo com a postura típica e com a emissão de VU's.

Esses últimos achados concordam com estudo prévio de nosso grupo (PALERMO-NETO e GUIMARÃES, 2000), e fortemente sugerem o estabelecimento de um condicionamento pavloviano, no qual o contexto ambiental atuaria como estímulo condicionado associado com as sessões na esquiva, nas quais os choques foram o estímulo incondicionado (US). Resultados semelhantes foram obtidos por Miczek *et al.*, (1991) que explicou

esta “lembrança” do animal pelo ambiente aversivo como sendo uma resposta emocional condicionada (CER). Esta poderia ser uma interpretação da expressão afetiva de uma resposta de estresse (MICZEK *et al.*, 1995).

Observamos no presente trabalho que o tratamento com capsaicina não inibiu o comportamento de emissão das VU's; torna-se plausível sugerir que, muito provavelmente o modelo de depleção usado não tenha afetado as estruturas centrais e/ou periféricas necessárias à execução deste comportamento.

Assim, e conforme amplamente discutido, os resultados de VU's obtidos neste terceiro experimento, sugeriram a presença de estresse e/ou ansiedade na caixa de esQUIVA em animais tratados ou não com capsaicina. Tal fato permite confirmar a hipótese de que o modelo tenha atendido aos objetivos propostos inicialmente para este trabalho, ou seja: induzir alterações emocionais nos animais, para estudar as implicações de atividades do SNC, e em especial da SP, sobre a resposta imuno-inflamatória pulmonar.

Neste terceiro experimento e, conforme já salientado, antes de submeter os ratos adultos ao modelo de resposta inflamatória alérgica pulmonar aplicado no experimento anterior, optou-se por tratar os animais aos dois dias de vida com altas doses de capsaicina e avaliar os efeitos deste tratamento, aos 90 dias de vida, quando os ratos foram, então,

sensibilizados com OVA e estressados. Mais uma vez, tal decisão apoiou-se em estudos mostrando que altas doses de capsaicina administradas no período neonatal provocam destruição, por neurotoxicidade, das terminações sensitivas associadas à liberação, em particular, de SP e de NKA, (KRÖLL *et al.*, 1990; HOLZER, 1991; MARTINS *et al.*, 1991a; MARTINS *et al.*, 1991b). De fato, de acordo com Szallasi e Blumberg (1991), a capsaicina, ligando-se a receptores vanilóides presentes em terminações nervosas sensitivas (SZALLASI e BLUMBERG, 1991) despolariza a membrana dos neurônios, liberando os neuropeptídeos SP e NKA (MAGGI, 1995). No entanto, quando administrada em altas doses, a capsaicina inibe os canais catiônicos voltagem-dependente, com posterior influxo de  $\text{Ca}^+$  e de sódio e efluxo de potássio, o que leva à neurotoxicidade. Esta lesão resulta na diminuição funcional das terminações nervosas, no relativo à liberação dos neuropeptídeos (KRÖLL *et al.*, 1990; SZALLASI e BLUMBERG, 1991).

É importante salientar, neste momento, que um dos componentes broncoconstritores na regulação do sistema NANC é a SP (JOOS e PAUWELLS, 2000). Por outro lado, sabe-se também que a liberação de neuropeptídeos após doses menores de capsaicina apenas sensibiliza os receptores vanilóides anteriormente citados; assim sendo, Martins *et al.* (1993) estudaram os efeitos, decorrentes da infusão de capsaicina por via intravenosa, na mecânica pulmonar de cobaias, utilizando a técnica da cápsula alveolar modificada para pequenos animais (SALDIVA *et al.*, 1992). Demonstraram que a infusão de capsaicina resultava em aumentos

significativos e, de maneira dose dependente, na resposta mecânica e viscoelástica pulmonar, medidas ligadas à responsividade do sistema respiratório.

O estresse produzido no aparelho de esquiva ativa, exerceu influência sobre os valores basais da elastância do sistema respiratório. De fato, os resultados deste experimento mostraram que o estresse *per se* diminuiu os valores basais da elastância do sistema respiratório nos grupos estressados, comparados aos de animais não estressados.

Estes achados sugerem que o estresse *per se* seja condição importante para a regulação do tônus das vias aéreas distais; esta atenuação nos valores basais da elastância do sistema respiratório pode estar associada como já se disse a alterações na população de células CD4 no trato respiratório, a um aumento de atividade do SNA simpático, do eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal ou a uma possível diminuição, entre outros, de SP e NKA. Estes neuropeptídeos, conforme citado, têm ação broncoconstritora sobre a regulação do tônus das vias aéreas. Neste sentido, considerando-se que os animais estressados e tratados com capsaicina mostraram valores basais da elastância do sistema respiratório diferentes dos estressados não tratados com capsaicina, pode-se supor o envolvimento do sistema NANC com os diferentes achados após o estresse.

Experimentos conduzidos *in vivo* e *in vitro* têm sugerido que neurocininas, particularmente a SP, contribuam para infiltrado inflamatório; tal fato apóia-se na suposição de que estas substâncias podem interagir com linfócitos, mastócitos e eosinófilos. Assim, sugeriu-se que as neurocininas estejam relacionadas à estimulação da produção de citocinas por linfócitos, particularmente IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (WAGNER *et al.*, 1987; NIO *et al.*, 1993; RAMESHWAR *et al.*, 1993). A produção destas e de outras citocinas podem estar relacionados a uma ação da SP, decorrente da ligação a receptores específicos de membrana. Tal fato encontra respaldo nos estudos *in vitro* de Stanisz *et al.* (1987), os quais observaram, por citofluorimetria, ligação da SP com linfócitos T e B de ratos.

Além disso, Foster *et al.* (1991) sugeriam que a SP atuaria como quimiotática para linfócitos e como estímulo na proliferação destas células. Sabe-se, a este respeito, que a administração SP em ovelhas, através da canulação de vias aferentes de linfonodos periféricos, atua como um estímulo para a liberação de linfócitos CD4+ destas estruturas (MOORE *et al.*, 1990). Estes autores, ainda, observaram que este estímulo se mantinha até 96 horas após uma única infusão de SP. Além disso, a sensibilização a bactéria *S. muenchen*, seis dias após uma infusão de SP, abolia o período de latência para a produção de anticorpos. Estes efeitos sugeriram potencialização da resposta imune pela SP, tanto celular como daquela ligada à produção de imunoglobulinas.

Por outro lado, o estresse parece ter exacerbado a reação do organismo à reexposição ao antígeno, uma vez que verificou-se neste terceiro experimento um percentual maior de aumento da elastância do sistema respiratório nos animais estressados e submetidos ao desafio antigênico que naqueles não estressados; de fato, este aumento foi inferior nos animais sensibilizados e desafiados, mas que não foram submetidos ao estresse. Este dado da elastância do sistema respiratório contrasta com aquele observado no segundo experimento (estresse social) e sugere, portanto, que os mecanismos neuroimunes deflagrados nos dois modelos de estresse sejam distintos. De fato, o estresse produzido na esquiva ativa, não foi capaz de reduzir o percentual de aumento da resposta da elastância do sistema respiratório, nos animais tratados com a capsaicina, enquanto que tal fato ocorreu nos animais submetidos ao estresse social, no experimento anterior, ou seja, quando os animais não foram submetidos ao tratamento neonatal com a capsaicina. Por outro lado e, ao contrário do observado no segundo experimento, observamos também maiores percentuais de aumento de resistência do sistema respiratório em animais estressados em esquiva ativa. Quem sabe, o estresse em esquiva ativa poderia ter sido mais “forte” ou contudente que aquele produzido por confrontação social, ou vice-versa. De qualquer forma, fica caracterizada mais uma vez a relevância do contexto experimental estressor para a eliciação da resposta neuroimune, isto é, que a intensidade, o tipo e o tempo em que o animal é submetido ao estresse são determinantes para a direção e qualidade dos seus efeitos imonumodulatórios (PARÉ e GLAVIN, 1993).



Os dados de mecânica pulmonar agora obtidos corroboram com os resultados obtidos por TIBÉRIO *et al.*, (1997) e sugerem que a SP tenha mesmo menor participação nos processos anafiláticos das vias aéreas proximais do que nas distais. Entretanto, cabe salientar que o tratamento com capsaicina não inibiu por completo a resposta ao desafio antigênico sobre a mecânica do sistema respiratório nas vias proximais, ou seja: os animais sensibilizados e não estressados - apresentaram maiores percentuais de aumento da elastância e resistência do sistema respiratório após a reexposição ao antígeno OVA.

Entretanto, nos animais tratados com capsaicina, o estresse parece ter atenuado a resposta ao desafio antigênico sobre as vias proximais, uma vez que a porcentagem de aumento na resistência do sistema respiratório após o desafio com a OVA foi menor do que aquela registrada nos animais tratados com capsaicina e não submetidos ao estresse na esquiva. Aparentemente, o tratamento neonatal com capsaicina permite, portanto, inferências sobre a SP e a NKA na reatividade dos ratos que são submetidos a estresse.

Pode-se supor, diante dos dados do terceiro experimento, que o tônus das vias aéreas distais dos animais estressados em esquiva sejam influenciados, entre outros fatores, pelos neuropeptídeos e pelo desafio com a OVA. Este fato é bastante interessante se considerarmos que a função das vias distais, avaliada pela elastância do sistema respiratório, mede um

aspecto que está aumentado nos indivíduos asmáticos e que, os animais tratados com capsaicina no presente experimento apresentaram índices reduzidos desta mesma elastância, um dado importante para reflexão sobre o papel dos neuropeptídeos na asma e quiçá, para o desenvolvimento de novos fármacos para tratamentos da mesma.

No que concerne aos valores de NO, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os valores deste gás, medido no ar exalado dos animais tratados com capsaicina antes e após o desafio antigênico. Houve, no entanto, um aumento nos valores basais deste gás nos animais sensibilizados, submetidos ao estresse na esquiva, mas que não foram desafiados. Estes dados concordam com aqueles obtidos após o estresse por confrontação social e, mais uma vez, sugerem participação neuroimunomodulatória. Em conjunto, sugerem que possa haver liberação do NO em circunstâncias de ansiedade/estresse, já que também houve aumento nos valores deste gás no experimento anterior, em animais estressados por confrontação social antes e após o desafio antigênico.

Por outro lado e, somente nos animais tratados com a capsaicina, observamos maiores percentuais de aumento nos valores de NO após o desafio antigênico em animais sensibilizados, o que demonstra, ter sido este gás liberado em maiores quantidades após a reação anafilática; este fato encontra respaldo em trabalhos que sugerem que a produção e/ou liberação

de NO possam estar atreladas à ação de neuropeptídeos na asma de (ALVING *et al.*, 1990, KHARITONOV *et al.*, 1994, BARNES e LIEW, 1995).

Os percentuais de aumento nos valores de NO foram maiores nos animais estressados que nos não estressados, após o desafio antigênico e, na ausência de tratamento com capsaicina, o que sugere um papel de certa forma projectivo para a SP e/ou para a NKA sobre a resposta inflamatória de animais estressados. Assim, estes neuropeptídeos estariam implicados, de fato, com a resposta anafilática pulmonar, visto que atuariam impedindo a exacerbação da reação pulmonar, já que suas ausências implicaram em maiores percentuais de aumento da elastância, resistência e de NO em animais estressados: se verdadeiros, estes fatos sugerem que o sistema NANC esteja implicado com a broncoconstrição de indivíduos alérgicos e estressados, quando expostos ao estímulo antigênico.

A implicação do estresse na inflamação não é simples de se explicar. Assim, no contexto da presente discussão, os dados deste trabalho estão de acordo com nosso trabalho prévio e também com evidências de estudos experimentais recentes, mostrando que um estresse pré-natal brando e imprevisível (NOGUEIRA *et al.*, 1999) bem como um estresse em esquivada na idade adulta, produziram incremento e não redução, na resposta inflamatória, inclusive pulmonar, induzida por alérgeno em ratos (PORTELA *et al.*, 2001, 2002).

Os presentes resultados, ainda que não totalmente concludentes, permitem validar o uso da capsaicina, enquanto ferramenta de estudo farmacológico, relativos à importância do sistema NANC na modulação neuroimune do estresse sobre a inflamação alérgica pulmonar. Permitem, ainda, sustentar a hipótese de que o estresse, através da ativação psico-neuro-endócrina e/ou da liberação de neuropeptídeos modifique a inflamação alérgica pulmonar (EYNOTT *et al.*, 2003). Reforçam, assim, a noção de que os fatores de natureza física e psicológica subjacentes interferem com mecanismos ligados à regulação homeostática em doenças como por exemplo, na asma (RITVELD e van BEEST, 1999).

De fato, os dados do presente trabalho respaldam relatos que apontam, em seres humanos, a existência de uma correlação positiva entre escores mais elevados de ansiedade (medida por testes de escalas) e ocorrência de asma, ou seja: em indivíduos com asma, os índices de ansiedade, medida em escores, são maiores do que aqueles encontrados na população como um todo (YELLOWLEES e KALUCY, 1990). Cabe lembrar que os estudos foram realizados com pacientes em crise e fora das crises agudas de asma (VAMOS e KOLBE, 1999). Neste sentido, outros estudos revelaram maiores índices de transtornos comportamentais em crianças com asma (VILA *et al.*, 1999); entre estes transtornos, a hiperatividade destaca-se como um dos principais distúrbios de ansiedade associados à asma (PUURA *et al.*, 1998; VILA *et al.*, 1998). Finalmente, nossos dados estão de acordo com achados da literatura, que relatam ocorrência em crianças com

asma de maiores dificuldades comportamentais e de ajustamento, em relação à crianças não asmáticas (MRAZEK *et al.*, 1998).

Neste contexto, acredita-se que as desordens de ansiedade - que acometem os asmáticos - possam também ser decorrência de um condicionamento e/ou do próprio medo de ter as crises de asma; ambas características resultam em ativações neuroendócrinas semelhantes às relatadas no presente trabalho (STORES *et al.*, 1998).

Em contrapartida, parece-nos relevante comentar ainda que os efeitos estressores ou ansiogênicos não são apenas verificados diretamente nos indivíduos com asma. De fato, constataram-se maiores escores de ansiedade também nos pais de crianças internadas devido a asma (WAMBOLDT *et al.*, 1998) o que demonstra haver maiores índices de ansiedade em pessoas que convivem com doentes. Neste sentido, em nossos laboratórios, demonstramos que a coabitação de um camundongo sadio com outro camundongo inoculado com tumor de Erlich trouxe importantes alterações emocionais e também imunológicas aos animais sadios "acompanhantes"; estes últimos apresentaram menor atividade exploratória em *hole board*, menor número de leucócitos circulantes e menor resistência ao tumor de Erlich, inoculado nos mesmos, onze dias após a coabitação com os "doentes" (MORGULIS *et al.*, 2004).

Por outro lado, não se deve perder de vista que as relações de causa e efeito entre todas as variáveis presentemente estudadas são bidirecionais. Assim, existem evidências mostrando em seres humanos que a piora da síndrome do pânico – um transtorno de ansiedade - acarretava uma piora também nas crises de asma (RIETVELD *et al.*, 1999). No entanto, também há registros de crises de asma amplificando e piorando crises de pânico. Em ambos os casos, ansiedade e asma estão presentes, sendo mutuamente influenciáveis (CARR, 1998).

Por fim, é importante salientar que ainda são poucos os registros de publicações anteriores a respeito de trabalhos que incluam num mesmo protocolo experimental o tratamento neonatal com capsaicina, a aplicação de um estresse e a análise da inflamação alérgica pulmonar. O presente trabalho pode assim, indicar um importante caminho numa direção multidisciplinar, para o estudo destas variáveis, que atuam simultaneamente tanto em seres humanos como em animais.

Por conta do avanço no conhecimento científico, sobretudo nas áreas biomédicas e humanas, acumulados até a presente data e, considerando-se os resultados aqui apresentados e discutidos, afirma-se um importante papel da ansiedade e do estresse sobre doenças como a asma e a provável participação do sistema NANC e dos neuropeptídeos neste processo.

## **7 CONCLUSÕES**

1. O estresse social agudo e prolongado de ratos em uma gaiola grande enriquecida exerceu efeitos comportamentais decorrentes da situação de confrontação social; estes efeitos foram verificados através das emissões de vocalizações ultrassônicas, o que sugere aumento nos níveis de ansiedade;
2. O estresse por confrontação social prolongado resultou em alterações na resposta inflamatória de origem alérgica pulmonar em ratos sensibilizados e desafiados com OVA. Os ratos submetidos ao estresse apresentaram aumento menor dos valores da elastância do sistema respiratório após o desafio antigênico. Os percentuais de aumento de resistência do sistema respiratório dos animais sensibilizados foram iguais, a despeito de terem sido eles estressados ou não. Os valores de NO, basais e máximos, medidos no ar exalado dos animais estressados foram maiores do que aqueles de animais não estressados. Não houve diferença nos percentuais de aumento dos valores de NO pós-desafio.
3. O tratamento neonatal com capsaicina produziu alterações na resposta inflamatória de origem alérgica pulmonar de ratos avaliados quando adultos (90 dias). Houve atenuação nos valores da elastância basal (antes do desafio) do sistema respiratório dos animais sensibilizados e estressados; este mesmo grupo apresentou maiores percentuais de aumento desta elastância após o desafio. Houve atenuação no percentual de aumento de resistência do sistema respiratório dos animais estressados e desafiados, em relação àqueles dos não estressados. Os animais não estressados apresentaram concentrações menores de NO basais. Após o desafio, o grupo de ratos submetidos ao estresse na esquiva ativa apresentou percentuais de aumento de NO superiores ao do grupo não estressado.

Estes resultados em seu conjunto sugerem que o estresse tenha a capacidade de modular, de forma diferenciada, parâmetros da resposta inflamatória alérgica pulmonar, e que os neuropeptídeos estejam implicados com esta modulação.



## REFERÊNCIAS\*

---

\*De acordo com:

INTERNATIONAL COMMITTEE OF MEDICAL JOURNAL EDITORS. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Disponível em: <<http://www.icmj.org>>. Acesso em: 06 maio 2004.

**NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of journals indexed in Index Medicus. 2001.**

Available from: [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/browser.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/browser.cgi)  
[www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html](http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html)

- Adams N, Boice R. Development of dominance in domestic rats in laboratory and seminatural environments. *Behav Processes*. 1989; 19:127-42.
- Ader R, Cohen N. Psychoneuroimmunology: conditioning and stress. *Annu Rev Psychol*. 1993; 44:53-85.
- Allin JT, Banks EM. Functional aspects of ultrasound production by infant albino rats (*Rattus norvegicus*). *Anim Behav*. 1972; 4:149-56.
- Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur J Respir*. 1990; 6:1368-71.
- Anzaldo AJ, Harrison PC, Riskowski CL, Sebek LA, Maghirang RG, Gonyou HW. Increasing welfare of laboratory rats with the help of spatially enhanced cages. *AWIC Newsl*. 1994; 5(3):1-5.
- Apanius V. Stress and immune defense. In: Moller AP, Milinski M, Slater PJB, editores. *Advances in the study of behavior*. San Diego: Academic press; 1998. p. 133-53.
- Aubin T, Bremond JC. Perceptions of distress call harmonic structure by the starling (*Sturnus vulgaris*). *Behavior*. 1992; 120:151-63.
- Azzawi M, Bradley B, Jeffrey PK, Frew AJ, Assouif B, Collins Jv, Durham s, Kay AB. Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1990; 142:1407-13.
- Barfield RJ, Geyer LA. The ultrasonic postejaculatory vocalization and the postejaculatory refractory period of the male rat. *J Comp Physiol Psychol*. 1975; 88:723-34.
- Barnes PJ, Adcock IM. NF- $\kappa$ B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy. *TIPS*. 1997; 18:46-50.
- Barnes PJ, Dixon CMS. The effect of inhaled vasoactive intestinal peptide on bronchial hyperreactivity in man. *Am Rev Respir Dis*. 1984; 130:162-6.
- Barnes PJ, Liew FY. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol Today*. 1995; 16:128-30.
- Bascom R Meggs WJ, Frampton M, Hudnell K, Kobal G, Medinsky M, Rea W. Neurogenic inflammation: with additional discussion of central and perceptual integration of nonneurogenic inflammation. *Envir Health Perspect*. 1997; 105(2):531-7.
- Basso AS, Costa-Pinto FAC Britto LRG, Sá-Rocha LC, Palermo-Neto J: Neural pathways involved in food allergy signaling in the mouse brain: role of capsaicin-sensitive fibers. *Brain Res*. 2004; 1009:181-8.

Basso AS, Costa-Pinto FAC, Russo M, Britto LRG, Sá-Rocha LC, Palermo-Neto J.: Neural correlates of IgE-mediated food allergy. *Neuroimmunology*. 2003; 140:69-77.

Basso AS, Sá-Rocha LC, Palermo-Neto J. Immune-induced flavor aversion in mice: modification by neonatal capsaicin treatment. *Neuroimmunomodulation*. 2001; 9:88-94.

Baum A, Gatchell RJ, Aiello JR, Thompson DE. Cognitive mediation of environmental stress. In: Harvey JH, editor. *Cognition, social behavior, and the environment*. New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates; 1981. p. 513-33.

Becker EL, Austen KF. Mechanisms of immunologic injury of rat peritoneal mast cells: the effect of phosphonate inhibitors on the homocytotropic antibody-mediated histamine release and the first component of rat complement. *J Exp Med*. 1966; 124:379-95.

Belvisi MG, Stretton CD, Yacoub M, Barnes PJ. Nitric oxide is an endogenous neurotransmitter of bronchodilator nerves in humans. *Eur J Pharmacol*. 1992; 210:221-2.

Bentley AM, Durham SR, Robinson DS, Menz G, Storz C, Cromwell O, Kay AB, Wardlaw AJ. Expression of endothelial and leukocyte adhesion molecules and intercellular adhesion molecule-1 in the bronchial mucosa in steady state and allergen-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1993a; 92:857-68,

Bentley AM, Meng Q, Robinson DS, Hamid Q, Kay AB, Durham SR. Increase in activated T-lymphocytes, eosinophils and cytokine mRNA expression for interleukin-5 and granulocyte macrophage colony stimulating in bronchial biopsies after allergen inhalation challenge in atopic asthmatics. *Am J Resp Cell Mol Biol*. 1993b; 8:35-42.

Besedovsky HO, Del Rey A, Sorkin E, Dinarello CA. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science*. 1986; 233:652-4.

Besedovsky HO, Del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: Facts and hypotheses. *Endocr Rev*. 1996; 17:64-102.

Blalock JE. The immune system as a sensory organ. *J Immunol*. 1984; 132:1067-70.

Bochner BS, Unden BJ, Lichtenstein LM. Immunological aspects of allergic asthma. *Ann Rev Immunol*. 1994; 12:295-335.

Bonamin LV, Malucelli BE. The influence of social isolation and peripheral innervation on Ehrlich tumor growth in mice. *Braz J Med Biol Res*. 1995; 28:557-62.

- Bridges RS, Ronsheim PM, Prolactin (PRL) regulation of maternal behavior in rats: bromocriptine treatment delays and PRL promotes the rapid onset of behavior. *Endocrinology*. 1990; 126:837-48.
- Broderson JR, Lindsey JR, Crawford JE. The role of environmental ammonia in respiratory mycoplasmosis of rats. *Am J Pathol*. 1976; 85(1):115-30.
- Burnstock G. Evolution of the autonomic innervation of visceral and cardiovascular systems in vertebrates. *Pharmacol Rev*. 1969; 21:247-324.
- Carr RE. Panic disorder and asthma: causes, effects and research implications. *J Psychosom Res*. 1998; 44(1):43-52.
- Chang MP, Castle SC, Norman DC. Suppressive effects of alprazolam on the immune response of mice. *Int J Immunopharmacol*. 1991; 13:259-66.
- Chmiel D, Noonan M. Preference of laboratory rats for potentially enriching stimulus objects. *Lab Anim*. 1996; 30:97-101.
- Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med*. 1995; 332:1351-62.
- Coleman JW, Layton GT, Stanworth DR. The kinetics of in vivo sensitization of rat peritoneal and lung mast cells: Temporal dissociation from circulating levels of IgE. *Eur J Immunol*. 1983; 13:994-8.
- Coover GD, Levine S, Ursin H. Plasma corticosterone levels during active avoidance learning. *Acta Physiol Scand*. 1971; 82(3):16-7.
- Corrigan CJ, Kay AB. CD4+ T lymphocyte activation in acute severe asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 1991; 94(1-4):270-1.
- Corrigan CJ. Allergy of the respiratory tract. *Curr Opin Immunol*. 1992; 4:798-804.
- Corrigan JG, Flannelly KJ. Ultrasonic vocalizations of defeated male rats. *J Comp. Psychol*. 1979; 93:105-15.
- Costa-Pinto. Avoidance behavior and neural correlates of allergen exposure in a murine model of asthma. *Brain Behav Immun*. In press 2004.
- Covelli V, Munno I, Decandia P, Altamura M, Cannuscio B, Maffione AB, Jirillo E. Effects of benzodiazepine on the immune system. *Acta Neurol*. 1991; 13:418-23.
- Cowley DS, Roy-Byrne PP. Hyperventilation and panic disorder. *Am J Med*. 1987; 83(5):929-37.

- Cuomo V, Cagiano R, De Salvia MA, Maselli MA, Renna G, Racagni G. Ultrasonic vocalization in response to unavoidable aversive stimuli in rats: Effects of benzodiazepines. *Life Sci.* 1988; 43:485-91.
- De Vries JE, Gauchat JF, Aversa GG, Punnonen J, Gascan H, Yssel H. Regulation of IgE synthesis by cytokines. *Curr Opin Immunol.* 1991; 3:851-8.
- De Vry J, Benz U, Shreiber R, Traber J. Shock-induced ultrasonic vocalization in young adult rats: A model for testing putative anti-anxiety drugs. *Eur J Pharm.* 1993; 249:331-9.
- Descotes J, Tedone R, Evreux C. Suppression of humoral and cellular immunity in normal mice by diazepam. *Immunol Lett.* 1982; 5:41-3.
- Dhabhar FS, McEwen BS. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a pivotal role for leukocyte trafficking. *Brain Behav Immun.* 1997; 11:286-306.
- Dirks JF, Jones NF, Kinsman RA. Panic-fear: a personality dimension related to intractability in asthma. *Psychosom Med.* 1977; 39(2):120-6.
- Dirks JF, Paley A, Fross KH. Panic-fear research in asthma and the nuclear conflict theory of asthma: similarities, differences and clinical implications. *Brit J Med Psychol.* 1979; 52:71-6.
- Dohms JE, Metz A. Stress mechanisms of immunosuppression. *Vet Immun Immunopathol.* 1991; 30:89-109.
- Dunn AJ, Swiergel AH. The role of cytokines in infection-related behavior. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 840:577-85.
- Dunzendorfer S, Meierhofer C, Wiedermann CJ. Signaling in neuropeptide-induced migration of human eosinophils. *J Leukoc Biol.* 1998; 64:828-34.
- Elenkov IJ, Papanicolaou DA, Wilder RA, Chrousos GP. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: Clinical implications. *Proc Am Assoc Physicians.* 1996; 108:374-81.
- Elwood W, Lotwal JO, Barnes PJ, Chung KF. Characterization of allergen-induced bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation in actively sensitized brown-Norway rats. *J Allergy Clin Immunology.* 1991; 88(6):951-60.
- Eynott PR, Paavolainen N, Groneberg DA, Noble A, Salmon M, Nath P, Leung SY, Chung KF. Role of nitric oxide in chronic allergen-induced airway cell proliferation and inflammation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 304(1):22-9.

- Fonseca ESM, Massoco CA, Palermo-Neto J. Effects of prenatal stress on stress-induced changes in behavior and macrophage activity. *Physiol Behavior*. 2002; 77:205-15.
- Foster CA, Mandak B, Kromer E, Rot A. The neuropeptide substance P in chemotactic for human T cells. *Clin Res*. 1991; 39:535A.
- Gamble MR, Clough G. Ammonia build-up in animal boxes and its effect on rat tracheal epithelium. *Lab Anim*. 1976; 10:93-104.
- Gerblich AA, Campbell AE, Schuyler MR. Changes in T-lymphocyte subpopulations after antigenic bronchial provocation in asthmatics. *N Engl J Med*. 1984; 310:1349-52.
- Gilmour MI. Interaction of air pollutants and pulmonary allergic responses in experimental animals. *Toxicology*. 1995 Dec 28;105(2-3):335-42.
- Gonzalez-Quijano MI, Martin M, Millan S, Lopez-Calderon A. Lymphocyte response to mitogens: influence of life events and personality. *Neuropsychobiology*. 1998; 38:90-6.
- Haczku A, Chung KF, Sun J, Barnes PJ, Kay AB, Moqbel R. Airway hyperresponsiveness, elevation of serum-specific IgE and activation of T cells following allergen exposure in sensitized Brown-Norway rats. *Immunology*. 1995b; 85(4):598-603.
- Haczku A, Moqbel R, Jacobson M, Kay AB, Barnes PJ, Chung KF. T-cell subsets and activation in bronchial mucosa of sensitized Brown-Norway rats after single allergen exposure. *Immunology*. 1995a; 85(4):591-7.
- Henry JP. The relation of social to biological process in disease. *Soc Sci Med*. 1982; 16:369-80.
- Holgate ST. Epidemic of allergy and asthma. *Nature*. 1999; 402:B2-B4,.
- Holsboer F. Neuroendocrinology of mood disorders In: Bloom FE, Kupfer DJ, editors. *Psychopharmacology, the 4 th Generation of Progress*. New York: Raven Press; 1995. p. 957-68.
- Holzer P. Capsaicin cellular targets, mechanisms of action and selectively for thin sensory neurons. *Pharm Rev*. 1991; 43: 143-201.
- Hunskar S, Fosse RT. Allergy to laboratory mice and rats: a review of its prevention, management, and treatment. *Lab Anim*. 1993; 27(3):206-21.
- Irwin M, Patterson T, Smith TL, Caldwell C, Brown SA, Gillin C, Grant I. Reduction of Immune function in life stress and depression. *Biol Psychiatry*. 1990; 27:22-30.

Jain R, Zwickler D, Hollander CS, Brand H, Saperstein A, Hutchinson B, Brown C, Audhya T. Corticotropin-releasing factor modulates the immune response to stress in the rat. *Endocrinology*. 1991; 128(3):1329-36.

Jancsó N, Jancsó-Gabor A, Szolcsanyi J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother*. 1967; 31:138-51.

Johnson N, Leone F. *Statistics and experimental design in engineering and physical sciences*, John Wiley, 2nd New York, 1997. p. 78-96.

Joos GF, Pauwels RA. Pro-inflammatory effects of substance P: new perspectives for the treatment of airway diseases? *TIPS*. 2000; 21(4):131-3.

Kapsenberg MI, Jansen HM, Bos JD, Wierenga EA. Role of type 1 and type 2 T-helper cells in allergic diseases. *Curr Opin Immunol*. 1992; 4:788-93.

Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet*. 1994; 343:133-4.

Kobzik L, Schoen FS. The Lung. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, editores. *Robbins pathologic basis of disease*. 5th ed. Philadelphia: Saunders Co; 1994. p. 673-734.

Kroegel C, Giembycz M, Barnes P. Characterization of eosinophil cell activation by peptides. Differential effects of substance P, melittin, and FMLP. *J Immunol*. 1990; 145:2581-87.

Kröll F, Karlsson JA, Lundberg JM, Presson CGA. Capsaicin-induced bronchoconstriction and neuropeptides release in guinea pigs perfused lungs. *J Appl Physiol*. 1990; 68(4):1679-87.

Krumholz W, Kabisch S, Biscopring J, Hempelman G. Change in the adhesiveness of polymorphonuclear neutrophilic granulocytes by the intravenous anesthetics midazolam and ketamine *Intensivther. Anesth Intensivther Notfallmed*. 1987 22(5):211-3.

Laitinen LA, Laitinen A, Haahtela T. Airflow mucosal inflammation even in patients with newly diagnosed asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 147:697-704.

Lazzarini R, Malucelli BE, Muscará MN, Nucci G, Palermo-Neto J. Reduction of inflammation in rats by diazepam; tolerance development. *Life sci*. 2003; 72:2361-8.

Lazzarini R, Malucelli BE, Palermo-Neto J. Reduction of acute inflammation in rats by diazepam; role of peripheral benzodiazepine receptors and corticosterone. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2001; 23(2):253-65.

- Leonard BE, Song C. Stress and the immune system in the etiology of anxiety and depression. *Pharm Biochem Behav.* 1996; 54(1):299-303.
- Ligeiro de Oliveira AP, Fialho de Araujo AM, Lazzarini R, Silva ZL, De Nucci G, Muscará MN, Tavares de Lima W, Palermo-Neto J. Effects of amphetamine on immune-mediated lung inflammatory response in rats. *Neuroimmunomodulation.* 2004; 11(3):181-90.
- Maciocia G. Causas da Patologia. In: Maciocia G. Os fundamentos da medicina chinesa: um texto abrangente para acupunturistas e fitoterapeutas. São Paulo: Roca; 1996. p. 161-80.
- 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.* 1989; 243:83-5.
- Madden KS, Felten DL. Experimental basis for neural-immune interactions. *Physiol Rev.* 1995; 75(1):77-106.
- Maes M, Van Bockstaele DR, Gastel A, Song C, Schotte C, Neels H, DeMeester I, Scharpe S, Janca A. The effects of psychological stress on leukocyte subset distribution in humans: evidence of immune activation. *Neuropsychobiology.* 1999; 39(1):1-9.
- Maggi CA, Giachetti A, Dey RD, Said SI. Neuropeptides as regulators of airway function: vasoactive intestinal peptide and the tachykinins. *Physiol Rev.* 1995; 75:277-322.
- Martins MA, Dolhnikoff M, Zim WA, Saldiva PHN. Airway and pulmonary tissue responses to capsaicin in guinea pigs assessed with the alveolar capsule technique. *Am Rev Respir Dis.* 1993; 147:466-70.
- Martins MA, Shore SA, Drazen JM. Capsaicin-induced release of tachykinins: effects of enzyme inhibitors. *J Appl Physiol.* 1991a; 70:1950-6.
- Martins MA, Shore SA, Drazen JM. Peptidase modulation of pulmonary effects of tachykinin. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1991b; 94:325-9.
- Martins MA, Shore SA, Drazen JM. Release of tachykinins by histamine, methacoline, PAF, LTD4, and substance P from guinea pigs lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1991c; 5(261):449-55.
- Massoco CO, Palermo-Neto J. Diazepam effects on peritoneal macrophage activity and corticosterone serum levels in Balb/C mice. *Life Sci.* 1999; 65: 2157-65.
- Massoco CO, Palermo-Neto J. Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003; 95:11-9.



McEwen BS. Stress, adaptation, and disease: allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 840:33-44.

Metzger WJ, Zavala D, Richerson HB, Moseley P, Iwamoto P, Monick M, Sjoerdsma K, Hunninghake GW. Local allergen challenge and bronchoalveolar lavage of allergic lungs. Description of the model and local airway inflammation. *Am Rev Respir Dis.* 1987; 135:433-40.

Miczek KA, Tornatzky W, Vivian JA. Ethology and neuropharmacology: rodent ultrasounds. Birkhauser: Basel, 1991, p. 409-427.

Miczek KA, Weerts EM, Vivian JA, Barros HM. Aggression, anxiety and vocalizations in animals: GABAA and 5-HT anxiolytics. *Psychopharmacology.* 1995; 121(1):38-56.

Millenson JR, Leslie JC. Avoidance. In: *Principles of behavioral analysis.* 2nd ed. New York: MacMillan; 1979. p. 277-97.

Miller AH. Neuroendocrine and immune system interactions in stress and depression. *Psychoneuroendocrine.* 1998; 21:443-63.

Moore TC, Whitley GA, Lami JL, Said SI. Substance P increases and prolongs increased output of T4 (CD4) lymphocytes from lymph nodes of sheep in vivo: is it a mediator of immunological memory? *Immunopharmacology.* 1990; 20(3):207-16.

Morgulis MSF, Stankevicius D, Sá-Rocha LC, PALERMO-NETO J. Cohabitation with a sick cage-mate: consequences on behavior and on Ehrlich tumor growth. *Neuroimmunomodulation.* 2004; 11:49-57.

Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today.* 1996; 17(3):138-46.

Mrazek DA; Schuman WB; Klinnert M - Early asthma onset: risk of emotional and behavioral difficulties. *J Child Psychol Psychiatry.* 1998; 39(2):247-54

National Asthma Education and Prevention Program. Expert Panel Report 2. Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. Bethesda, Md: NIH, July 1997. NIH Pub. No. 97-4051.

Neuhaus EC. A personality study of asthmatic and cardiac children. *Psychosom Med.* 1958; 20(3):181-6.

Nio DA, Moylan RN, Roche JK. Modulation of T lymphocyte function by neuropeptides. Evidence for their role as local immunoregulatory elements. *J Immunol.* 1993; 150(12):5281-8.

Nogueira PJ, Ferreira HHA, Antunes E, Teixeira NA. Chronic mild prenatal stress exacerbates the allergen-induced airway inflammation in rats. *Mediat Inflamm.* 1999; 8:119-22.

- Noirot E. The onset of maternal behavior in rats, hamsters and mice. *Advances in the Study Behav.* 1972; 4:107-45.
- Numao T, Agrawal DK. Neuropeptides modulate human eosinophil chemotaxis. *J Immunol.* 1992; 149(10):3309-15.
- Olivier B, Molewijk HE, van Oorschot R, Ronken E, Mos J, Miczek KA. Ultrasonic vocalizations in rodents: effects of serotonergic ligands. *Neurosc Biobehav Rev.* 1998; 23:215-27.
- Palermo-Neto J, Flório JC, Sakate M. Development and Behavioral Effects of Prenatal Amitraz Exposure in Rats. *Neurotoxicol Teratol.* 1994; 16:65-70.
- Palermo-Neto J, Guimarães RK. Pavlovian Conditioning of lung anaphylactic response in rats. *Life Sci.* 2000 68(6): 611-623.
- Palermo-Neto J, Massoco CO, Favare RC. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Neurotoxicol Teratol.* 2001; 23:497 -507.
- Palermo-Neto J, Massoco CO, Souza WR. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity and Ehrlich tumor growth. *Brain Behav Immun.* 2003; 17:43-54.
- Persoons JHA, Berkenbosch F, Schornagel K, Thepen T, Kraal G. Increased specific IgE production in lungs after the induction of acute stress in rats. *J Allergy Clin Immunol.* 1995; 95:765-70.
- Pollart SM, Chapman MD, Fiocco GP, Rose G, Platts-Mills TA. Epidemiology of acute asthma: IgE antibodies to common inhalant allergens as a risk factor for emergency room visits. *J Allergy Clin Immunol.* 1989; 83(5):875-82.
- Pollart SM, Platts-Mills TA. Mites and mite allergy as risk factors for asthma. *Ann Allergy.* 1989; 63(5):364-5.
- Popp W, Wagner C, Merkle M, Reiser K, Kiss D, Zwick H. Allergic rhinitis, respiratory obstruction and bronchial asthma in the Vienna population *Wien Klin Wochenschr.* 1993;105(13):377-81.
- Portela CP, Massoco CO, Tavares de Lima W, Palermo-Neto J. Stress-induced increment on total bronchoalveolar count in OVA sensitized rats. *Physiol Behavior.* 2001; 72(3):415-20.
- Portela CP, Tibério IFLC, Maldonado EA; Martins MA, Palermo-Neto J. Effects of diazepam and stress on lung inflammatory response in OVA sensitized rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002; 282(6):1289-95.
- Portela CP. Efeitos de um modelo de estresse sobre a resposta inflamatória pulmonar de ratos. [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1999.

Puura K, Almqvist F, Tamminen T, Piha J, Kumpulainen K, Räsänen E, et al. Children with symptoms of depression: what do the adults see? *J Child Psychol Psychiatry Allied Discip.* 1998; 39(4):577-85.

Rameshwar P, Gascon P, Ganea D. Stimulation of IL-2 production in murine lymphocytes by substance P and related tachykinins. *J Immunol.* 1993; 151:2484-96.

Richardson B. Nerve supply to the lungs. *Am Rev Resp Dis.* 1991; 119:785-802.

Rietveld S, van Beest I, Everaerd W. Stress-induced breathlessness in asthma. *Psychol Med.* 1999; 29:1359-66.

Robinson D, Hamid Q, Bentley A, Ying S, Kay AB, Durham SR. Activation of CD4+ cells, increased Th2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1993; 92:313-24.

Rothenberg ME, Owen WF, Silberstein DS, Soberman RJ, Austen KF, Stevens RL. IL-5 Eosinophils cocultured with endothelial cells have increased survival and functional properties. *Science.* 1987; 237:645-7.

Rothenberg ME, Petersen J, Stevens RL, Silberstein DS, Mackenzie DT, Austen KF, et al. IL-5 dependent conversion of normodense human eosinophils to the hypodense phenotype using 3T3 fibroblasts for enhanced viability, accelerated hypodensity and sustained antibody-dependent cytotoxicity. *J Immunol.* 1989; 143:2311-6.

Sagara H, Yutaka T, Arima M, Makino S. Effect of capsaicin on the migration of eosinophils into the bronchi of guinea pigs. *Aerugi.* 1993; 42:236-42.

Said SI. Vasoactive peptides in the lung, with special reference to vasoactive intestinal peptide. *Exp Lung Res.* 1982; 3:343-8.

Saldiva PHN, Zin WA, Santos RLB, Eidelman DH, Milicemili J. Alveolar pressure measurement in open-chest rats. *J Appl Physiol.* 1992; 72:302-6.

Sales G, Pye D. *Ultrasonic Communication by Animals.* London, Chapman and Hall, 1974, pp 149-201.

Scharmann W. Improved housing of mice, rats and guineapigs: A contribution to the refinement of animal experiments. *Altern Lab Animals.* 1991; 23:108-14.

Schlumpf M, Parmar R, Ramseier H, Lichtensteiger W. *Dev Pharmacol Ther.* 1992; 18:145-51.

- Schlumpf M, Ramseier H, Lichtensteiger W. Prenatal diazepam induced persisting depression of cellular immune responses. *Life Sciences*. 1989; 44:493-501.
- Schmorrow DD, Ulrich RE. Improving the housing and care of laboratory pigeons and rats. *Hum Innov Altern*. 1991; 5:299-305.
- Schreiber AA, Frei K, Lichtensteiger W, Schlumpf M. Alterations in interleukin-6 production by LPS -and Con A- stimulated mixed lymphocytes, spleen macrophages and lymphocytes in prenatally diazepam exposed rats. *Agents Actions*. 1993; 39:166-73.
- Shu J, Stevenson JR, Zhou X. Modulation of cellular immune responses by cold water swim stress in the rat. *Dev Comp Immunol*. 1993; 17(4):357-71.
- Sibbald B; Anderson HR, McGuigan S. Asthma and employment in young adults. *Thorax*. 1992; 47(1): 19-24.
- Silva FR, Lazzarini R, Sá-Rocha LC, Morgulis MSFA, Massoco CO, Palermo-Neto J. Effects of acute and long-term diazepam administration on neutrophil activity; a flow cytometric study. *Eur J Pharmacol*. 2003; 478:97-104.
- Silva FR, Palermo-Neto J. Developmental, neuro and immunotoxic effects of perinatal diazepam treatment in rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1999; 21:247-65.
- Stanisz AM, Scicchitano R, Dazin P, Bienenstock J, Payan DG. Distribution of substance P receptors on murine spleen and Peyer's patch T and B cells. *J Immunol*, 1987; 139:749-54.
- Stefanski V, Ben-Eliyahu S. Social confrontation and tumor metastasis in rats: defeat and beta-adrenergic mechanisms. *Physiol Behav*. 1996; 60(1):277-82.
- Stefanski V, Engler H. Effects of acute and chronic social stress on blood cellular immunity in rats. *Physiol Behav*. 1998; 64(5): 733-41.
- Stefanski V. Social stress in loser rats: Opposite Immunological effects in submissive and subdominant males. *Physiol Behav*. 1997; 63(4): 605-13.
- Sternberg EM. Introduction: overview of the conference and the field. *Ann N Y Acad Sci*. 1998; 840:1-8.
- Stock P, Kallinich T, Akbari O, Quarcoo D, Gerhold K, Wahn U, et al. CD8+ T cells regulate immune responses in a murine model of allergen-induced sensitization and airway inflammation. *Eur J Immunol*. 2004; 34(7):1817-27.
- Stores G, Ellis AJ, Wiggs L, Crawford C, Thomson A. Sleep and psychological disturbance in nocturnal asthma. *Arch Dis Child*. 1998; 78(5):413-9.

- Szallasi A, Blumberg PM. Molecular target size of vanilloid (capsaicin) receptor in pig dorsal root ganglia. *Life Sci.* 1991; 48:1863-9.
- Takeuchi H, Kawashima S. Ultrasonic vocalizations and aggressive behavior in male rats. *Physiol Behav.* 1986; 38:545-50.
- Thomas DA, Howard SB, Barfield RJ. Male-produced postejaculatory vocalizations and the mating behavior of estrous female rats. *Behav Neural Biol.* 1982a; 36:403-10.
- Thomas DA, Takahashi R, Barfield RJ. Analysis of ultrasonic vocalizations emitted by intruders during aggressive encounters among rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol.* 1983; 97:201-6.
- Thomas DA, Talalas L, Barfield RJ. Effect of devocalization of the male on mating behavior in rats. *J Comp Physiol Psychol.* 1982b; 95:630-7.
- Tibério IFLC, Turco GMG, Leick-Maldonado EA, Sakae RS, Paiva PSO, Warth MPTN, Lapa e Silva JR, Saldiva PHN, Martins MA. Effects of neurokinin depletion on airway inflammation induced by chronic antigen exposure. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 155:1739-47.
- Tonoue T, Ashida Y, Makino H, Hata H. Inhibition of shock-elicited ultrasonic vocalization by opioid peptides in the rat: A psychotropic effect. *Psychoneuroendocrinology.* 1986; 11:177-84.
- Tornatzky W, Miczek KA. Alcohol, anxiolytics, and social stress in rats. *Psychopharmacology.* 1995; 121:135-44.
- Tornatzky W, Miczek KA. Behavioral and autonomic responses to intermittent social stress: differential protection by clonidine and metoprolol. *Psychopharmacology.* 1994; 116:346-356.
- Trifilieff A, Fujitani Y, Mentz F, Dugas B, Fuentes M, Bertrand C. Inducible Nitric Oxide synthase inhibitors suppress airway inflammation in mice through down-regulation of chemokine expression. *J Immunol.* 2000; 165(3):1526-33.
- Turner M. Anticorpos e seus receptores. In: Roitt I, Ostoff J, Male D, editores. *Imunologia* 4th ed. São Paulo: Manole; 1997. p. 4.1-4.10.
- Uchida Y, Nomura A, Ohtsuka M, Hasegawa S, Goto K, Kimura S, Sugita Y, Uchiama Y. Neurokinin A as a potent bronchoconstrictor. *Am Rev Respir Dis.* 1987; 136:718-21.
- Vamos M, Kolbe J. Psychological factors in severe chronic asthma. *Austr N Z J Psychiatry.* 1999; 33:538-44.

- Vila G, Nollet-Clemençon C, de Blic J, Mouren-Simeoni MC, Scheinmann P. Prevalence of DSM IV anxiety and affective disorders in a pediatric population of asthmatic children and adolescents. *J Affect Disord.* 2000; 58(3):223-31.
- Vila G; Nollet Clemençon C; de Blic J; Mouren Simeoni MC; Scheinmann P - Asthma severity and psychopathology in a tertiary care department for children and adolescent. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 1998; 7(3):137-44.
- Vila G; Nollet Clemençon C; Vera M; Robert JJ; de Blic J; Jouvent R; Mouren Simeoni MC; Scheinmann P - Prevalence of DSM-IV disorders in children and adolescents with asthma versus diabetes. *Can J Psychiatry.* 1999; 44(6):562-9.
- Vivian AJ, Miczek KA. Interactions between social stress and morphine in the periaqueductal gray: effects on affective vocal and reflexive pain responses in rats. *Psychopharmacology.* 1999; 146(2):153-61
- Vivian JA, Miczek KA. Diazepam and gepirone selectively attenuate either 20-32 kHz or 32-64 kHz ultrasonic vocalizations during aggressive encounters. *Psychopharmacology.* 1993; 113:66-73.
- Voorhorst R, Spijksma FTM, Varekamp H. The house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssimus*) and the allergens it produces: identity with the house dust antigen. *J Allergy.* 1967; 39:325-30.
- Wagner F, Fink R, Hart R, Danczygier H. Substance P enhances interferon  $\gamma$  production by human peripheral blood mononuclear cells. *Regul Pept.* 1987; 19:355-64.
- Walker C, Kaegi MK, Braun P, Blaser K. Activated T cells and eosinophils in bronchoalveolar lavage from subjects with asthma correlated with disease severity. *J Allergy Clin Immunol.* 1991; 88:935-42.
- Wamboldt MZ, Fritz G, Mansell A, McQuaid EL, Klein RB. Relationship of asthma severity and psychological problems in children. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 1998; 37(9):943-50.
- Wang JM, Rambaldi A, Biondi A, Chen ZG, Sanderson CJ, Mantovani A. Recombinant human interleukin-5 is a selective eosinophil chemoattractant. *Eur J Immunol.* 1989; 19:701-5.
- Webster EL, Torpy DJ, Elenkov IJ, Chrousos GP. Corticotropin-Releasing Hormon and Inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 840:21-32.
- Weinstock JV, Blum AM, Walder J, Walder R. Eosinophils from granulomas in murine *Schistosomiasis mansoni* produce substance P. *J Immunol.* 1988; 141:961-6.

Weinstock JV, Blum AM. Release of substance P by granuloma eosinophils in response to secretagogues in murine Schistosomiasis mansoni. *Cell Immunol.* 1990; 125(2):380-5.

White, NR, Barfield RJ. Effects of male pre-ejaculatory vocalizations on female receptive behavior in the rat (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol.* 1990; 104:140-6.

Wiedermann CJ, Wiedermann FJ, Apperl A, Kieselbach G, Konwalinka G, Braunsteiner H. In vitro human polymorphonuclear leukocyte chemokinesis and human monocyte chemotaxis are different activities of aminoterminal and carboxyterminal substance P. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1989; 340:185-90.

Wiedermann FJ, Kahler CM, Reinisch N, Wiedermann CJ. Induction of normal human eosinophil migration in vitro by substance P. *Acta Haematol,* 1993; 89: 213-5.

Wieggers GJ, Reul JM. Induction of cytokine receptors by glucocorticoids: functional and pathological significance. *TIPS.* 1998; 19:317-21.

Wiggs B, Moreno R, James A, Hogg JC, Paré P. A model for the mechanics of airway narrowing in asthma. In: Kaliner MA, Barnes PJ, editores. *Asthma: It's pathology and treatment.* New York: Marcel Dekker; 1991. p. 73-101.

Wilder RL. Neuroendocrine-immune system interactions and auto-immunity. *Ann Rev Immunol.* 1995; 13:308-38.

Wilson JW, Djukanovic R, Howarth PH, Holgate ST. Lymphocyte activation in bronchoalveolar lavage and peripheral blood in atopic asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1992; 145:958-60.

Xiong Y, Karupiah G, Hogan SP, Foster PS, Ramsay AJ. Inhibition of allergic airway inflammation in mice lacking Nitric Oxide synthase. *J Immunol.* 1999; 162(1):445 -52.

Yellowlees PM, Kalucy RS. Psychobiological aspects of asthma and consequent research implications. *Chest.* 1990; 97:628-34.

Zavala F, Tupin V, Descamps-Latscha B. In vivo treatment with benzodiazepins inhibits murine phagocyte oxidative metabolism and production of Interleukin-1 tumor necrosis factor and Interleukin-6. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990 225: 442.

## ANEXO

### ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

- Artigo 1** Portela CP, Massoco CO, Tavares de Lima W, Palermo-Neto J. Stress-induced increment on total bronchoalveolar count in OVA sensitized rats. *Physiol Behavior*. 2001; 72(3):415-20.
- Artigo 2** Portela CP, Tibério IFLC, Maldonado EA, Martins MA, Palermo-Neto J. Effects of diazepam and stress on lung inflammatory response in OVA sensitized rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002; 282(6):1289-95.



## Stress-induced increment on total bronchoalveolar cell count in OVA-sensitized rats

Carlos de Paula Portela<sup>a</sup>, Cristina de Oliveira Massoco<sup>a</sup>, Wothan Tavares de Lima<sup>b</sup>,  
João Palermo-Neto<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Applied Pharmacology and Toxicology Laboratory, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>b</sup>Pharmacology Department, Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Received 9 August 2000; received in revised form 16 October 2000; accepted 20 October 2000

### Abstract

The influence of stress on total leukocyte count from bronchoalveolar lavage (BAL) was investigated in rats sensitized and challenged with ovalbumin (OVA). The animals were injected intraperitoneally with a suspension of OVA plus aluminum hydroxide in 0.9% NaCl (Day 0) and boosted at Day 7 with an identical OVA solution, administered subcutaneously. From the first to the 13th day after sensitization, rats were placed individually in a shuttle box where they received 50 escapable footshocks per day, always preceded by a sound signal (S); the responses that occurred during both S and shocks canceled the stressful stimulation. On Day 14, animals were submitted to a single session of 50 inescapable footshocks, preceded by the same S; immediately after, the animals were submitted to a 1% OVA-inhalation challenge. Results showed high levels of stress in the shocked animals as detected through both ultrasonic vocalizations (UVs) and social interaction test in an open field. Total leukocyte count in BAL from stressed animals (24 h post-OVA challenge) revealed a significant increase in the number of inflammatory cells in comparison to that measured in sensitized, nonstressed challenged rats. These data demonstrate that stress plays a relevant and important role on total bronchoalveolar cell count in OVA-sensitized rats. © 2001 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Ultrasonic vocalization; Social interaction; Bronchoalveolar lavage; Allergic inflammation

Several studies have focused on the existence of body–mind interactions both in health and sickness. The long-held view that homeostatic mechanisms are integrated by nervous and endocrine systems has been expanded by information that these systems interact with the immune system [2,16]. Immune responses alter neural and endocrine functions, and in turn, neural and endocrine activity modifies immune function [9,33]. Changes in cell-mediated immune function were reported in persons undergoing distressing life experiences [28,39]. Indeed, stress reduces not only immune/inflammatory responses [35] but also modulates cytokine and peptide production and release [7,18,53]. The hypothalamic CRF hormone, in this respect, was reported as

being a key mediator of the endocrine, and probably of the autonomic and visceral, responses to stress [14,56].

Symptoms of anaphylaxis, particularly those related to lung function, were reported to be increased during stressful situations and/or high levels of anxiety [49,57]. Recently, it was shown that the lung anaphylactic response (LAR) is passive of Pavlovian conditioning and, also, that high levels of stress and anxiety interfere with the course of LAR [48]. The same article also showed the existence of a relationship between stress/anxiety levels and symptoms of LAR. According to MacQueen et al. [40], the central nervous system (CNS) can regulate the secretion of mediators known to occur in intestinal mucosal cells — a fact that supports the increasing evidence for CNS involvement in the modulation of immune function in allergic reactions.

In this respect, administration of intermittent footshocks to rats resulted in a 74% decrement in T-lymphocyte proliferation and a 59% decrease in natural killer cell cytotoxicity [34,36] as well. It is known that polymorphonuclear and mononuclear cells play a relevant role in

\* Corresponding author. Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, no. 87, CEP 05508-900, Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55-11-3818-7672; fax: +55-11-211-3074.

E-mail address: jpalermo@usp.br (J. Palermo-Neto).

allergic inflammatory responses, such as in asthma [32]. Even so, evidence to support a relationship between anxiety levels and bronchoalveolar leukocyte content is lacking. The present experiment was undertaken to verify the effects of an aversive stimulation by footshock stress on both anxiety levels and bronchoalveolar leukocyte content in ovalbumin (OVA)-sensitized rats studied during the course of LAR.

## 1. Materials and methods

### 1.1. Animals

Twenty pathogen-free and genetically similar male Wistar rats from our colony, weighing 250–300 g and about 80–90 days of age, were used. The animals were housed in temperature-controlled (21–23°C) and artificially lighted rooms on a 12-h light/12-h dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) with free access to food and water. The experiments were performed in a different room, kept at a similar temperature as the animal colony to which the animals were transferred and maintained in their home cages 2 weeks before the experiments. 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. Each animal was used once.

### 1.2. OVA sensitization and challenge

Sensitization procedures and aerosol challenge were performed according to Coleman et al. [10]. Briefly, animals were actively sensitized by an intraperitoneal (ip) injection of 0.66 ml of a suspension of 1 mg OVA (egg albumin grade II, Sigma) plus 300 mg of aluminum hydroxide [Al(OH)<sub>3</sub>] in 0.9% (wt/vol) NaCl. This was considered Day 0 of sensitization. Seven days after sensitization, the animals were boosted subcutaneously (sc) with an identical injection of aluminum-precipitated OVA. The aluminum precipitate acts as adjuvant to promote IgE production [40].

OVA-aerosol challenge was accomplished by placing the rats individually in a 7.2-l polyurethane chamber connected to an Inalamax nebulizer (model S3; Inalamax NS Indústria de Aparelhos Médicos, Brazil), which generated an aerosol mist pumped into the exposure chamber by the airflow supplied by a small animal ventilator set at 60 strokes per minute, with an output volume of 10 ml. All control (nonshocked) and experimental (shocked) rats were exposed to 1% OVA aerosol for 15 min and were studied 24 h later.

### 1.3. Anxiogenic stimulation

Footshock is known to induce anxiety and/or stress [1,3,55]. This anxiogenic stimulation was presently used

as suggested by De Vry et al. [15], with modifications. Briefly, the rats were placed individually into a shuttle box (model E 10–16 rat shuttle cage, Coulbourn Instruments, USA) housed inside a sound attenuation chamber. In this device, they received, during a 30-min session, 50 escapable footshocks (0.5-mA scrambled shocks of 5 s) through an electrified grid floor. The following schedule was used: (1) a discriminative signal (S) (6-dB tone cue of 2 s) preceded the escapable footshock; (2) each trial (tone and shock) was repeated 50 times, with an interval of 28 s between trials; (3) the set of shocks (50 trials) was repeated daily. Therefore, this shock session was repeated 13 times, beginning on sensitization Day 1 until sensitization Day 13; a response during the warning (S) canceled the shock delivery and terminated the S. Every shock was avoided when the responses occurred during both S and grid shocks. This discriminated-avoidance procedure was reported to provide higher levels of acquisition and maintenance of responsiveness than the classical conditioning method [38]. On sensitization Day 14, animals were submitted to a single session of 50 inescapable footshocks, discriminated by the same S and with an intertrial interval of 28 s. Animals from a control group (nonshocked) were similarly placed in the shuttle box for the same period of time, but without aversive stimulation.

A 3-min adaptation time in the shuttle box was provided to both control and stressed rats, i.e., the stimuli (sound or sound and footshock) started to be delivered 3 min after placing the animals in the apparatus; all sessions in the operant chamber were controlled by an L2T2 System software (Coulbourn) installed on an IBM-compatible computer placed in an adjacent room.

### 1.4. Behavioral measures

Measures of ultrasonic vocalization (UV) and of social interactions in an open field are known to display anxiety and/or stress levels [13,22,26,29,30,43,59]. These behavioral parameters were evaluated. UV consists of many short calls, homogeneously distributed over the total duration of the shock session [58]; it was presently recorded as suggested by De Vry et al. [15]. For that, a microphone (D 940-Petterson Elektronik, the Netherlands) was placed in the middle of the ceiling of the shuttle box. This microphone was connected to an amplifier and to a bandpass filter that selected UV (35 dB, 20–35 kHz); the output was made visible and audible on an oscilloscope and on an earphone, respectively. A computer controlled the duration of the UV recording session; the frequency and amplitude of the UV delivered by each rat were measured through the use of a software (R900 Petterson Electronics, the Netherlands). UV was detected during the adaptation period and during the first 7 min of all 14 shock sessions; recordings were made between 8:00 and 12:00 a.m.

The social interaction test was carried out in the open field, as described by File [26]. The open-field apparatus

was an arena 97 cm in diameter. A chronometer was used to measure the time spent in social interaction. A video camera was mounted vertically above the arena, and the rats were observed on a monitor in an adjacent room by an observer who was blind to the experimental procedures.

The test was applied to 20 rats that were divided into two equal groups: experimental group (shocked) and control group (nonshocked) forming 10 pairs; within each group, they were paired for weight (no more than 30 g of difference) and familiarized to the open-field arena for 5 min, 48 and 24 h before experimentation. Control and experimental pairs of rats were tested for social interactions for 5 min in this arena, 60 min after the last session in the shuttle box. The total time (in seconds) spent by the test pair in active social interaction (sniffing, following and grooming the partner, kicking, mounting, jumping on, crawling under or over the partner) was scored. The apparatus was washed with a 5% ethanol/water solution before each behavioral test to minimize possible influence of odor of previously tested animals; control and experimental rats were intermixed and the observations were made between 8:00 and 12:00 a.m.

#### 1.5. Bronchoalveolar lavage (BAL) and leukocyte count

Total leukocyte count from BAL was performed according to Elwood et al. [19]. Briefly, 24 h after OVA challenge, the rats were deeply anaesthetized intraperitoneally with chloral hydrate (10%, 3 ml/kg) and their lungs were flushed with  $4 \times 5$  ml aliquots of a 0.9% (wt/vol) sterile NaCl solution through the use of a cannula inserted by tracheotomy. The lavage fluid was collected and centrifuged ( $1000 \times g$  for 10 min at  $20^\circ\text{C}$ ), and the cell pellet obtained was resuspended in 2 ml of phosphate-buffered saline (PBS) solution. Total leukocyte count was made by adding 100  $\mu\text{l}$  of crystal violet to 900  $\mu\text{l}$  of the cell suspension; cells were counted under a light microscope in a Neubauer chamber.

#### 1.6. Experimental design

Twenty-four hours after sensitization (Day 0), the rats were divided equally and at random into two groups: experimental and control groups. Experimental animals were given anxiogenic stimulation from Days 1 to 14 postsensitization, as described above; on those days, control animals were identically placed in the shuttle box, without aversive stimulation. UV was measured in animals from both groups during the first 10 min of placement into the shuttle box, from Days 1 to 14 after sensitization. Immediately after the discriminated inescapable footshock (sensitization Day 14), all animals were submitted to an OVA challenge, as described above. Forty-five minutes after this challenge, i.e., 1 h after the last shuttle box session, the animals were placed in the center of an open field for social interaction measurements that were performed as previously described. Finally, 24 h after the OVA challenge, all animals were submitted to the BAL procedure described above.

#### 1.7. Data analysis

Bartlett's test [37] showed that the data concerning social interaction were parametric ( $P < .05$ ). Thus,  $t$  test was used to analyze this data. Data on cell count from BAL were not parametric; therefore, they were analyzed by the Mann–Whitney  $U$  test. Data on UV were transformed into percentage and analyzed by the Fisher test. The Graphpad Instat statistical package was used throughout, with the level of significance set at  $P < .05$  for all comparisons.

## 2. Results

#### 2.1. Effects of stress on UV and social interaction test

Stress induced UVs during the intertrial intervals of the discriminated footshocks. The mean frequency and am-

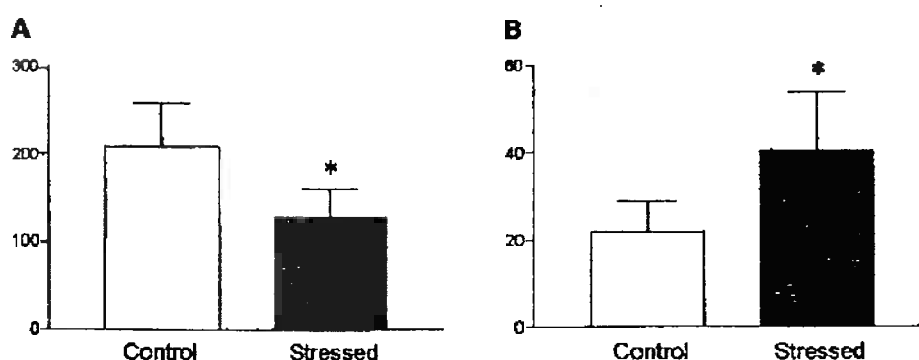


Fig. 1. Effects of an aversive stimulation induced by discriminated footshocks on the time spent by rats in social interaction in an open field (A) and on total leukocyte count in BAL fluid from actively OVA-sensitized rats after an inhalatory challenge. The open and closed columns represent control and stressed animals, respectively. An asterisk on top of the columns denotes a statistically significant difference at  $P < .05$  ( $t$  and  $U$  tests for A and B, respectively).

plitude of UV recorded from stressed animals were  $24.95 \pm 0.8243$  and  $22.01 \pm 0.2394$ , respectively; while unconditioned and nonshocked rats did not display UV within the test chamber (data not shown), all stressed animals exhibited this behavior. Indeed, the analysis of the first 3 min revealed that this behavior often occurred within the adaptation period to the shuttle box.

Fig. 1A shows the effects of the aversive stimulation now employed to induce stress on the total time spent by rats in social interaction in the open field. As can be seen, the amount of time performing this behavioral task was smaller ( $P < .05$ ) in stressed rats than in control ones.

### 2.2. Effects of stress on total leukocyte count

Fig. 1B also shows that the total leukocyte count from the BAL fluid after the inhalation challenge to sensitized rats was higher ( $P < .05$ ) in stressed than in control animals.

Taken together, the present results suggest that the aversive stimulation now employed induced high levels of stress, as detected through both UV and social interaction measurements. At the same time, this aversive stimulation increased the total leukocyte content in the BAL fluid of the OVA-sensitized rats used.

## 3. Discussion

The present findings demonstrate that stress increases leukocyte infiltration on antigen-induced airway inflammation in rats. This observation is relevant and suggests that the stress response is physiopathologically meaningful for an LAR. Indeed, the present investigation agrees with other studies suggesting that stress is relevant for the onset, intensity and maintenance of an anaphylactic response [47,48].

In the context of this experiment and discussion, stress is defined as a complex process by which an organism responds to either external (environmental) or psychological events that pose a challenge or danger to the organism [27]; thus, the stressful stimulus will be referred to as “stressor” and the response as the “stress response.” In this respect, it is known that social interaction evaluations performed in the open field and UV determination are good indexes of the stress response in rats [15,22,23,54]. Thus, the present results also showed high levels of stress response during the course of the aversive stimulation employed, in agreement with others [44,51,52]. Taken together, the present data support the increasing evidence for CNS involvement in the regulation of immune function [6,42].

The stressful stimulation now employed through the use of an escapable/inescapable footshock schedule triggered UV of 20–35 kHz, which had already been referred to as anxiogenic vocalization [13]. The range of frequencies and the long duration of most of the calls reported in the present study, in experimental rats, are in accordance with data

described elsewhere [4,45]. Furthermore, an interesting feature of the UV recorded by us was the fact that it also appeared during the habituation to the shuttle box, after the second day of training in the complete absence of aversive stimulation. These findings show that a Pavlovian conditioning was presently imposed, i.e., the environmental context (conditional stimulus, CS) associated with past footshocks (unconditioned stimulus, US) was sufficient to induce UV. These calls may be interpreted as an affective expression of a stress response [21,43].

Not surprisingly, the social interaction test revealed a similar pattern. In the social interaction test, the conflict is likely to result from a positive drive to interact with another rat versus an aversive to being behaviorally active in a novel environment [11]. When tested under conditions of maximal unfamiliarity with the arena and high levels of stress, subjects exhibit low levels of social interactions. In this respect, acute treatments with benzodiazepines exert anti-conflict effects to this paradigm, as measured by an increase in the time spent by pairs of rats engaged in social interaction [24–26]. Thus, the presently observed decrement in social interaction by the rats of the experimental groups is also representative of high levels of stress in these animals.

During the course of an airway inflammation associated with IgE-mediated response, the balance of the cytokines released can regulate the cellular migration to the inflammatory focus [5,8,12]. These inflammatory processes were also verified by others [20,50]. Elwood et al. [19] found an increment in eosinophil and lymphocyte counts in BAL fluid of animals sensitized and challenged with the antigen.

It is common knowledge that high levels of stress are positively correlated to glucocorticoid hormone serum levels, i.e., high levels of corticosterone or cortisol were found during the course of a stress response [6,42]. Thus, it can be thought that the present increment in leukocyte seems unreliable at first. Indeed, glucocorticoids are largely known to have anti-inflammatory properties [7,60]. However, the relationships among glucocorticoids, stress, and IgE-mediated inflammation are not so simple. In this respect, our data are in accordance with recent experimental evidence showing that chronic mild unpredictable prenatal stress produces an increase in the allergen-induced airway inflammation in the rat offspring [47].

Exposure of sensitized animals to OVA was associated with the presence of activated T cells in the airway mucosa [31]. According to Holgate [32], T cells produce a restricted array of cytokines encoded in a small cluster of the long arm of chromosome 5 at bands 31–33, which has been shown to be the IL-4 gene cluster. Specifically, it was reported that the pro-allergic cytokines are produced by a subtype of T-helper cells known as TH2; the other T-helper subtype, TH1, tends to antagonize the allergic response. In this respect, it is known that during the course of an airway inflammation associated with IgE-mediated response, the balance in the content and type of cytokines released by TH1/TH2 cells regulates the cellular migration to the inflammatory focus

[17,61]. Thus, the findings now reported in the BAL derived from stressed rats might be interpreted in the light of a change on this balance. Indeed, the balance among the cytokines released during an airway inflammation was already reported as being able to influence the development, course, and pathology of allergic and inflammatory diseases; this phenomenon was associated with immune/cellular responses linked to the populations of “T-helper” lymphocytes [41,46].

In fact, it was shown that stress, through glucocorticoid hormone activation, could modulate the switch between TH1/TH2 responses [9,18]. Specifically, it was reported that glucocorticoid hormones are able to modify the expression, production, and release, not only of cytokines, but also of adhesion molecules and immunoglobulins that, in turn, regulate TH1/TH2 switching and thus the intensity of the inflammatory response observed [17]. In this respect, cytokines seem to play a pivotal role. Indeed, IL-4, IL-5, IL-6, and IL-10 were pointed as favoring TH2 responses through activation of immune cells such as mast cells, B lymphocytes, and eosinophils [60]; on the other hand, INF $\gamma$ , IL-2 and IL-12 were reported to increase TH1-like responses, thus promoting a downregulation of the allergic response, i.e., they prevent overreactions [61].

In the light of the present findings, it is not possible to state if the footshock stress employed was able to increase TH2 response, to decrease TH1 response, or both. Nevertheless, whatever this answer might be, the present findings clearly show an effect of stress on BAL content, a fact that reinforces the relevance of the studies on CNS-immune system relationships.

### Acknowledgments

This research, which is part of the MS dissertation presented by Carlos de Paula Portela to the Neuroscience and Behavior graduate program of the Psychology Institute of the University of São Paulo, was supported by FAPESP Foundation (99/04228-7); CNPq (520050/97-5) and CAPES, to whom the authors wish to express sincere thanks.

### References

- [1] Abbott BB, Schoen LS, Badia P. Predictable and unpredictable shock: behavioral measures of aversion and physiological measures of stress. *Psychol Bull* 1984;96:45–71.
- [2] Ader R, Cohen N. Psychoneuroimmunology: conditioning and stress. *Annu Rev Psychol* 1993;44:53–85.
- [3] Arthur AZ. Stress of predictable and unpredictable shock. *Psychol Bull* 1986;100:379–83.
- [4] Aubin T, Bremond JC. Perceptions of distress call harmonic structure by the starling (*Sturnus vulgaris*). *Behavior* 1992;120:151–63.
- [5] Barnes PJ. Cytokines as mediators of chronic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:S42–9.
- [6] Besedovsky HO, Del Rey A. Immune–neuro–endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996;17:64–102.
- [7] Besedovsky HO, Del Rey A, Sorkin E, Dinarello CA. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 1986;233:652–4.
- [8] Broide D, Paine MM, Firestein GS. Eosinophils express interleukin-5 and granulocyte–macrophage colony-stimulating factor mRNA at sites of allergic inflammation in asthmatics. *J Clin Invest* 1992;90:1414–24.
- [9] Chrousos GP. The hypothalamic–pituitary–adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 1995;332:1351–62.
- [10] Coleman JW, Layton GT, Stanworth DR. The kinetics of in vivo sensitization of rat peritoneal and lung mast cells: temporal dissociation from circulating levels of IgE. *Eur J Immunol* 1983;13: 994–8.
- [11] Commissaris RL. Conflict behavior as animal models for the study of anxiety. In: Haaren F, editor. *Methods in behavioral pharmacology*. New York: Elsevier, 1993. pp. 443–74.
- [12] Cromwell O, Hamid Q, Corrigan CJ, Barkans J, Meng Q, Collings PD, Kay AB. Expression and generation of interleukin-8, IL-6 and granulocyte–macrophage colony-stimulating factor by bronchial epithelial cells and enhancement by IL-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Immunology* 1992;77:330–7.
- [13] Cuomo V, Cagiano R, De Salvia MA, Maselli MA, Renna G, Racagni G. Ultrasonic vocalization in response to unavoidable aversive stimuli in rats: effects of benzodiazepines. *Life Sci* 1988;43:485–9.
- [14] De Souza EB, Grigoriadis DE, Webster EL. Role of brain, pituitary and spleen corticotropin-releasing factor receptors in the stress response. *Methods Achiev Exp Pathol* 1991;14:23–44.
- [15] De Vry J, Benz U, Shreiber R, Traber J. Shock-induced ultrasonic vocalization in young adult rats: a model for testing putative anti-anxiety drugs. *Eur J Pharmacol* 1993;249:331–9.
- [16] Dunn AJ, Swiergel AH. The role of cytokines in infection-related behavior. In: McCann SM, Lipton JM, Sternberg EM, Chrousos GP, Gold PW, Smith CC, editors. *Neuroimmunomodulation: molecular aspects, integrative systems, and clinical advances*. Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 840. New York: New York Academy of Sciences, 1998. pp. 577–85.
- [17] Elenkov LJ, Chrousos GP. Stress hormones, TH1/TH2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *TEM* 1999;10:359–68.
- [18] Elenkov LJ, Papanicolaou DA, Wilder RA, Chrousos GP. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. *Proc Assoc Am Physicians* 1996;108:374–81.
- [19] Elwood W, Lötvall JO, Barnes PJ, Chung KF. Characterization of allergen-induced bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation in actively sensitized Brown–Norway rats. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:951–60.
- [20] Elwood W, Lötvall JO, Barnes PJ, Chung KF. Effect of dexamethasone and cyclosporin A on allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammatory cell responses in sensitized Brown–Norway rats. *Am Rev Respir Dis* 1991;145:1289–94.
- [21] Estes WK, Skinner BF. Some quantitative properties of anxiety. *J Exp Psychol* 1941;29:390–400.
- [22] File SE, Hide JR. Can social interaction be used to measure anxiety? *Br J Pharmacol* 1978;62:19–24.
- [23] File SE. How good is social interaction as a test of anxiety? In: Simon P, Soubrie P, Wildlocher D, editors. *Animal models of psychiatric disorders*. Basel: Karger, 1988. pp. 151–66.
- [24] File SE. Interaction of anxiolytic and antidepressant drugs with hormones of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Psychopharmacology of anxiolytics and antidepressants*. New York: Pergamon, 1991. pp. 29–55.
- [25] File SE. The neurochemistry of anxiety. In: Burrows GD, Norman TR, Davies B, editors. *Antianxiety agents*. Amsterdam: Elsevier, 1984. pp. 13–32.
- [26] File SE. The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. *J Neurosci Methods* 1980;2:219–38.

- [27] Gatchell RJ, Baum A. An introduction to health psychology. Reading, MA: Addison-Wesley Publishing, 1983.
- [28] Gold PW. Stress-responsive neuromodulators. *Biol Psychiatry* 1988; 24:371–4.
- [29] Gonzalez LE, Andrews N, File SE. 5-HT<sub>1A</sub> and benzodiazepine receptors in the basolateral amygdala modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevated plus-maze. *Brain Res* 1996; 732:145–53.
- [30] Gonzalez LE, File SE, Overstreet DH. Selectively bred lines of rats differ in social interaction and hippocampal 5-HT<sub>1A</sub> receptor function: a link between anxiety and depression? *Pharmacol, Biochem Behav* 1998;59:787–92.
- [31] Haczk A, Moqbel R, Jacobson M, Kay AB, Barnes PJ, Chung KF. T-cell subsets and activation in bronchial mucosa of sensitized Brown-Norway rats after single allergen exposure. *Immunology* 1995;85: 591–7.
- [32] Holgate ST. Epidemic of allergy and asthma. *Nature* 1999;402:B2–4.
- [33] Hopkins SJ, Rothwell NJ. Cytokines and the nervous system: I. Expression and recognition. *TINS* 1995;18:83–8.
- [34] Irwin M, Daniels M, Bloom ET, Smith TL, Weiner H. Life events, depressive symptoms, and immune function. *Am J Psychiatry* 1987; 144:437–41.
- [35] Irwin M, Patterson T, Smith TL, Caldwell C, Brown SA, Gillin JC, Grant I. Reduction of immune function in life stress and depression. *Biol Psychiatry* 1990;270:22–30.
- [36] Jain R, Zwickler D, Hollander CS, Brand H, Saperstein A, Hutchinson B, Brown C, Audhya T. Corticotropin-releasing factor modulates the immune response to stress in the rat. *Endocrinology* 1991; 128:1329–36.
- [37] Johnson N, Leone F. Statistical and experimental design. Engineering and physical sciences. New York: Wiley, 1974. pp. 241–4.
- [38] Kamin LJ. The effects of termination of the CS and avoidance of the US on avoidance learning: an extension. *Can J Psychol* 1957;11: 48–56.
- [39] Locke SE, Kraus L, Leserman L. Life change, stress, psychiatric symptoms, and NK activity. *Psychosom Med* 1984;46:441–53.
- [40] 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* 1989;243:83–5.
- [41] Maes M, Lin A, Delmeire L, Gastel AV, Kenis G, De Jongh R, Bosmans E. Elevated serum interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor concentrations in posttraumatic stress disorder following accidental man-made traumatic events. *Biol Psychiatry* 1999;45:833–9.
- [42] McEwen BS, Biron CA, Brunson KW, Bullock K, Chambers WH, Dhabhar FS, Goldfarb RH, Kitson RP, Miller AH, Spencer RL, Weiss JM. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interaction. *Brain Res Rev* 1997;23:79–133.
- [43] Miczek KA, Tomatzky W, Vivian JA. Ethology and neuropharmacology: rodent ultrasounds. In: Olivier B, Mos J, Slangen JL, editors. *Animal models in psychopharmacology*. Basel: Birkhauser, 1991. pp. 409–27.
- [44] Miczek KA, Weerts EM, Vivian JA, Barros HM. Aggression, anxiety and vocalizations in animals: GABA and 5-HT anxiolytics. *Psychopharmacology* 1995;121:38–56.
- [45] Molewijk HE, van der Poel AM, Mos J, van der Heyden JAM, Olivier B. Conditioned ultrasonic distress vocalizations in adult male rats as a paradigm for screening anti-panic drugs. *Psychopharmacology* 1995; 117:32–40.
- [46] Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: TH1, TH2 and more. *Immunol Today* 1996;17:138–46.
- [47] Nogueira PJ, Ferreira HHA, Antunes E, Teixeira NA. Chronic mild prenatal stress exacerbates the allergen-induced airway inflammation in rats. *Mediators Inflammation* 1999;8:119–22.
- [48] Palermo-Neto J, Guimarães RK. Pavlovian conditioning of lung anaphylactic response in rats. *Life Sci* (in press).
- [49] Rietveld S, Van-Beest I, Everaerd W. Stress-induced breathlessness in asthma. *Psychol Med* 1999;29:1359–66.
- [50] Robinson D, Hamid Q, Bentley A, Ying S, Kay AB, Durham SR. Activation of CD4<sup>+</sup> T cells, increased TH2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:313–24.
- [51] Sanches C. Effect of serotonergic drugs on footshock-induced ultrasonic vocalization in adult male rats. *Behav Pharmacol* 1993;4: 269–77.
- [52] Seligman MEP. Helplessness. San Francisco, CA: Freeman, 1975.
- [53] Theoharides TC, Spanos C, Pang X, Alferes L, Ligris K, Letourneau R, Rozniecki JJ, Webster E, Chrousos GP. Stress-induced intracranial mast cell degranulation: a corticotropin-releasing hormone-mediated effect. *Endocrinology* 1995;136:5745–50.
- [54] Tonoue T, Ashida Y, Makino H, Hata H. Inhibition of shock-elicited ultrasonic vocalization by opioid peptides in the rat: a psychotropic effect. *Psychoneuroendocrinology* 1986;11:177–84.
- [55] Tsuda A, Tanaka M, Nishikawa T, Hirai H, Paré WP. Effects of unpredictability versus loss of predictability of shock on gastric lesions in rats. *Physiol Psychol* 1984;11:287–90.
- [56] Vale W, Rivier C, Brown MR, Spiess J, Koob G, Swanson L, Bilezikjian L, Bloom F, Rivier J. Chemical and biological characterization of corticotropin-releasing factor. *Recent Prog Horm Res* 1983;39:245–70.
- [57] Vamos M, Kolbe J. Psychological factors in severe chronic asthma. *Aust NZ J Psychol* 1999;33:538–44 (Abstract).
- [58] Van der Poel AM, Miczek KA. Long temporal ultrasonic calls in male rats following mating, defeat and aversive stimulation: frequency modulation and bout structure. *Behaviour* 1991;119:127–42.
- [59] Van der Poel AM, Noach EJK, Miczek KA. Temporal patterning of ultrasonic distress calls in the adult rat: effects of morphine and benzodiazepines. *Psychopharmacology* 1989;97:147.
- [60] Webster EL, Torpy DJ, Elenkov IJ, Chrousos GP. Corticotropin-releasing hormone and inflammation. In: McCann SM, Lipton JM, Sternberg EM, Chrousos GP, Gold PW, Smith CC, editors. *Neuroimmunomodulation: molecular aspects, integrative systems, and clinical advances*. Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 840. New York: New York Academy of Sciences, 1998. pp. 21–32.
- [61] Wilder RL. Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. *Ann Rev Immunol* 1995;13:308–38.

## Effects of diazepam and stress on lung inflammatory response in OVA-sensitized rats

CARLOS DE PAULA PORTELA,<sup>1</sup> IOLANDA DE F. L. C. TIBÉRIO,<sup>2</sup>  
EDNA A. LEICK-MALDONADO,<sup>2</sup> MILTON A. MARTINS,<sup>2</sup> AND JOÃO PALERMO-NETO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Applied Pharmacology and Toxicology Laboratory, School of Veterinary Medicine; and <sup>2</sup>Department of Medicine, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil 05508-900

Received 4 September 2001; accepted in final form 11 December 2001

**De Paula Portela, Carlos, Iolanda de F. L. C. Tibério, Edna A. Leick-Maldonado, Milton A. Martins, and João Palermo-Neto.** Effects of diazepam and stress on lung inflammatory response in OVA-sensitized rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L1289–L1295, 2002; 10.1152/ajplung.00352.2001.—The influence of stress and diazepam treatment on airway inflammation was investigated in ovalbumin (OVA)-sensitized rats. Animals were injected with OVA plus aluminum hydroxide intraperitoneally (*day 0*) and boosted with OVA subcutaneously (*day 7*). From the first to 13th day after sensitization, rats were treated with diazepam, and 1 h later they were placed in a shuttle box where they received 50 mild escapable foot shocks/day preceded by a sound signal (S). Response during the warning (S) canceled shock delivery and terminated the S. On *day 14*, rats were submitted to a single session of 50 inescapable foot shocks preceded by S and then were challenged with OVA. High levels of stress were detected in shocked animals, manifested as ultrasonic vocalizations. Morphometric analysis of stressed animals revealed a significant increase in both edema and lymphomononucleated cells in airways compared with controls. Diazepam treatment reduced edema in stressed and nonstressed rats. No differences were found in polymorphonucleated cell infiltration. Diazepam treatment reduced lymphomononucleated cell infiltration in stressed animals. These data suggest that stress and diazepam treatment play relevant roles in edema and lymphomononucleated airway inflammation in OVA-sensitized rats.

ovalbumin; allergic inflammation; peribronchial edema; lymphomononucleated cells; aversive stimulation; asthma

THE NEUROENDOCRINE AND IMMUNE systems play relevant roles in the maintenance of homeostasis. Control of immunological responses has been traditionally viewed in terms of the mutual interactions among immunocompetent cells, hormones, cytokines, and peptides. A number of recent studies are now showing that emotional states such as anxiety and stress can also influence the onset, course, and treatment of several diseases, including atopic diseases such as asthma. Studies of the emotional impact on the immune responses usually employ animal models of aversive

stimulation (e.g., escapable and/or inescapable foot shocks), which allow more appropriate and complete analysis of the several endogenous variables that interact with antigen-induced inflammatory response (40–42). These approaches suggest that the ability of an organism to control a stressful situation is a critical factor in the immune response (19, 40).

Several studies conducted in the past four decades have tried to analyze the relevant interactions between emotional or psychopathological disorders and allergic and/or chronic diseases such as asthma (29, 37, 38, 52, 58). Asthma is an allergic disease characterized by an inflammation of the airways together with intermittent episodes of reversible bronchospasm (9, 21, 35). Anecdotal reports of the occurrence of stressful events before or together with the onset of a crisis in asthmatic patients are commonly heard (43). In addition, prolonged stressful situations (e.g., family conflicts) have been reported to exacerbate asthmatic crises (58). Animal models of lung anaphylactic response point in the same direction (38, 42).

Benzodiazepines (BDZ) reduce anxiety and stress responses by acting on high-affinity receptor sites present in the central nervous system (CNS). Because of this effect, they are one of the most frequently used class of psychotropic drugs worldwide (46). Nevertheless, besides the central receptors described for BDZ, peripheral-type binding sites (PBR) have also been identified for them in the endocrine steroidogenic tissues, immune organs, and in cells such as macrophages and lymphocytes (39, 48, 60).

By acting on PBR, BDZ such as diazepam have been reported to modify the cytokine network, as indicated by changes in interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-6, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interferon- $\gamma$  (60). Probably because of this, diazepam treatment was reported to decrease macrophage spreading and phagocytosis (27) and to decrease carrageenin-induced paw edema in rats (24, 25). Stimulation of PBR present in adrenal cells was reported to increase glucocorticoid production (60), and this hor-

Address for reprint requests and other correspondence: J. Palermo-Neto, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, No. 87, CEP: 05508-900 Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.



mone is known to have potent immunosuppressive and anti-inflammatory properties (5, 28).

The present experiment was designed to study the relationships among anxiety/stress response, diazepam treatment, and lung allergic inflammation. Specifically, ovalbumin (OVA)-sensitized rats were submitted once daily to a mild foot-shock stress and/or to diazepam treatment (2.0 mg/kg) for 14 days. Immediately after the last aversive stimulation, animals were submitted to a 1% OVA inhalation challenge and killed for the determination of lung inflammatory response.

## METHODS

**Animals.** Twenty pathogen-free and genetically similar male Wistar rats, weighing 250–300 g and ~80–90 days of age, from our colony were used. The animals were housed in temperature-controlled (21–23°C) and artificially lit rooms on a 12:12-h light-dark cycle (lights on at 7:00 AM) and had free access to food and water. The experiments were performed in a different room, kept at a similar temperature as the animal colony, to which the animals were transferred and maintained in their home cages 2 wk before the experiments. 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). Each animal was used only once.

**Drugs.** Diazepam (Cristalia do Brasil) diluted in 40% propylene glycol-Ringer solution was administered at the dose of 2.0 mg/kg ip. This diazepam dose is in the same range of BDZ doses reported to modify immune reaction (48, 49). A 40% propylene glycol-Ringer solution (1.0 ml/kg) was used as the control solution.

**OVA sensitization and challenge.** Sensitization procedures and aerosol challenge were performed according to Coleman et al. (11). Briefly, animals were actively sensitized by an intraperitoneal injection of 0.66 ml of a suspension of 1 mg OVA (egg albumin grade II, Sigma) plus 300 mg aluminum hydroxide [Al(OH)<sub>3</sub>] in 0.9% (wt/vol) NaCl. This was considered to be *day 0* of sensitization. Seven days after sensitization, the animals were boosted subcutaneously with an identical injection of aluminum-precipitated OVA. The aluminum precipitate acts as an adjuvant to promote IgE production (26).

The OVA-aerosol challenge was performed by placing the rats individually in a 7.2-l polyurethane chamber connected to an Inalamax nebulizer (model S3; Inalamax NS Indústria de Aparelhos Médicos, São Paulo, Brazil), which generated an aerosol mist pumped into the exposure chamber by the airflow supplied by a small-animal ventilator set at 60 strokes/min, with an output volume of 10 ml. All control (nonshocked) and experimental (shocked) rats were exposed to 1% OVA aerosol for 15 min and studied 24 h later for lung inflammatory edema response.

**Anxiogenic stimulation.** Foot shock is known to induce anxiety and/or stress (1, 2). The anxiogenic stimulation was used here as suggested by De Vry et al. (14), with modifications. A shuttle box (model E 10-16 rat shuttle cage; Coulbourn Instruments, Allentown, PA) housed inside a sound-attenuation chamber was employed. Sixty minutes before the anxiogenic stimulation, the animals were treated with 2.0 mg/kg of diazepam [diazepam-treated and shocked (Sdz) and diazepam-treated and nonshocked (Cdz) groups] or with 1.0 mg/kg of control solution [vehicle-treated and shocked (Sve)

and vehicle-treated and nonshocked (Cve) groups]. For aversive stimulation, rats were placed individually inside the shuttle box, where they received 50 escapable foot shocks (0.5 mA scrambled shocks of 5 s) through an electrified grid floor during a 30-min session. The following schedule was used: 1) a discriminative signal (S) (6 dB tone cue of 2 s) preceded the escapable foot shock; 2) each trial (tone and shock) was repeated 50 times, with an interval of 28 s between trials; 3) the set of shocks (50 trials) was repeated daily. Therefore, this shock session was repeated 13 times, beginning on sensitization *day 1* and lasting until sensitization *day 13*. A response during the warning (S) canceled the shock delivery and terminated the S. Every shock was avoided when the responses occurred during both S and grid shocks. This discriminated-avoidance procedure has been reported to provide higher levels of acquisition and maintenance of responsiveness than the classical conditioning method (32). On sensitization *day 14*, Sve and Sdz animals were submitted to a single session of 50 inescapable foot shocks, discriminated by the same S and with an intertrial interval of 28 s. Animals from Cdz and Cve groups (nonshocked) were similarly placed in the shuttle box for the same period of time but without aversive stimulation.

A 3-min adaptation time in the shuttle box was provided to both control and stressed rats, i.e., the stimuli (sound or sound plus foot shock) started to be delivered 3 min after the animals were placed in the apparatus. All sessions in the operant chamber were controlled by LZT2 System software (Coulbourn, Allentown, PA) installed on an IBM-compatible computer placed in an adjacent room.

**Behavioral measurements.** Ultrasonic vocalizations (UV) by a rat are a known display of anxiety and/or stress levels (3). This behavioral parameter was evaluated in the present study. UV consist of many short calls, homogeneously distributed over the total duration of the shock session (53), and were recorded here, as suggested by De Vry et al. (14). For this purpose, a microphone (D 940, Pettersson Elektronik, Uppsala, Sweden) was placed in the middle of the ceiling of the shuttle box. This microphone was connected to an amplifier and to a band-pass filter that selected UV (35 dB, 20–35 kHz). The output was made visible and audible on an oscilloscope and through an earphone, respectively. A computer controlled the duration of the UV recording session; the frequency and amplitude of the UV delivered by each rat were measured with software (R900, Pettersson Elektronik). UV were detected during the adaptation period and during the first 10 min of all 14 shock sessions; recordings were made between 8:00 AM and 12:00 PM.

**Experimental design.** Twenty-four hours after sensitization (*day 0*), the rats were divided equally and at random into two experimental (Sve and Sdz) and two control (Cve and Cdz) groups. Animals of the Sdz and Cdz groups were given diazepam (2.0 mg/kg) and those of the Sve and Cve groups control solution (1.0 mg/kg) from *day 1* to *day 14* postsensitization. Aversive stimulation was performed from *day 1* to *14* on rats of the Sve and Sdz groups, 1 h after diazepam or control solution treatment; on those days, animals of the Cve and Cdz groups were placed in the shuttle box without aversive stimulation. UV were measured daily in animals from all groups during the first 10 min of placement inside the shuttle box. All animals were submitted to an OVA challenge immediately after the discriminated inescapable foot shock (sensitization *day 14*), and 24 h after the OVA challenge all animals were deeply anaesthetized with chloral hydrate (10%, 3 ml/kg ip). After anesthesia, the peritoneal cavity was opened, and the animals were exsanguinated by incision of the abdominal aorta. The lungs were then imme-



diately removed and fixed in 10% formaldehyde. Sections representing peripheral areas of the lungs were obtained and processed for paraffin embedding. Histological sections of 5  $\mu\text{m}$  were obtained and stained with hematoxylin and eosin.

**Morphometric analysis of peribronchial edema.** Peribronchial edema in noncartilaginous airways was measured using the point-counting technique, as previously described (50). Transversely sectioned airways were selected and examined with a light microscope (Nikon) equipped with an integrating eyepiece with 100 points and 50 lines; the airways were focused at  $\times 1,000$ . The number of points of the integrating eyepieces falling on areas of edema was counted in three randomly selected areas of airway wall.

**Lung histopathological examination.** The same lungs used to determine peribronchial edema indexes were used to evaluate polymorphonucleated (PMN) and lymphomononucleated (LMN) cell infiltration. The hematoxylin-stained cells were counted under a light microscope with an integrating eyepiece and expressed as cells/unit area ( $10^4 \mu\text{m}^2$ ).

**Passive cutaneous anaphylaxis.** Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) reactions were produced by the technique of Mota and Wong (34). Briefly, sera from sensitized rats used in the present study were serially diluted and injected intradermally (100  $\mu\text{l}$ /site) into the shaved dorsal skin of nonsensitized naive rats. After 24 h, the animals were injected intravenously with 1 ml of a solution containing 500  $\mu\text{g}$  of OVA plus 2.5 mg of Evans blue in 0.9% NaCl. Thirty minutes later, the rats were deeply anesthetized with ether and killed; the skin was removed, and the diameter of the dye stain measured on the inner surface of the skin. The PCA titers represent the highest dilution of the serum that gave a dye stain of more than 5 mm in diameter.

**Data analysis.** Bartlett's test (22) showed that the data concerning OVA-specific antibody levels were parametric ( $P < 0.05$ ). Thus one-way ANOVA followed by Tukey's test was used to analyze these data. Data on edema indexes and cellular infiltration were nonparametric and therefore were analyzed by Kruskal-Wallis (KW) ANOVA. Data on ultrasonic vocalization were transformed into percentage and analyzed by Fisher's test. Both the Graphpad InStat Statistical package and the SigmaStat software were used, with the level of significance set at  $P < 0.05$  for all comparisons.

## RESULTS

**UV.** All stressed animals (Sve and Sdz groups) exhibited UV during the intertrial intervals of the discriminated foot shocks, whereas unconditioned and nonshocked rats (Cve and Cdz groups) did not display UV within the test chamber (Sve = 100%, Sdz = 100%, Cve = 0%, Cdz = 0%). Analysis of animal behavior during the first 3 min after placement inside the experimental cage revealed that UV often occurred within the period of adaptation to the shuttle box, a fact suggesting the occurrence of a conditioned emotional response (CER) in stressed rats.

**Antibody titers due to PCA.** Figure 1 shows the results obtained by PCA in naive rats that received serum from OVA-sensitized rats after the aerosol challenge. As can be seen, immune serum data did not differ between groups, i.e., both foot shock and diazepam treatment were unable to change antibody production by the rats.

**Morphometric analysis of peribronchial edema.** Photomicrographs of the airway wall of stressed and non-

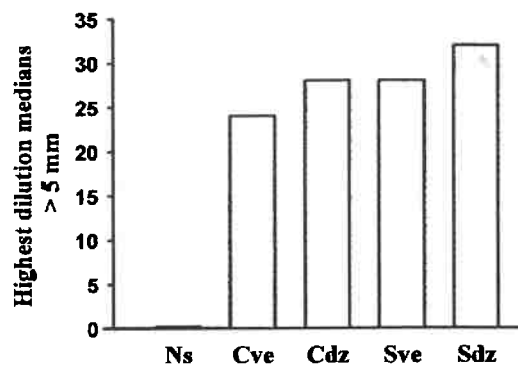
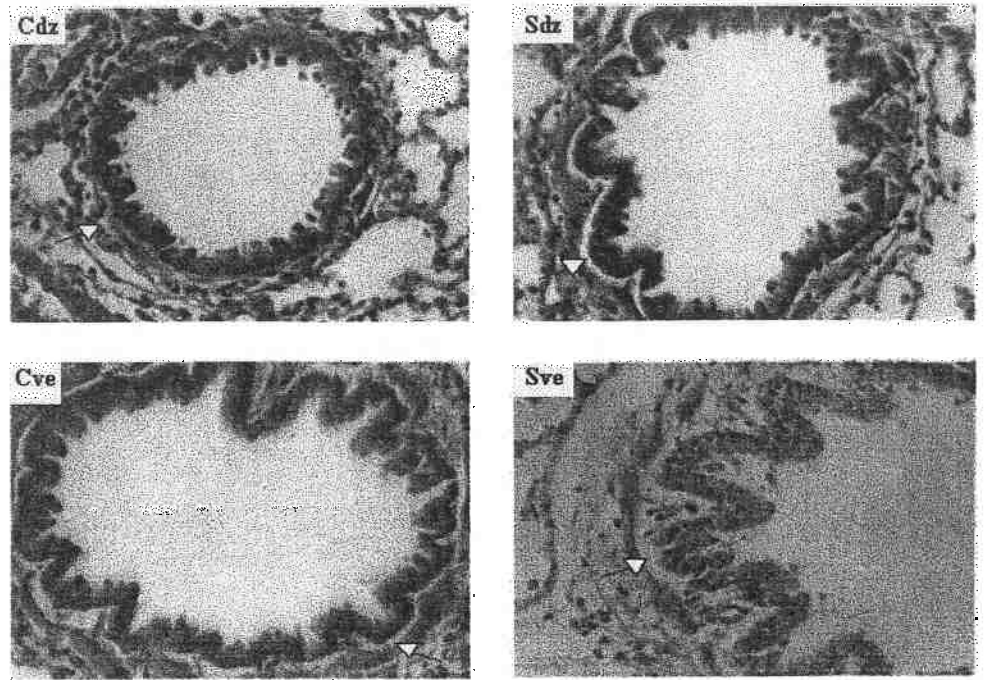


Fig. 1. Passive cutaneous anaphylaxis reaction from non-ovalbumin (OVA)-sensitized rats (Ns) and from OVA-sensitized rats after an aerosol challenge. Serum taken from control animals treated with vehicle (Cve) or diazepam (Cdz) and from stressed animals treated with vehicle (Sve) or diazepam (Sdz) was serially diluted and intradermally injected into naive rats. After 24 h, the antigen (OVA) was injected intravenously together with Evans blue dye, and the animals were killed 30 min later. Results are expressed as the reciprocal of the highest dilution of the immune serum that produced a lesion of  $> 5$  mm in diameter. Data represent the median of 5 animals/group. No statistically significant differences were found among groups.

stressed rats are presented in Fig. 2. As expected, OVA inhalation by OVA-sensitized rats induced a peribronchial edema characterized by the presence of liquid extravasation in the space between bronchial epithelial cells and the outer limit of the airway wall in rats from the diazepam-treated groups (Sdz and Cdz). Nevertheless, the data obtained for the various groups were quite different. Indeed, as presented in Fig. 3, quantification of the OVA-induced edema showed significant differences in the data of the animals from the four groups ( $\text{KW}_{3,17} = 106.5$ ,  $P < 0.001$ ). Thus 1) foot shock increased ( $P < 0.05$ ) the edema indexes of stressed rats (Sve group) in relation to those measured in the animals of the control group (Cve group); 2) diazepam treatment decreased the indexes of edema in stressed (Sdz group) and nonstressed (Cdz group) animals in relation to those measured in animals that received control solution (Cve and Sve); 3) no differences were found between the edema indexes of rats of the Sdz and Cve groups; i.e., diazepam treatment antagonized the effect of foot shock on edema indexes.

**Lung histopathological examination.** Figure 4 depicts the number of PMN cells found in the airway wall of stressed (Sve and Sdz) and nonstressed (Cve and Cdz) rats treated or not with diazepam. No significant differences were observed ( $\text{KW}: 4.1_{3,17}$ ,  $P = 0.257$ ) in mean PMN cell numbers found around the airways of the rats of the four groups studied. On the other hand, the number of LMN cells found on the airway wall of Sve animals was significantly greater ( $\text{KW}_{3,17} = 21.6$ ,  $P < 0.001$ ) than that found in Sdz animals and in the control groups treated or not with diazepam (Cve and Cdz). Furthermore, diazepam treatment significantly reduced the LMN cell infiltration (Sdz group) compared with that found in Sve animals ( $P < 0.001$ ). No differences were found among the Cve, Cdz, and Sdz

Fig. 2. Photomicrography of bronchial mucosa stained with hematoxylin and eosin obtained from OVA-sensitized rats 24 h after antigen challenge. *Left*: nonstressed rats treated with diazepam (Cdz) and vehicle (Cve). *Right*: stressed animals treated with diazepam (Sdz) and vehicle (Sve). White arrows indicate edema areas. Note the presence of different areas of peribronchial edema in the 4 groups (same magnification,  $\times 400$ ).



groups. Finally, no differences were found between the Cve and Cdz groups (Fig. 5).

**DISCUSSION**

Interactions between stress and immune response are undoubtedly complex, and different types of stressors might induce different immune system responses (16). In this context, stress is defined as a complex process by which an organism responds to either external environmental or psychological events that pose a challenge or danger to the organism (40). The stressful stimulus will be referred to as "stressor" and the response as the "stress response."

The stressor employed here through the use of an escapable/inescapable foot-shock schedule triggered a UV of 20–35 kHz, which has already been referred to as an anxiogenic vocalization (13). The range of fre-

quencies and the long duration of most of the calls reported in the present study are in accordance with data described previously (3, 31, 42). Furthermore, after the second day of training, UV also appeared during the period of habituation to the shuttle box in the complete absence of aversive stimulation. These findings strongly suggest that a Pavlovian conditioning was imposed, i.e., that the environmental context (conditioned stimulus) associated with the previously given foot shocks (unconditioned stimulus) was sufficient to induce UV (42). These calls already described as a CER by Miczek et al. (30) may be interpreted as an affective expression of a stress response (31). However, diazepam treatment did not inhibit UV emissions; most probably, the intensity of the aversive stimulation now employed was too high to be antagonized by this diaz-

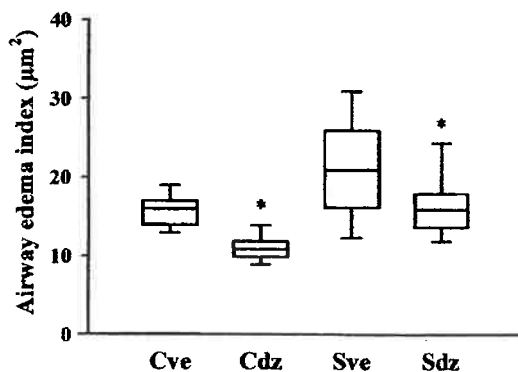


Fig. 3. Box plots of the data related to peribronchial edema indexes obtained from lungs of stressed (Sve and Sdz) and nonstressed (Cve and Cdz) rats treated (Cdz and Sdz) or not (Cve and Sve) with diazepam. Results are expressed per unit area ( $10^4 \mu\text{m}^2$ ). \* $P < 0.05$  (Kruskal-Wallis 1-way ANOVA).

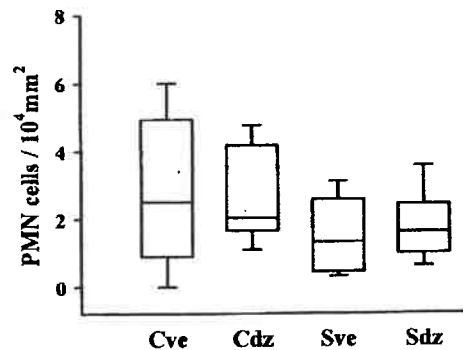


Fig. 4. Box plots of the data related to the polymorphonucleated (PMN) cells present on the airway walls obtained from lungs of stressed (Sve and Sdz) and nonstressed (Cve and Cdz) rats treated (Cdz and Sdz) or not (Cve and Sve) with diazepam. Results are expressed per unit area ( $10^4 \mu\text{m}^2$ ). No significant differences were found among data of the different groups (Kruskal-Wallis 1-way ANOVA).

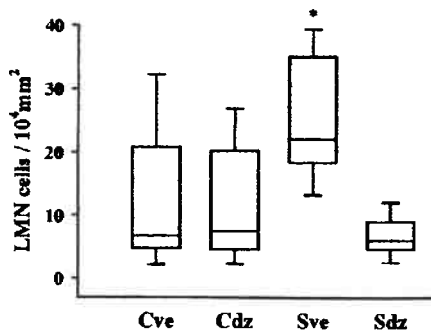


Fig. 5. Box plots of the data related to the lymphomononucleated (LMN) cells present on the airway walls obtained from lungs of stressed (Sve and Sdz) and nonstressed (Cve and CdZ) rats treated (CdZ and Sdz) or not (Cve and Sve) with diazepam. Results are expressed per unit area ( $10^4 \mu\text{m}^2$ ).  $P < 0.001$  in relation to data of the different groups (Kruskal-Wallis 1-way ANOVA).

epam dose. Alternatively, the behavioral model used here is not appropriate to display these effects of diazepam (33, 47). Indeed, it is common knowledge that diazepam effects are not detected in all animal models of anxiety (12).

As expected, OVA sensitization was observed in animals of all groups, and the experimental manipulations were unable to change antibody production among animals of the different groups, suggesting that the observed changes in inflammatory responses were not a consequence of different levels of OVA-specific antibodies.

We observed an increase in peribronchial edema formation in the stressed group (Sve), suggesting that emotional aspects could be involved in peribronchial edema formation. The diazepam treatment reduced peribronchial edema, and this observation could be related to an effect of diazepam on the immune/inflammatory responses. This fact is in keeping with our previous data, which showed that stress/anxiety levels were relevant for the onset, intensity, and maintenance of a lung anaphylactic response (42).

It is common knowledge that high levels of stress are positively correlated with serum glucocorticoid hormone levels; i.e., high levels of corticosterone or cortisol were found during the course of a stress response (5, 6, 10). Thus at first sight, the increment in edema indexes observed here may seem unreliable. Indeed, glucocorticoids are largely known to have anti-inflammatory properties (54). However, the relationships among glucocorticoid hormones, stress, and IgE-mediated inflammation are not so simple, and a long-term aversive stimulation was used in the present study. There is recent experimental evidence showing that chronic mild unpredictable prenatal stress produces an increment in the allergen-induced airway inflammation in the rat offspring (36, 42).

It was now observed that diazepam treatment reduced the airway edema in both stressed (Sdz) and nonstressed (CdZ) rats; thus the effects of diazepam may not be attributed to an effect on the CNS. In fact, diazepam binding to PBR found on immune cells such

as macrophages (59) and lymphocytes (51) was reported to change the expression and release of several cytokines (48) and cell products (51), whose effects strongly influence the immune/inflammatory response (8, 20, 44). Furthermore, PBR are also present in adrenal cells and have been reported to increase endogenous glucocorticoid production (24, 39).

Thus our results are suggesting a relevant role for PBR in diazepam-induced changes in airway inflammation. Lazzarini et al. (24) showed that diazepam reduced carrageenin-induced paw edema and also the volume of the pleural exudate, leukocyte count, and vascular permeability in carrageenin-injected rats.

In this experiment, the number of PMN was not changed by stress or diazepam treatment. Thus it seems feasible to suppose that these cells are not involved in the changes in OVA-induced airway inflammation observed here.

We observed that diazepam treatment reduced the number of LMN cells around the airways in rats submitted to stress stimulation (Sdz group). Laitinen et al. (23) reported an increased number of lymphocytes, mainly CD4<sup>+</sup> T cells, on the airway wall of mildly asthmatic patients (44). Walker et al. (55) found in humans a close relationships between T cell activation and the severity of asthmatic symptoms in humans.

Glucocorticoids have been the mainstay treatment of moderate and severe persistent asthma (35) and have been known to inhibit lymphocyte/leukocyte proliferation, migration, and cytotoxicity; in vitro and in vivo studies have suggested that they suppress the secretion of certain cytokines (7, 17, 18, 45). Although glucocorticoids suppress the release of histamine by mast cells, they also act on lymphocytes, inducing a T helper 2 (Th2) response. In fact, glucocorticoid hormone activation would modulate Th1/Th2 switching and thus the intensity of the inflammatory response. This hormone also modifies the expression, production, and release of adhesion molecules and immunoglobulins (15). On the other hand, corticosterone has been shown to act synergistically with endogenous cytokines (56). Thus diazepam may directly or indirectly alter the production and release of cytokines, hence affecting the lung inflammatory response.

Diazepam treatment per se (CdZ) was unable to decrease the number of LMN cells. As described above, peribronchial edema indexes were depressed by diazepam treatment alone (CdZ), which also antagonized stress-induced changes in airway edema (Sdz). Thus it seems that the effects of diazepam on edema are not directly related to those induced by this drug on LMN cell infiltration. However, caution must be exercised with this simplistic interpretation since diazepam effects on both peribronchial edema and immune cell infiltration might differ in terms of time.

The effects of diazepam on the stress-induced increment of LMN cells are not simple to explain, but cytokines seem to play a pivotal role in this observed phenomenon (4). Because diazepam per se was unable to change LMN cell number, it seems feasible to suggest the occurrence of an antagonism induced by this

BDZ on glucocorticoid effects on the cytokine cascade and/or on Th1/Th2 switching. Indeed, diazepam and/or glucocorticoids modify cytokine expression and release (60), favoring Th1- or preventing Th2-like responses, and thus modulate the intensity of the immune/inflammatory response (57).

In the light of the present findings, it is not possible to state the effects of foot shock and/or of diazepam on Th1/Th2 responses. Nevertheless, whatever this answer might be, the present findings clearly show an effect for both stress and diazepam on lung inflammatory response, a fact that reinforces the relevance of the studies on CNS-immune system relationships.

The authors thank Dr. Benjamin Eurico Malucelli, University of São Paulo, for relevant suggestions about this experiment.

This study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (99/04228-7) and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior, to whom the authors express sincere thanks.

#### REFERENCES

- Abbott BB, Schoen LS, and Badia P. Predictable and unpredictable shock: behavioral measures of aversion and physiological measures of stress. *Psychol Bull* 96: 45-71, 1984.
- Arthur AZ. Stress of predictable and unpredictable shock. *Psychol Bull* 100: 379-383, 1986.
- Aubin T and Bremond JC. Perceptions of distress call harmonic structure by the starling (*Sturnus vulgaris*). *Behaviour* 120: 151-163, 1992.
- Barnes PJ. Cytokines as mediators of chronic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 150: S42-S49, 1994.
- Besedovsky HO, del Rey A, Sorkin E, and Dinarello CA. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 233: 652-654, 1986.
- Besedovsky HO and del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypothesis. *Endocr Rev* 17: 64-102, 1996.
- Blotta MH, DeKruyff RH, and Umetsu DT. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4<sup>+</sup> lymphocytes. *J Immunol* 158: 5589-5595, 1997.
- Broide D, Paine MM, and Firestein GS. Eosinophils express interleukin-5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA at sites of allergic inflammation in asthmatics. *J Clin Invest* 90: 1414-1424, 1992.
- Busse WW and Lemansky JRF. Asthma. *N Engl J Med* 344: 350-362, 2001.
- Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 332: 1351-62, 1995.
- Coleman JW, Layton GT, and Stanworth DR. The kinetics of in vivo sensitization of rat peritoneal and lung mast cells: temporal dissociation from circulating levels of IgE. *Eur J Immunol* 13: 994-998, 1983.
- Comissaris RL. Conflict behaviors as animal models for the study of anxiety. In: *Methods in Behavioral Pharmacology*, edited by Haaren F. New York: Elsevier Science, 1993, p. 443-474.
- Cuomo V, Cagiano R, De Salvia MA, Maselli MA, Renna G, and Racagni G. Ultrasonic vocalization in response to unavoidable aversive stimuli in rats: effects of benzodiazepines. *Life Sci* 43: 485-489, 1988.
- De Vry J, Benz U, Shreiber R, and Traber J. Shock-induced ultrasonic vocalization in young adult rats: a model for testing putative anti-anxiety drugs. *Eur J Pharmacol* 249: 331-339, 1993.
- Descotes J, Tedone R, and Evreux C. Suppression of humoral and cellular immunity in normal mice by diazepam. *Immunol Lett* 5: 41-43, 1982.
- Dhabhar FS and McEwen BS. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a pivotal role for leukocyte trafficking. *Brain Behav Immun* 11: 286-306, 1997.
- Elenkov IJ and Chrousos GP. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *Trends Endocrinol Metab* 10: 359-368, 1999.
- Elenkov IJ, Papanicolaou DA, Wilder RA, and Chrousos GP. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. *Proc Assoc Am Physicians* 108: 374-381, 1996.
- Gold PW. Stress-responsive neuromodulators. *Biol Psychiatry* 24: 371-374, 1988.
- Haczku A, Moqbel R, Jacobson M, Kay AB, Barnes PJ, and Chung KF. T-cell subsets and activation in bronchial mucosa of sensitized Brown-Norway rats after single allergen exposure. *Immunology* 85: 591-597, 1995.
- Holgate ST. Epidemic of allergy and asthma. *Nature* 402: B2-B4, 1999.
- Johnson N and Leone F. *Statistical and Experimental Design*. New York: Wiley, 1974, p. 241-244.
- Laitinen LA, Laitinen A, and Haahela T. Airflow mucosal inflammation even in patients with newly diagnosed asthma. *Am Rev Respir Dis* 147: 697-704, 1993.
- Lazzarini R, Malucelli BE, and Palermo-Neto J. Reduction of acute inflammation in rats by diazepam: role of peripheral benzodiazepine receptors and corticosterone. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 23: 253-265, 2001.
- Lazzarini R, Paulino CA, Malucelli BE, and Palermo-Neto J. Effects of high doses of diazepam on carrageenin-induced paw edema in rats. *Braz J Med Biol Res* 29: 1525-1529, 1996.
- MacQueen G, Marshall J, Perdue M, Siegel S, and Bienstock J. Pavlovian conditioning of rat mucosal mast cells to secrete rat mast cell protease II. *Science* 243: 83-85, 1989.
- Massoco CO and Palermo-Neto J. Diazepam effects on peritoneal macrophage activity and corticosterone serum levels in Balb/C mice. *Life Sci* 65: 2157-2165, 1999.
- McEwen BS, Biron CA, Brunson KW, Bullock K, Chambers WH, Dhabhar FS, Goldfarb RH, Kitson RP, Miller AH, Spencer RL, and Weiss JM. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interaction. *Brain Res Rev* 23: 79-133, 1997.
- Mello-Filho, J. *Psicossomática hoje*. Porto Alegre, Brazil: Artes Médicas Sul, 1992, p. 119-151.
- Miczek KA, Tornatzky W, and Vivian JA. *Ethology and Neuropharmacology: Rodent Ultrasounds*. Basel: Birkhauser, 1991, p. 409-427.
- Miczek KA, Weerts EM, Vivian JA, and Barros HM. Aggression, anxiety and vocalizations in animals: GABA<sub>A</sub> and 5-HT anxiolytics. *Psychopharmacology (Berl)* 121: 38-56, 1995.
- Millenson JR and Leslie JC. *Principles Of Behavioral Analysis*. New York: MacMillan, 1979, p. 25-47.
- Molewijk HE, van der Poel AM, Mos J, van der Heyden JAM, and Olivier B. Conditioned ultrasonic distress vocalizations in adult male rats as a behavioural paradigm for screening anti-panic drugs. *Psychopharmacology (Berl)* 117: 32-40, 1995.
- Mota I and Wong D. Homologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. *Life Sci* 8: 813-820, 1969.
- National Heart, Lung, and Blood Institute. *New NHLBI Guidelines for Diagnosis and Management of Asthma*. Lippincott Health Promo Lett 2, 1997.
- Nogueira PJ, Ferreira HHA, Antunes E, and Teixeira NA. Chronic mild prenatal stress exacerbates the allergen-induced airway inflammation in rats. *Mediators Inflamm* 8: 119-122, 1999.
- Oswald NC, Waller RE, and Drinkwater J. Relationship between breathlessness and anxiety in asthma and bronchitis: a comparative study. *Br Med J* 2: 14-17, 1970.
- Palermo-Neto J and Guimarães RK. Pavlovian conditioning of lung anaphylactic response in rats. *Life Sci* 68: 611-623, 2000.
- Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. *Endocr Rev* 14: 222-240, 1993.

40. **Paré WP and Glavin GB.** *Animal models of stress in pharmacology.* New York: Elsevier Science, 1983.
41. **Persoons JHA, Berkenbosch F, Schornagel K, Thepen T, and Kraal G.** Increased specific IgE production in lungs after the induction of acute stress in rats. *J Allergy Clin Immunol* 95: 765–770, 1995.
42. **Portela CP, Massoco CO, Tavares de Lima W, and Palermo-Neto J.** Stress-induced increment on total bronchoalveolar count in OVA-sensitized rats. *Physiol Behav* 72: 415–420, 2001.
43. **Rietveld S, Van-Beest I, and Everaerd W.** Stress-induced breathlessness in asthma. *Psychol Med* 29: 1359–1366, 1999.
44. **Robinson D, Hamid Q, Bentley A, Ying S, Kay AB, and Durham SR.** Activation of CD4<sup>+</sup> T cells, increased Th2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 92: 313–324, 1993.
45. **Roitt IM, Brostoff J, and Male DK.** *Imunologia.* São Paulo: Manole, 1994, p. 8–11.
46. **Ruiz I, Offermanns J, Lanctot KL, and Busto U.** Comparative study on benzodiazepine use in Canada and Chile. *J Clin Pharmacol* 33: 124–125, 1993.
47. **Sanches C.** Effect of serotonergic drugs on footshock-induced ultrasonic vocalization in adult male rats. *Behav Pharmacol* 4: 269–277, 1993.
48. **Schlumpf M, Lichtensteiger W, and Loveren H.** Impaired host resistance to *Trichinella spiralis* as a consequence of prenatal treatment of rats with diazepam. *Toxicology* 94: 223–229, 1994.
49. **Schreiber AA, Frei K, Lichtensteiger W, and Schlumpf M.** The effect of prenatal diazepam exposure on TNF- $\alpha$  production by rat splenocytes. *Agents Actions* 38: 265–272, 1993.
50. **Tibério IFLC, Turco GMG, Leick-Maldonado EA, Sakae RS, Paiva PSO, Warth MPTN, Lapa e Silva JR, Saldiva PHN, and Martins MA.** Effects of neurokinin depletion on airway inflammation induced by chronic antigen exposure. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 1739–1747, 1997.
51. **Torres SR, Fröde TS, Nardi GM, Vita N, Reeb R, Ferrara P, Ribeiro-do-Valle RM, and Farges RC.** Anti-inflammatory effects of peripheral benzodiazepine receptor ligands in two mouse models of inflammation. *Eur J Pharmacol* 408: 199–211, 2000.
52. **Vamos M and Kolbe J.** Psychological factors in severe chronic asthma. *Aust NZ J Psychiatry* 33: 584–544, 1999.
53. **Van der Poel AM and Miczek KA.** Long temporal ultrasonic calls in male rats following mating, defeat and aversive stimulation: frequency modulation and bout structure. *Behaviour* 119: 127–142, 1991.
54. **Van der Velden VHJ.** Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma. *Mediators Inflamm* 7: 229–237, 1998.
55. **Walker C, Kaegi MK, Braun P, and Blaser K.** Activated T cells and eosinophils in bronchoalveolar lavage from subjects with asthma correlated with disease severity. *J Allergy Clin Immunol* 88: 935–942, 1991.
56. **Wiegers GJ and Reul JMHM.** Induction of cytokine receptors by glucocorticoids: functional and pathological significance. *Trends Pharmacol Sci* 19: 317–321, 1998.
57. **Wilder RL.** Neuroendocrine-immune system interactions and auto-immunity. *Annu Rev Immunol* 13: 308–338, 1995.
58. **Yellowlees PM and Kalucy RS.** Psychobiological aspects of asthma and consequent research implications. *Chest* 97: 628–634, 1990.
59. **Zavala F, Haumont J, and Lenfant M.** Interaction of benzodiazepines with mouse macrophages. *Eur J Pharmacol* 106: 561–566, 1987.
60. **Zavala F, Tupin V, and Descamps-Latscha B.** In vivo treatment with benzodiazepines inhibits murine phagocyte oxidative metabolism and production of Interleukin-1 tumor necrosis factor and Interleukin-6. *J Pharmacol Exp Ther* 225: 442, 1990.