UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINARIA E ZOOTECNIA

ILANA GABANYI

# Identificação de uma comunicação bidirecional entre neurônios e macrófagos intestinais via receptores β2 adrenérgicos

São Paulo
2015

ILANA GABANYI

# Identificação de uma comunicação bidirecional entre neurônios e macrófagos intestinais via receptores β2 adrenérgicos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do titulo de doutor em ciências

**Departamento:**

Patologia

**Área de Concentração:**

Patologia Experimental e Comparada

**Orientador:**

Prof. Dr. Frederico Azevedo da Costa Pinto

São Paulo
2015

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

**DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO**

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

T.3174
FMVZ

Gabanyi, Ilana
Identificação de uma comunicação bidirecional entre neurônios e macrófagos intestinais via receptores β2 adrenérgicos / Ilana Gabanyi. -- 2015.
62 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento Patologia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Azevedo da Costa Pinto.

1. Macrófagos intestinais. 2. Sistema nervoso entérico. 3. Norepinefrina. 4. Arginase. 5. Receptores β2 adrenérgicos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

*Comissão de Ética no uso de animais*

# CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "O papel da regulação neuroimune no surgimento e evolução da doença intestinal inflamatória", protocolado sob o nº 2312/2011, utilizando 147 (cento e quarenta e sete) camundongos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Frederico Azevedo da Costa Pinto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/8/2011.

We certify that the Research "The role of neuroimunne regulation in the onset and progression of experimental inflammatory bowel disease", protocol number 2312/2011, utilizing 147 (one hundred forty-seven) mice, under the responsibility Prof. Dr. Frederico Azevedo da Costa Pinto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/17/2011.

São Paulo, 31 de agosto de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676
Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

**FOLHA DE AVALIAÇÃO**

Autor: GABANYI, Ilana

Título: **Identificação de uma comunicação bidirecional entre neurônios e macrófagos intestinais via receptores β2 adrenérgicos**

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

Data: _____/_____/_____

**Banca Examinadora**

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

# AGRADECIMENTOS

Agradeço à FAPESP (09/51886-3, 2011/21856-5, 2012/11165-8) e ao CNPq pelo apoio financeiro recebido durante a realização deste projeto

Agradeço aos membros do grupo de neuroimunomodulacao do VPT, em especial a Profa Cristina Massoco e ao Daniel Cohn cujo apoio foi essencial para o inicio do meu projeto. Agradeço também ao Prof Luciano Felicio e ao Prof Paulo Maiorka que colaboraram imensamente para que eu pudesse realizar este projeto.

Ao Prof. Frederico Costa-Pinto agradeço por aceitar ser meu orientador e por todo o auxilio dado tanto no lado profissional como pessoal.

Ao Prof. Daniel Mucida agradeço por me receber em seu laboratório e me ajudar as vencer as diversas dificuldades que enfrentei durante a realização deste projeto. Agradeço também aos demais membros do Laboratório que me auxiliariam de diversas maneiras e em especial a Linda Feighery, ao Paul Muller e ao Thiago Oliveira que participaram diretamente na realização deste projeto.

Das dificuldades que enfrentei durante o doutorado certamente as maiores delas aconteceram no meu período em Nova Iorque, com certeza sem o apoio e amizade do Bernardo Reis, Lilian Nogueira, Thiago Oliveira, Valeria e Julio Lorenzi, Sara Cuesta, Phillip Rommel e Diego Laplagne eu não teria sido capaz de vencer todos os obstáculos que encontrei.

Agradeço também ao Diogo Castro por todo seu companheirismo, estando sempre perto, mesmo que longe.

Agradeço a minha família por todo o apoio, incentivo e a torcida para que este doutorado chegasse ao fim da maneira que eu queria. Em especial agradeço aos meus pais por eles me darem a liberdade de buscar ser a pessoa que eu quisesse.

“Seremos ainda cientistas, se nos desligamos da multidão?
Vocês trabalham para quê? Eu acredito que a única finalidade da ciência
esta em aliviar a canseira da existência humana.”

Bertolt Brecht em A vida de Galileu

# RESUMO

GABANYI, I. **Identificação de uma comunicação bidirecional entre neurônios e macrófagos intestinais via receptores β2 adrenérgicos.** [Identification of a cross-talk between neurons and macrophages in the intestine via β2 adrenergic receptors]. 2015. 62 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O intestino apresenta a maior área do corpo exposta ao ambiente, recebendo constantemente antígenos provenientes da alimentação e de microrganismos. A fim de manter a homeostase, evitando respostas inflamatórias desnecessárias e ao mesmo tempo respondendo apropriadamente à possíveis ameaças ao tecido, as células intestinas tem que ser capazes de perceber e responder apropriadamente a uma diversa gama de perturbações vindas do ambiente. Além do seu vasto sistema imune o intestino também abriga o maior número de neurônios fora do sistema nervoso central, os quais compõe o Sistema Nervoso Entérico (SNE). O SNE é composto por aproximadamente 100 milhões de neurônios que são capazes de regular autonomamente diversas funções fisiológicas do intestino e também de receber e enviar sinais para os sistemas nervoso autônomo simpático e parassimpático. Diversas evidências clínicas correlacionam inflamações intestinais com alterações no SNE, demonstrando a importância de se entender melhor as relações neuroimunes presentes no intestino. Os macrófagos são células essências da imunidade inata que residem tanto na área do intestino conhecida como lâmina própria como também na área conhecida como *muscularis*. Essas células fagocíticas desempenham um importante papel nas respostas antibacterianas e também na manutenção da homeostase do tecido, sendo capazes de adaptar rapidamente sua fisiologia em resposta aos sinais ambientais. Neste trabalho avaliamos a existência de uma comunicação bidirecional entre macrófagos e neurônios intestinais. Caracterizamos as duas populações de macrófagos presentes no intestino em homeostase e após um estimulo com *SpiB* um mutante de *Salmonella,* avaliando assim como estas células respondem à sinais de infecção provenientes do lúmen intestinal. Utilizando abordagens *in vivo* e *in vitro,* observamos que os macrófagos presentes na região da *muscularis* respondem rapidamente a uma possível infecção presente no lúmen regulando positivamente genes de proteção tecidual e reparo de danos, como *Arg1* e *Chi3l3*. Nossos resultados indicam ainda que são os neurônios através da liberação de norepinefrina capaz de ativar os receptores β2 adrenérgicos presentes nos macrófagos intestinais que induzem a expressão dos genes relacionados com a proteção tecidual e reparo de danos. Observamos ainda que esta via induzida através da ativação dos receptores β2 adrenérgicos parece conferir também aos

macrófagos um papel neuro-protetor em caso de danos teciduais. Em conjunto nossos resultados indicam a presença de uma comunicação neuroimune bidirecional entre os neurônios e macrófagos intestinais capaz de modular a resposta dos macrófagos a uma infecção entérica e de proteger os neurônios em caso de danos teciduais.

Palavras-chave: Macrófagos intestinais. Sistema nervoso Entérico. Norepinefrina. Arginase. Receptores β2 adrenérgico.

## ABSTRACT

GABANYI, I. **Identification of a cross-talk between neurons and macrophages in the intestine via β2 adrenergic receptors.** [Identificação de uma comunicação bidirecional entre neurônios e macrófagos intestinais via receptores β2 adrenérgicos]. 2015. 62 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The intestine is the largest area of the body exposed to the environment, which receives food and microbe antigens. In order to maintain homeostasis, avoiding unnecessary inflammation, and at the same time responding properly to potential treats to the tissue, intestinal cells must be able to sense and respond properly to this diverse set of environmental perturbations. In addition to a vast immune system, the intestine also harbors the largest collection of neurons outside the central nervous system, which constitute the enteric nervous system (ENS). The ENS is composed of approximately 100 million neurons that are capable of regulating the physiological functions of the gut autonomously and also receive input and send signals to the sympathetic and parasympathetic nervous system. Numerous clinical findings correlate gut inflammation with abnormalities in the ENS, revealing the importance of a better understanding of the neuro-immune interactions at this site. Macrophages comprise an essential innate immune cell residing both in the intestinal lamina propria and *muscularis* regions. These phagocytic cells play important roles in anti-microbial responses but also in tissue homeostasis, being able to quickly adapt their physiology in response to environmental cues. We evaluated the crosstalk between intestinal macrophages and surrounding enteric neurons, characterizing how these cells respond to possible infection in the intestinal lumen. Using *in vivo* and *in vitro* approaches, we found that macrophages in the intestinal *muscularis* quickly respond to a possible distal luminal infection, up regulating tissue-protective and wound repair genes, like *Arg1* and *Chi3l3*. Also, our results indicate that the neurons trough norepinephrine release and subsequent activation of the β2 adrenergic receptor present on the intestinal macrophages are the ones up regulating tissue-protective and wound repair genes. We also observed that this pathway, trough the β2 adrenergic receptor activation seems to induce a neuro-protective role to these macrophages under tissue damage scenarios. All together our results indicate that a neuro-immune crosstalk between neurons and macrophages modulates macrophages response towards enteric infections and confers neuro-protection in case of tissue damage.

Keywords: Intestinal macrophages. Enteric nervous system. Norepinephrine. Arginase. β2 adrenergic receptors.

# SUMÁRIO

**1 INTRODUÇÃO ..... 13**

**2 REVISÃO DE LITERATURA ..... 15**

**3 OBJETIVOS ..... 21**
3.1 OBJETIVO GERAL ..... 21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 21

**4 MATERIAL E MÉTODOS ..... 22**
4.1 ANIMAIS ..... 22
4.2 INFECÇÃO BACTERIANA ..... 22
4.3 SEPARAÇÃO DAS CAMADAS INTESTINAIS ..... 23
4.4 CITOMETRIA DE FLUXO E SORTEIO DAS CÉLULAS DE INTERESSE ..... 23
4.5 ISOLAMENTO E DIFERENCIAÇÃO DE NEURÔNIOS ENTÉRICOS *IN VITRO* ..... 24
4.6 COCULTURA E MEIO CONDICIONADO ..... 24
4.7 TRATAMENTO COM DROGAS ..... 25
4.8 DENERVAÇÃO DO PLEXO MIOENTÉRICO ..... 25
4.9 ANÁLISE DA INFLAMAÇÃO NAS FEZES ..... 25
4.10 CONTAGEM DE BACTÉRIAS NOS TECIDOS E FEZES ..... 26
4.11 IMUNOFLUORESCÊNCIA ..... 26
4.12 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DO RNA TOTAL ..... 26
4.13 PCR QUANTITATIVO ..... 27
4.14 TESTES ESTATÍSTICOS ..... 28

**5 RESULTADOS ..... 29**
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MACRÓFAGOS INTESTINAIS ..... 29
5.2 RECAPITULAÇÃO *IN VITRO* DA REGULAÇÃO NEUROIMUNE PRESENTE NO INTESTINO ..... 34
5.3 PAPEL DOS RECEPTORES β2 ADRENÉRGICOS NA REGULAÇÃO DE GENES ANTI-INFLAMATÓRIOS NOS MACRÓFAGOS INTESTINAIS ..... 37
5.4 CAMUNDONGOS NSE-NOGGIN OU $ARG^{FLOX}LYSM^{CRE}$ NÃO APRESENTAM UMA RESPOSTA ALTERADA À INFECÇÃO POR *SALMONELLA* ..... 40
5.5 MACRÓFAGOS INTESTINAIS DESEMPENHAM PAPEL PROTETOR EM NEURÔNIOS INTESTINAIS ..... 42

**6 DISCUSSÃO ..... 44**

**7 CONCLUSÕES ..... 53**

**REFERÊNCIAS ..... 55**

# 1 INTRODUÇÃO

O intestino é um órgão que abriga a maior concentração de células imunes do corpo e o maior número de neurônios fora do sistema nervoso central. Além das mais de $10^{14}$ bactérias que vivem no trato gastrointestinal (TGI).

Por estar constantemente exposto a antígenos provenientes tanto destas bactérias quanto da nossa dieta, o intestino deve regular finamente os sistemas imune e nervoso e a interação entre estes para manter a homeostase evitando inflamações desnecessárias ou exageradas que possam danificar seu tecido.

Os neurônios presentes no intestino compõe o Sistema Nervoso Entérico (SNE), além destes, também são encontradas no tecido intestinal extensões dos sistemas nervoso autônomo simpático (SNS) e parassimpático (SNP).

Dentre as células do sistema imune presentes no intestino estão os macrófagos. Estes, além de sua alta capacidade fagocítica, respondem à estímulos externos alterando sua fisiologia, modulando seu comportamento e expressão gênica, a fim de melhor proteger o intestino.

O intestino é composto por diversas camadas, utilizando uma divisão mais simplista podemos dividi-lo em duas regiões, a lâmina própria que engloba as camadas da mucosa e submucosa mais próximas ao lúmen e a região da *muscularis* na qual estão presentes as camadas musculares circular e longitudinal. Os macrófagos intestinais podem ser divididos em duas populações baseado em sua localização, os que ficam na região da lâmina própria (LpM) e os presentes na região da *muscularis* (MM). As funções dos MM são muito menos compreendidas que as dos LpM.

Diversos estudos e relatos clínicos correlacionam inflamações no intestino com alterações no SNE, revelando uma importante interação neuroimune aí presente, que se melhor entendida poderia ajudar no tratamento de doenças inflamatórias crônicas como a doença de Crohn e a doença intestinal inflamatória.

Dadas as diversas evidências de uma complexa interação entre as células imunes e os neurônios presentes no intestino, decidimos neste trabalho analisar a existência e as decorrências funcionais de uma interação entre os MM e os neurônios presentes no intestino.

Analisamos as respostas imediatas dos macrófagos intestinais à exposição do lúmen a bactérias potencialmente patogênicas. Foram analisadas alterações na expressão gênica e

proteica das duas populações de macrófagos, em homeostase e após o estímulo. Testes *in vitro* também foram utilizados para avaliar a capacidade dos neurônios e neurotransmissores de ativar a transcrição de determinados genes. Investigamos também estas respostas na presença de agonistas e antagonistas específicos. Por fim utilizamos camundongos *knockout* para genes específicos para avaliar a relevância dos dados encontrados.

# 2 REVISÃO DE LITERATURA

Uma complexa interação entre sistema nervoso, sistema imune e microbiota ocorre no intestino. Entre outros aspectos, como a mobilidade e permeabilidade intestinal, a microbiota também é capaz de afetar as funções das células imunes e a atividade do sistema nervoso entérico (MAYER; TILLISCH; GUPTA, 2015).

O TGI é colonizado por mais de $10^{14}$ bactérias divididas em mais de 500 espécies. Estas bactérias são capazes de secretar compostos tanto benéficos quanto danosos ao tecido intestinal (HOLLANDER, 2003). Sendo constantemente exposto a diversos antígenos, provenientes tanto das bactérias que residem no intestino, como dos alimentos que ingerimos este tecido deve ser capaz de regular finamente sua resposta a este antígenos afim de evitar respostas inflamatórias desnecessárias que podem ser bastante prejudiciais ao tecido, mas ao mesmo tempo combater agentes nocivos.

A maior concentração de células imunes do corpo é encontrada no intestino. As células da imunidade inata medeiam a inflamação através da liberação de citocinas, esta resposta geralmente tem vida curta e a inflamação é resolvida, porém, em alguns casos a produção de citocinas pode se tornar excessiva e a inflamação ao invés de ser resolvida, persiste podendo se espalhar causando danos em tecidos adjacentes. Processos inflamatórios mal resolvidos podem levar a doenças como a doença intestinal inflamatória (ROSAS-BALLINA; TRACEY, 2009). Portanto, para a resposta imune ser o mais benéfica possível para o organismo, sua resolução tem uma importância crucial (RAES et al., 2002). O entendimento dos mecanismos de regulação da inflamação pode levar à terapias alternativas no tratamento de doenças inflamatórias crônicas.

Dentre as células imunes presentes no intestino estão os macrófagos, que junto com as células dendríticas e os monócitos, fazem parte dos fagócitos mononucleares, uma população heterogênea de origem hematopoiética encontrada em todos os órgãos. Os macrófagos são células altamente fagocíticas, capazes de responder a estímulos externos alterando sua fisiologia, modulando seu comportamento, expressão gênica e consequentemente sua resposta efetora (BOGUNOVIC et al., 2012).

As diversas populações de macrófagos residentes nos diferentes tecidos são estabelecidas antes do nascimento e mantidas independentemente dos monócitos presentes no sangue, através de sua longevidade e limitada auto-renovação. Já os macrófagos intestinais

constituem uma exceção, pois eles são continuamente reabastecidos por monócitos Ly6C$^{hi}$ presentes na circulação sanguínea. Acredita-se que essa diferença se deva a constante exposição do tecido intestinal à microbiota luminal e seus produtos que provavelmente causam uma continua inflamação de baixo grau neste local (YONA et al., 2013).

Em estado de homeostase os monócitos Ly6C$^{hi}$ que migram para o intestino se diferenciam em macrófagos que apresentam um perfil de expressão genica não inflamatório que inclui a indução da expressão de *Il10, Trem2, Tnfaip3,CD163,Mrc1,Retnla (Fizz1)*. Já na presença de uma inflamação de alto grau estes monócitos se diferenciam em células efetoras com um perfil pró-inflamatório (ZIGMOND et al., 2012).

Os macrófagos foram classicamente divididos em dois grandes grupos: *classically activated* (M1) e *alternatively activated* (M2). Macrófagos do tipo M1 caracterizados como pró-inflamatórios liberam citocinas como IL-1β, IL-6 e TNF-α e espécies reativas de oxigênio. Já os do tipo M2 são caracterizados como anti-inflamatórios e reparadores de tecido, a expressão de genes como *Arg1*, *Retnla*, *Il10* e *Chi3l3 (Ym1)* esta altamente associada a este tipo de macrófago (RAES et al., 2002).

É importante notar que, apesar dessa classificação dicotômica, diversos subtipos de macrófagos já foram caracterizados, demonstrando que estas células são capazes de se diferenciar dentro de um espectro de fenótipos (HSIEH et al., 2013). O surgimento de diferentes subgrupos de macrófagos deve-se primariamente ao microambiente ao qual estas células são expostas (RAES et al., 2002). Macrófagos diferenciados quando transplantados para um novo microambiente podem sofrem alterações epigenéticas capazes de reprograma-los. Estas alterações evidenciam a importância do microambiente como fator capaz de orquestrar a identidade e a plasticidade dos macrófagos (LAVIN et al., 2014).

Além disso, essa dicotomia clássica entre respostas do tipo 1, pró-inflamatória ligada a infecções bacterianas e do tipo 2, anti-inflamatória ligada a infecções por helmintos, já vem sendo contestada. Em modelos de infecção bacteriana observou-se que no fígado estas respostas ocorrem sequencialmente e são interdependentes, orquestrando a resposta imune e o retorno para a homeostase (BLERIOT et al., 2015).

No intestino a função principal dos macrófagos é manter a homeostase e o reparo tecidual. Para tal, são capazes de manter a tolerância a antígenos próprios e ao mesmo tempo induzir uma resposta inata e adaptativa a antígenos danosos que invadem o tecido (BOGUNOVIC et al., 2012). Manter as células T regulatórias no intestino parece ser uma das funções dos macrófagos intestinais que garantem a homeostase do tecido (ZIGMOND; JUNG, 2013). Estudos em camundongos cujos macrófagos não apresentavam receptores para

IL-10 comprovaram que os macrófagos intestinais desempenham um papel decisivo que determina a presença ou ausência de inflamação no tecido intestinal (ZIGMOND et al., 2014).

Porém, os mecanismos moleculares locais que tornam estas células imunomodulatórias ainda não foi completamente identificado. A ineficiência dos macrófagos em controlar as respostas do sistema imune intestinal pode resultar em inflamações excessivas e desreguladas como as observadas em doenças intestinais inflamatórias (MANTOVANI; MARCHESI, 2014).

Os macrófagos intestinais podem ser divididos em 2 subpopulações, que apresentam uma morfologia dinâmica e diversificada, sendo uma distribuída mais próxima a mucosa, associada a camada onde as células epiteliais interagem com os materiais presentes no lúmen e a outra localizada mais próxima a parede muscular do TGI, nessa região os macrófagos podem ser encontrados na camada da serosa e na interface entre as camadas musculares longitudinal e circular, onde se localiza também o plexo mioentérico (PHILLIPS; POWLEY, 2012).

O sistema imune já não é mais visto como um sistema autônomo e sim como um sistema que exibe um comportamento complexo que em muitos casos é orquestrado pela rede neuronal (ROSAS-BALLINA; TRACEY, 2009).

Todas as superfícies do corpo que são possíveis alvos de uma invasão por patógenos ou que são expostos a antígenos, como a mucosa intestinal, recebem uma extensa inervação neural simpática que esta intimamente associada a elementos celulares do sistema imune. Estas fibras nervosas modulam a magnitude e os efeitos da resposta imune tanto inata quanto adaptativa nos locais de ação de patógenos e antígenos (NANCE; SANDERS, 2007).

Demonstrou-se que em infecções agudas com *Staphylococcous* o sistema nervoso tem um papel direto na percepção e modulação da interação hospedeiro-patógeno, essa interação neurônio-patógenos leva à supressão da resposta inflamatória local (CHIU et al., 2013).

Os neurônios presentes no intestino constituem o SNE, por conter o maior número de neurônios fora do sistema nervoso central, constituem uma rede complexa também conhecida como o *segundo cérebro*. No intestino delgado já foram identificados mais de 14 grandes grupos de tipos de neurônios, cada um com suas respectivas propriedades neuroquímicas, biofísicas e morfológicas (FURNESS, 2000). Estes neurônios, são capazes de regular autonomamente diversas funções fisiológicas do intestino, além de receberem e enviarem diversas informações provenientes e para os neurônios dos SNS e SNP (BUHNER; SCHEMANN, 2012).

Nos últimos anos o sistema nervoso autônomo tem sido descrito como um componente essencial do microambiente de uma variedade de tecidos por regular a homeostase e influenciar diversos processos patológicos (HANOUN et al., 2015).

As ramificações do SNS cujo principal neurotransmissor é a noradrenalina (NE) se conectam com o TGI, cujo agregado mais proeminente é encontrada nos gânglios entéricos. Estas neurônios simpáticos são capazes de alterar a mobilidade intestinal através da inibição da ativação dos neurônios entéricos (LOMAX; SHARKEY; FURNESS, 2010).

O SNE contém dois grandes plexos ganglionares que se interconectam, onde podem ser encontradas quase todas as células nervosas intrínsecas do TGI. O plexo mioentérico, também conhecido como plexo de Auerbach, se estende por todo o TGI, do esôfago até o reto, sendo encontrado entre a camada muscular circular e a camada muscular longitudinal externa, região conhecida como *muscular*. Já o plexo submucoso é proeminente somente no intestino delgado e grosso, sendo localizado entre a camada de musculo liso e o epitélio da mucosa, local conhecido como lâmina própria (FURNESS, 2000; LARANJEIRA; PACHNIS, 2009).

Estudos da inervação extrínseca do cólon de cobaias demonstrou que a inervação mais densa era encontrada no plexo mioentérico, sendo a inervação que atingia o plexo submucoso bastante mais esparsa. Dentre os axônios extrínsecos encontrados no cólon 24% expressam tirosina hidroxilase (TH) um marcador de neurônios simpáticos e 15% apresentavam um marcador de neurônios parassimpáticos (CHEN et al., 2015).

Avanços nas áreas de imunologia e neurociência estabeleceram bases celulares e anatômicas para as interações bidirecionais entre estes dois sistemas (ROSAS-BALLINA; TRACEY, 2009). Sendo os neurotransmissores capazes interagir com as células imunes alterando suas funções, regulando assim a magnitude da resposta do organismo a infecções e danos (TRACEY, 2009).

As relações neuroimunes presentes no intestino parecem ser bidirecionais, pois células do sistema imune são afetadas por sinais provenientes dos neurônios entéricos, assim como sinais provenientes de células do sistema imune são capazes de afetar os neurônios adjacentes. A homeostase do SNE parece estar intimamente ligada a fisiologia do intestino, mudanças ambientais, relacionadas com nutrição, estabelecimento da microflora intestinal e maturação do sistema imune provavelmente afetam a fase pós-natal do desenvolvimento do SNE (KABOURIDIS; PACHNIS, 2015).

Dados clínicos e estudos com modelos animais evidenciam a presença e a importância de se estudar a regulação neuroimune presente no intestino. Estudos relatam anomalias no

SNE de pacientes com doenças gastrointestinais (GEBOES; COLLINS, 1998; VILLANACCI et al., 2008). Camundongos submetidos a estresse tem a permeabilidade intestinal aumentada, porém, em camundongos que não produzem células T CD4 ou IFNγ o estresse não é capaz de afetar a permeabilidade de seu intestino (HOLLANDER, 2003). Animais que apresentam uma maior inervação no intestino são mais susceptíveis a modelos de inflamação intestinal (MARGOLIS et al., 2011). Em modelos de colite induzida por DSS demonstrou-se que o neuropeptídio Y induz o aumento da expressão de nNOS, que gera estresse oxidativo e uma piora na inflamação subsequente (CHANDRASEKHARAN et al., 2008). Inflamação de um determinado local pode afetar a motilidade de áreas distantes não inflamadas, sugerindo que a inflamação possa induzir alterações nos neurônios entéricos de áreas distantes (COLLINS, 1996).

Apesar dos diversos trabalhos e das relações neuroanatômicas fundamentarem a existência de uma conexão neuroimune bidirecional no intestino (NANCE; SANDERS, 2007), até o momento o entendimento da interação entre estes dois sistemas em condições de homeostase ou doença ainda corresponde a uma área de pesquisa em intensa atividade e que pode receber muita contribuição experimental (KABOURIDIS; PACHNIS, 2015).

Além das interações entre SNE e sistema imune é preciso relembrar que o intestino é um órgão extremamente complexo, no qual estão presentes, além destes dois sistemas, a microbiota e as inervações do sistema nervoso autônomo. Os neurônios simpáticos também são capazes de influenciar as respostas inflamatórias. As interações entre neurônios simpáticos, entéricos, sistema imune intestinal e inflamação são complexas e consideráveis esforços de pesquisa são necessários para entender a via pela qual são mediados os efeitos dos neurônios simpáticos na inflamação (LOMAX; SHARKEY; FURNESS, 2010).

O papel do sistema nervoso autônomo regulando respostas a estresse e funções basais já foi foco de estudo por muitos anos. No entanto, só recentemente, a influência de sinais neuronais na inflamação tem sido vista como uma importante via de regulação com possíveis implicações clínicas (HANOUN et al., 2015).

Diversas pesquisas demonstraram que fibras nervosas do sistema simpático são capazes de liberar NE próximo à células imunes e estes dados induziram trabalhos subsequentes que comprovaram a presença de receptores adrenérgicos nestas células. A presença destes receptores é necessária para que os neurotransmissores possam induzir uma cascata de sinalização nas células imunes (NANCE; SANDERS, 2007).

Existem dois tipos de receptores capazes de se ligar a NE, os receptores adrenérgicos alfa e os beta, que tem uma expressão diferencial dependendo do tecido e exibem afinidades

diferentes pela NE. As células imunes exibem preferencialmente os receptores do tipo beta, sendo sua expressão variável dependendo do tipo de célula analisada e de fatores externos como citocinas, hormônios, neurotransmissores entre outros. A ativação destes receptores leva à uma cascata de sinais capaz de modular a expressão gênica e portanto a atividade celular (NANCE; SANDERS, 2007).

A ativação dos receptores β2 adrenérgicos (adrb2R) de macrófagos peritoneais *in vitro* levou a uma mudança em seu fenótipo, sendo que estas células passaram a apresentar um fenótipo mais característico de macrófagos M2, e o uso de antagonistas dos adrb2R *in vivo*, levou os camundongos a apresentarem uma maior taxa de mortalidade no modelo de endotoxemia e uma piora no quadro de inflamação em modelos de injuria do pulmão (GRAILER et al., 2014).

Entender os mecanismos pelos quais a NE regula a atividade das células imunes levará, um dia, ao desenvolvimento de terapias capazes de alterar a progressão de doenças relacionadas com o sistema imune (NANCE; SANDERS, 2007), como por exemplo doenças inflamatórias intestinais.

Trabalhos já evidenciaram a possível relação entre os neurônios presentes no intestino com os macrófagos encontrados na região da *muscular*. Estas células são frequentemente encontradas associadas aos gânglios, conexões do plexo mioentérico e a inervação simpática presente no intestino. As evidências anatômicas sugerem que os macrófagos contribuem para a homeostase das sinapses e contatos entre os diversos elementos da rede neural entérica. As características observadas são consistentes com a ideia de que, em alguns casos, os neurônios se conectam diretamente com os MM e potencialmente influenciem sua fisiologia (PHILLIPS; POWLEY, 2012).

Além das evidencias anatômicas, evidencias funcionais desta interação também já foram encontradas, em estado de homeostase os MM regulam a atividade peristáltica do cólon, através da liberação de BMP2. Esta proteína também é capaz de induzir os neurônios entéricos a produzir o CSF1, um fator de crescimento essencial para o desenvolvimento de macrófagos. A regulação da expressão de BMP2 pelos MM e CSF1 pelos neurônios entéricos é ainda regulada por estímulos provenientes da microbiota comensal (MULLER et al., 2014).

Dado o papel central na manutenção da inflamação intestinal, os macrófagos tem sido vistos como alvos para tratamentos alternativos da doença intestinal inflamatória, entender os sinais que levam a geração de macrófagos não-inflamatórios tem o potencial de gerar tais tratamentos (ZIGMOND; JUNG, 2013).

# 3 OBJETIVOS

## 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a existência de uma interação entre neurônios e macrófagos presentes no intestino e uma possível decorrência na vigência de um estímulo inflamatório.

## 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os macrófagos intestinais em homeostase e frente a um estímulo inflamatório.
- Avaliar se as alterações observadas nos macrófagos poderiam ser provenientes de um estímulo neuronal.
- Recriar *in vitro* condições para análise de uma possível interação neuroimune presente no intestino.
- Caracterizar a via de sinalização neurônio-macrófago.
- Entender a função biológica desta interação.

# 4 MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1 ANIMAIS

Utilizamos camundongos C57BL/6 fêmeas em torno de 8-10 semanas de idade provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ/USP ou do Laboratório Jackson (EUA). Os animais eram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ/USP ou no Centro de Biociência Comparativa da Universidade Rockefeller (NY, EUA). Provenientes do Laboratório Jackson utilizamos também camundongos *knockout* para os adrb2R (b2KO), camundongos repórter para o gene da Arginase ($Arg^{YFP}$) e camundongos com sítios *loxP* flanqueando o gene da Arginase ($Arg^{flox}$). Estes últimos foram cruzados com camundongos $LysM^{cre}$ (CLAUSEN et al., 1999) gentilmente cedidos pelo laboratório do Dr Nussesweig (Universidade Rockefeller, NY, EUA), gerando camundongos $Arg^{flox}LysM^{cre}$. Camundongos NSE-Noggin que apresentam uma maior inervação no intestino (CHALAZONITIS et al., 2004) foram gentilmente doados pelo Dr. John Kessler (Universidade Northwestern, IL, EUA).

Os animais eram mantidos em ambiente livre de patógenos com condições controladas de umidade e temperatura, com ciclo de claro e escuro de 12 horas cada, com luzes acesas às 6:00. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as instruções do comitê de ética da FMVZ/USP, do Instituto Nacional de Saúde dos EUA (NIH) e aprovado pelo *The Rockefeller University Animal Care and Use Committee.*

## 4.2 INFECÇÃO BACTERIANA

Para as infecções agudas (análise até 24h pós-infecção) utilizavamos *Salmonella* do tipo selvagem e os mutantes *SpiB* cuja capacidade de proliferação intracelular é comprometida e *InvA* que apresenta um capacidade de invasão celular diminuída, ambos apresentam mutações no seu sistema de secreção tipo III (GALAN; GINOCCHIO; COSTEAS, 1992; OCHMAN et al., 1996). Estas eram crescidas a 37°C – 230 rpm por 5h, após este período fazíamos uma sub-cultura (1:1000) que foi crescida por 18h a 37°C. Os

camundongos eram infectados com $10^9$ unidades formadoras de colônia por gavagem. Para infecções crônicas (análise 5-7 dias pós-infecção) utilizavamos *Salmonella* do tipo selvagem crescida por 12-15h a 37°C – 230 rpm, após este período fazíamos uma sub-cultura (1:30) que era crescida por 3h e 30 min a 37°C – 230 rpm. Os camundongos eram infectados com $10^7$ unidades formadoras de colônia por meio de gavagem.

## 4.3 SEPARAÇÃO DAS CAMADAS INTESTINAIS

Após a eutanásia do animal, retiravamos cuidadosamente o intestino delgado, removendo a gordura e as fezes presentes neste órgão. O intestino era então cortado longitudinalmente e lavado 2x em HBSS (Gibco), realizávamos mais uma lavagem em HBSS + 1mM DTT (Sigma-Aldrich), o órgão era então cortado em 2 e mantido em HBSS + 5% soro fetal bovino (SFB), sob leve agitação. As camadas eram separadas com o auxilio de duas pinças. Cada camada era então cortada em pequenos pedaços e colocada para digerir em HBSS + 5% SFB + 1X piruvato de sodio + 25 mM Hepes + 50 µg/ml DNaseI + 1/10 Collagenase D + 1/20 Dispase a 37°C. As camadas correspondentes a *muscularis* e a lâmina própria eram digeridas por 45 e 20 min respectivamente. Ao final da digestão as células eram passadas através uma agulha de 18g por 3x e filtradas, no caso da mucosa o tecido que não passava pelo filtro era ainda macerado e passado novamente pelo filtro. Finalmente as células eram lavadas e marcadas com anticorpos específicos para serem analisadas por citometria de fluxo e então sorteadas. Exceto no momento da digestão, o órgão e as células provenientes deste eram sempre mantidos resfriados.

## 4.4 CITOMETRIA DE FLUXO E SORTEIO DAS CÉLULAS DE INTERESSE

Macrófagos eram sorteados baseados na sua expressão de $CD45^+$, $MHCII^+$, $F480^+$, $CD11b^+$, $CD11c^+$, $CD103^-$, $SiglecF^-$, $CD19^-$. As células eram coletadas diretamente em TRIZol (Invitrogen, EUA) e seu RNA extraído segundo o protocolo descrito em ImmGen.org (HENG et al., 2008).

## 4.5 ISOLAMENTO E DIFERENCIAÇÃO DE NEURÔNIOS ENTÉRICOS *IN VITRO*

Fêmeas que estavam aproximadamente no dia 18 de gestação eram eutanasiadas, os fetos encontrados eram removidos e colocados em uma placa com HBSS gelado e eutanasiados de maneira apropriada. O cérebro e o intestino destes eram removidos. Cada órgão era colocado em um tubo de 1,5 ml contendo 1 ml de meio (HBSS + 2% SFB). Após picotar o órgão dentro do tubo este era centrifugado por 4 min a 400g e o sobrenadante removido. Esse processo era repetido pelo menos 3 vezes. Os tecidos eram então colocados em uma placa de 48 poços contendo 1 ml de HBSS + 0,05% tripsina + 1/200 DNAse, o intestino era digerido por 15 min e o cérebro por 5 min a 37°C. Após o tempo determinado as células eram dissociadas mecanicamente e coletadas em um tubo de 15 ml contendo DMEM + 10% SFB. Após a centrifugação o sedimento proveniente das células do intestino era ressuspendido em DMEM/F12 + N2 (1/100) + EGF e FGF (20ng/ml) + antibiótico/antifungo e as células eram semeadas em placas não-aderentes. Novo meio era adicionado no dia seguinte. A partir de então, o meio era apenas trocado a cada 4-5 dias, dependendo do crescimento das células. EGF e FGF (20ng/ml) eram adicionados todos os dias. Após a expansão dos progenitores neurais (2-3 semanas), estas células eram colocadas para diferenciar em placas aderentes previamente revestidas com fibronectina em meio NEUROBASAL (Gibco, EUA) + 2% B27. Já as células provenientes do cérebro eram colocadas diretamente nas placa aderentes previamente revestidas com fibronectina em meio NEUROBASAL + 2% B27.

## 4.6 COCULTURA E MEIO CONDICIONADO

No caso dos neurônios provenientes do intestino, os experimentos de cocultura, eram realizados após 15 dias do início da diferenciação dos progenitores neurais. Já no caso dos neurônios cerebrais a cocultura era iniciada assim que estes atingiam aproximadamente 80-90% de confluência na placa. Macrófagos peritoneais ($10^5$) ou da linhagem RAW 264.7 ($5x10^4$) eram adicionados as placas nas quais se encontravam os neurônios. Estes eram mantidos em cocultura por 24h em meio NEUROBASAL. Após este período os macrófagos eram sorteados como descrito no item 4.3. O meio no qual as células foram mantidas em

cocultura (meio condicionado) era recolhido após as 24h de cocultura e este então era adicionados a uma placa contendo macrófagos plaqueados no dia anterior. Os macrófagos eram mantidos no meio condicionado por 24h e então coletados diretamente em TRIZol para posterior extração de seu RNA. O meio condicionado caso não fosse utilizado imediatamente era guardado a -80°C.

## 4.7 TRATAMENTO COM FÁRMACOS

Para os testes com Butoxamina (btx), antagonista dos adrb2R, utilizamos 5mg/kg injetados intraperitonialmente, 5-10 min antes da gavagem com bactéria. Nos experimentos de cocultura adicionava-se 100μM de btx à placa contendo os macrófagos 30 min antes destes serem adicionados a placa contendo os neurônios. Os macrófagos eram expostos 100μM de NE ou Salbutamol, agonista dos adrb2R, por 1h, para então serem analisados.

## 4.8 DENERVAÇÃO DO PLEXO MIOENTÉRICO

Realizamos denervação do plexo mioentérico de acordo com um protocolo previamente descrito e validado (HANANI et al., 2003). Resumidamente os camundongos eram submetidos a cirurgia na qual parte de seu intestino era exposto a 0,05% Cloreto de benzalconio por 15 min, após este período o intestino era lavado com salina. A incisão era suturada e o animal eutanasiado 15 dias depois para análise do intestino.

## 4.9 ANÁLISE DA INFLAMAÇÃO NAS FEZES

Avaliamos a presença de um marcador inflamatório nas fezes conforme descrito previamente (CHASSAING et al., 2012) empregando para tanto um kit de ELISA para

detecção da Lipocalin 2 (Lcn2) murina (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) seguindo as informações do fabricante**.**

## 4.10 CONTAGEM DE BACTÉRIAS NOS TECIDOS E FEZES

Pedaços dos tecidos e/ou fezes eram recolhidos e pesados. Estes eram macerados e ressuspendidos em 500µl de PBS. Uma diluição seriada era realizada e 5µl das respectivas diluições eram colocados em placa contendo meio seletivo para crescimento da bactéria. No dia seguinte o número de colônias era contado. Dada a diluição e o peso inicial obtínhamos o número de unidades formadoras de colônia por grama do órgão ou fezes.

## 4.11 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Após a separação e a lavagem das camadas intestinais estas eram fixada por 15 min em 4% PFA, em seguida o tecido era submetidos a duas lavagens de 10 min em PBS. Para a marcação com o anticorpo desejado o tecido era incubado em uma solução de PBS contendo 5% BSA e 10% Soro por 1h a temperatura ambiente. O anticorpo primário era incubado por 12h a 4°C, após duas lavagens de 20 min o tecido era incubado com o anticorpo secundário por 1h a temperatura ambiente no escuro, o tecido era então lavado novamente e as lâminas eram montadas. Os anticorpos eram usados na concentração de 1:200.

## 4.12 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DO RNA TOTAL

Resultados do sequenciamento do RNA foram alinhados usando STAR versão 2.3.0 usando parâmetros customizados (*outSAMstrandField intronMotif and outFilterMultimapNmax* 1) e o banco de dados *Mouse Ensembl* genes como referência. Expressão diferencial foi calculada usando *Cufflinks* com os parâmetros padrões. Para designar uma categoria do *GENE ONTOLHOGY* aos genes diferencialmente expressos e analisar sua relevância utilizamos a base de dados *Visualization and Integrated Discovery*

utilizando os parâmetros padrões (HUANG DA; SHERMAN; LEMPICKI, 2009).

## 4.13 PCR QUANTITATIVO

Após a extração do RNA com descrito no item 4.4 o cDNA era obtido usando Superscript II system (Invitrogen, EUA) seguindo as orientações do fabricante. Subsequentemente o cDNA era submetido ao PCR quantitativo usando *SYBR green* (Bio-RAD Laboratories, EUA). A expressão dos genes era sempre calculada relativamente a expressão de *Rpl32,* sendo o valor final obtido de ΔΔct multiplicado por $10^5$. Foram utilizados os seguintes *primers*:

*Rpl32*
F: ACA ATG TCA AGG AGC TGG AG
R: TTG GGA TTG GTG ACT CTG ATG

*Arg 1*
F: CTC CAA GCC AAA GTC CTT AGA G
R: AGG AGC TGT CAT TAG GGA CAT C

*Chi3l3*
F: AGA CTT GCG TGA CTA TGA AGC ATT
R: GCA GGT CCA AAC TTC CAT CCT C

*Retnla*
F: CTG GAT TGG CAA GAA GTT CC
R: CCA GGA TGC CAA CTT TGA

*Tnf*
F: AGG GTC TGG GCC ATA GAA CT
R: CCA CCA CGC TCT TCT GTC TAC

*Nos2*
F: GTT CTC AGC CCA ACA ATA CAA GA
R: GTG GAC GGG TCG ATG TCA C

*Il12p40*
F: TGG TTT GCC ATC GTT TTG CTG
R: ACA GGT GAG GTT CAC TGT TTC T

*Adrb2*
F: TAG CGA TCC ACT GCA ATC AC
R: ATT TTG GCA ACT TCT

*Il10*
F: CCC ATT CCT CGT CAC GAT CTC
R: TCA GAC TGG TTT GGG ATA GGT TT

*Il1b*
F: TCG TGC TGT CGG ACC CAT AT
R: GTC GTT GCT TGG TTC TCC TTG T

*Il6*
F: ACC AGA GGA AAT TTT CAA TAG GC
R: TGA TGC ACT TGC AG

## 4.14 TESTES ESTATÍSTICOS

Os testes estatísticos foram realizados utilizando o *GraphPad Prism software*. Os dados foram analisados através de teste t de Student não pareados. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

# 5 RESULTADOS

## 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MACRÓFAGOS INTESTINAIS

Para caracterizar os macrófagos presentes no intestino, separamos este órgão em duas camadas, uma interna contendo a lâmina própria e uma externa contendo a *muscular*. Dadas as diferenças entre estes dois microambientes decidimos analisar, em estado de homeostase e após o estímulo por 2h com *Salmonella* (*SpiB* e *invA*), as caraterísticas dos macrófagos localizados nestas regiões.

Primeiramente confirmamos que com o nosso método de separação das camadas intestinais éramos capazes de obter populações puras e viáveis de macrófagos tanto na lâmina própria como na *muscular* (Figura 1A).

Em seguida, com o intuito de caracterizar as diferenças entre estes dois tipos de macrófagos, os presentes na lâmina própria (LpM) e os presentes na *muscular* (MM), submetemos amostras destas células tanto em homeostase quanto após o estímulo ao sequenciamento de RNA total. Primeiramente, através do *Gene Ontology*, comparamos quais vias eram ativadas ou suprimidas, utilizando os genes diferencialmente expressos entre LpM e MM em homeostase. Observamos que os genes pertencentes a via de resposta a dano estavam positivamente regulados nos MM e que a resposta de defesa era uma das vias cujos genes que estavam negativamente regulados nos MM em relação aos LpM (Figura 1B).

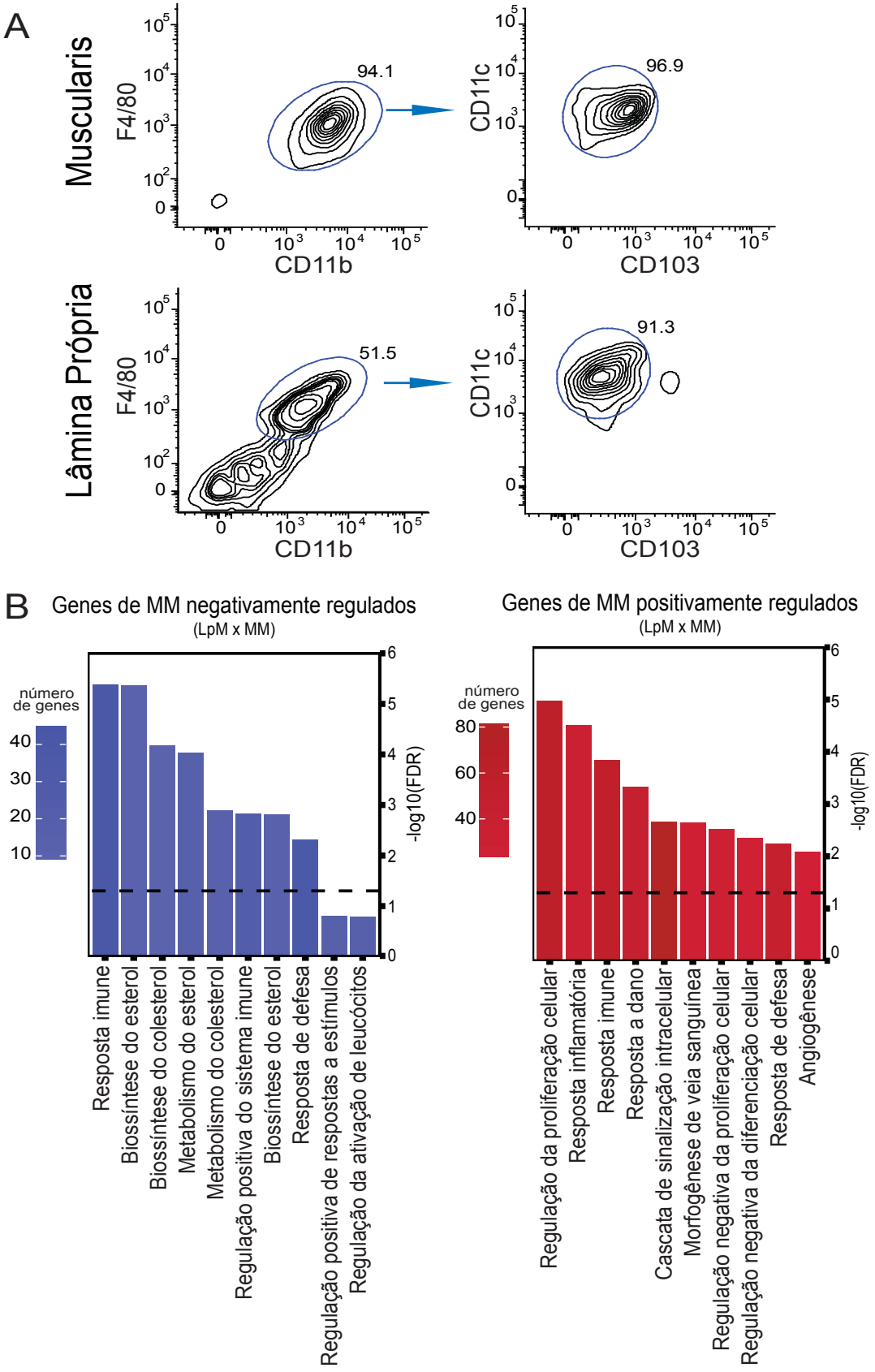
No caso dos macrófagos coletados 2h após a gavagem com *SpiB*, observamos que para os LpM nenhuma via era significativamente representada pois não havia um número suficiente de genes diferencialmente expressos antes e após o tratamento para esta análise ser realizada. Já no caso dos MM observamos que as vias da resposta imune, resposta inflamatória e resposta a dano eram diferencialmente reguladas (Figura 1C). Neste caso a análise foi feita com todos os genes diferencialmente expresso, tanto os que eram positivamente ou negativamente regulados, pois não seria possível a análise caso separássemos essa duas categorias.

Decidimos então analisar a expressão de alguns genes relacionados com macrófagos do tipo M1 e M2 nestas duas populações de macrófagos intestinais. Observamos, já em homeostase, uma tendência dos MM serem mais relacionados a macrófagos anti-

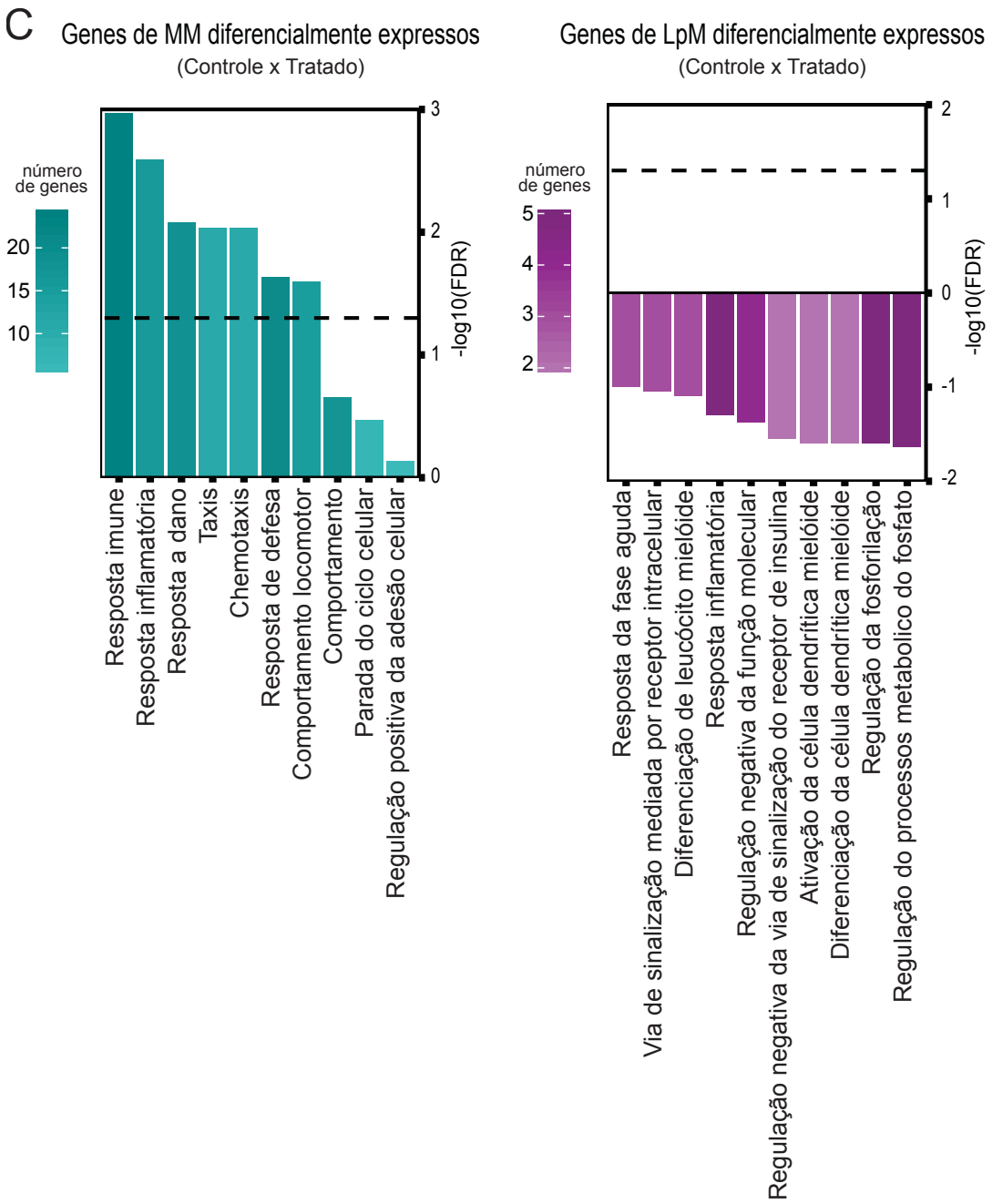
inflamatórios e os LpM serem mais pró-inflamatórios, observamos ainda, que esta tendência era acentuada após o estímulo com *SpiB*. Observamos uma expressão preferencial de alguns marcadores típicos de M2 nos MM, como por exemplo, em homeostase, *Retnla, Cd163, Il10 Mrc1* e o aumento da expressão de *Arg1*, *Chi3l3*, *Retnla* e *Aldh1a2* na presença da *SpiB*. Já genes típicos de macrófagos M1 como *Nos2* e *Il12b* estavam mais expressos nos LpM tanto em homeostase como na presença da SpiB (Figura 1D).

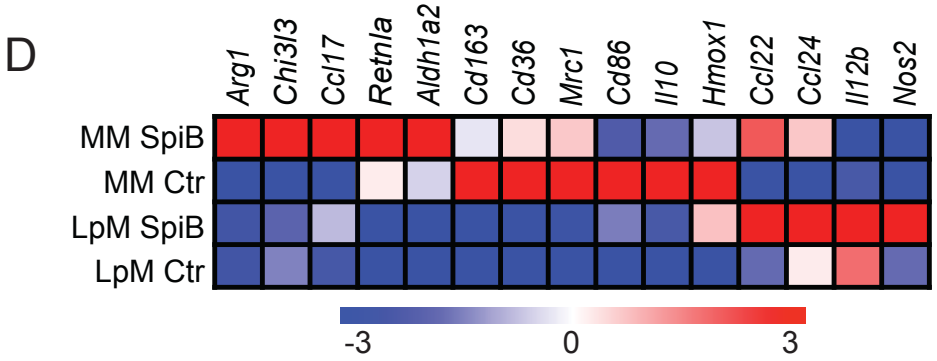
Para confirmar os dados obtidos, comparamos estes resultados com o banco de dados da ImmGen (GAUTIER et al., 2012) e realizamos experimentos de citometria de fluxo e RT-qPCR. Por citometria de fluxo observamos que em homeostase os LpM apresentam uma expressão diferencial das moléculas coestimulatórias CD86 e CD80, e um maior burst oxidativo (Figura 1E), por RT-qPCR confirmamos que os genes característicos de M1, *Il1b e Il12b,* estavam mais expressos nos LpM e os genes *Retnla e Il10,* característicos de M2 estavam mais expresso nos MM (Figura 1F). Confirmamos também o aumento da expressão de *Nos2* após o estímulo por 2h com *SpiB* e observamos ainda o aumento da *Il6* (Figura 1G). No caso dos MM confirmamos o aumento da expressão dos genes *Arg1* e *Chi3l3* utilizando dois mutantes de *Samonella*: *SpiB* e *invA* (Figura 1H). Utilizamos camundongs axênicos, que não apresentam microbiota intestinal, para avaliar se a diferença entre os MM e LpM observada em homeostase era devido a proximidade com a microbiota, nossos resultados apontam que a microbiota não deve ser o fator determinante na diferença observada entre estas duas populações de macrófagos, visto que as diferenças encontradas para a expressão dos genes anti-inflamatórios *Retnla e Il10* são as mesmas observadas nos camundongos na qual a microbiota esta presente (Figura 1I).

Figura 1 - Caracterização dos macrófagos intestinais (continua)

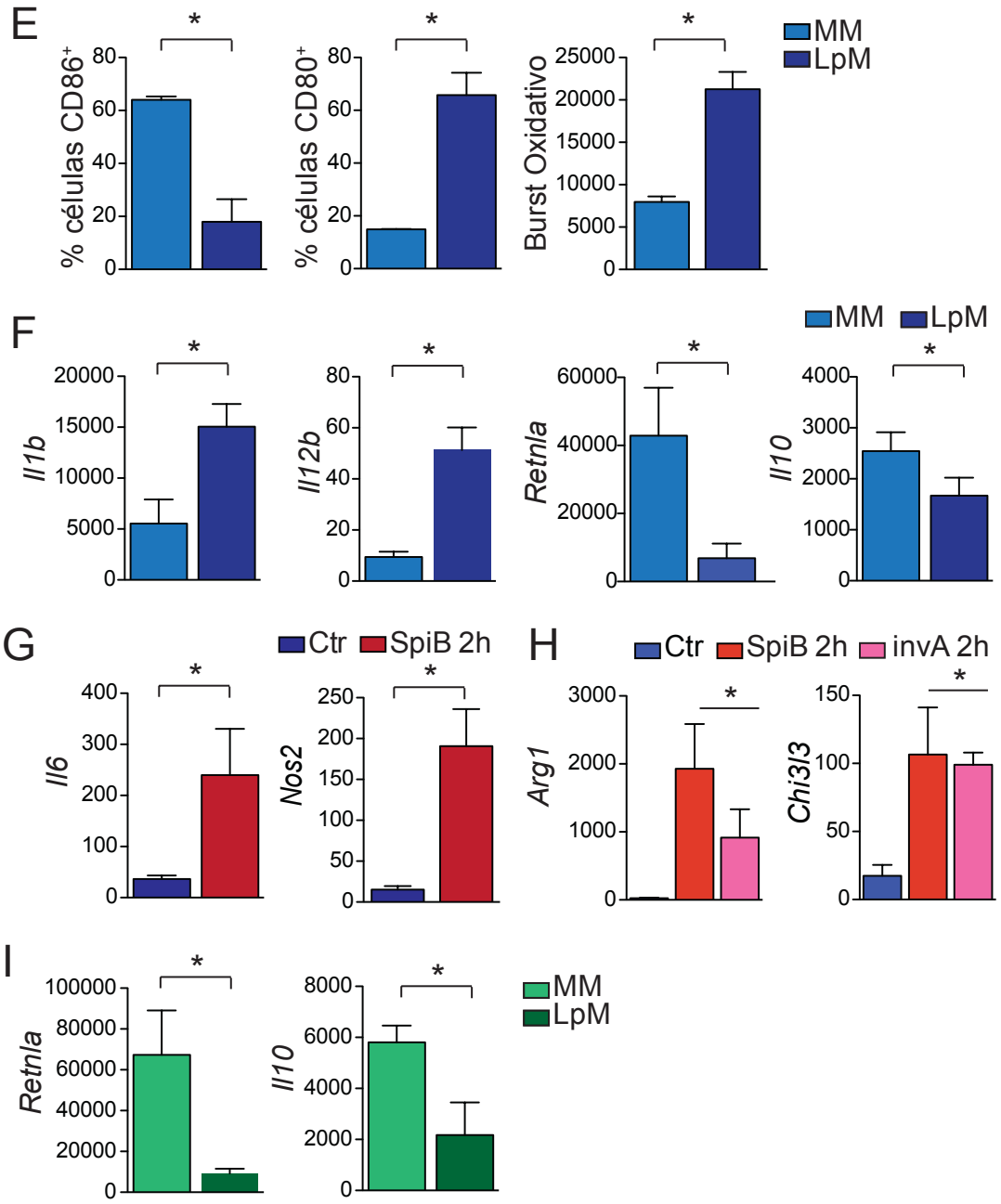


(continuação)



(conclusão)




Fonte: (GABANYI, I., OLIVEIRA. Y. T., 2015).

Legenda: Caracterização, por citometria de fluxo dos macrófagos intestinais, após selecionar as células Aqua$^{-}$ CD45$^{+}$ SiglecF$^{-}$ CD19$^{-}$ MHCII$^{+}$, selecionamos as células CD11b$^{+}$ F4/80$^{+}$ e destas as CD11c$^{+}$ CD103$^{-}$, as diferenças encontradas entre as populações provenientes da lâmina própria e da *muscularis* confirmam que nossa separação e digestão foram eficientes (A). Utilizando esta estratégia, selecionamos os LpM e MM e submetemos seus respectivos RNA a análise por sequenciamento (B,C,D), citometria de fluxo (E) e RT-qPCR (F,G,H). Análise no *Gene Ontology* dos genes diferencialmente expressos entre LpM e MM em homeostase (B) e dos genes dos MM após 2h de estímulo com *SpiB* (C). Nos LpM esta análise não se mostrou significativa dado o número insuficiente de genes diferencialmente expressos antes e depois do estímulo com *SpiB* (C). *Heat map* de alguns genes característicos tanto de M1 como M2 demonstram os fenótipos preferenciais dos MM e LpM tanto em homeostase quanto após estímulo (D). Expressão das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 e capacidade de *burst* oxidativo foram

analisados através de citometria de fluxo em MM (barra azul clara) e LpM (barra azul escura) em homeostase (E). Expressão dos genes característicos de M1, *Il1b* e *Il12b* e de genes caraterísticos de M2, *Retnla* e *Il10* por RT-qPCR em MM (barra azul clara) e LpM (barra azul escura) em homeostase (F). Aumento da expressão de *Nos2* e *Il6* em LpM após 2h de estímulo com *SpiB* (barra vermelha escuro) (G). Aumento da expressão de *Arg1* e *Chi3l3* nos MM após 2h de estímulos com *SpiB* (barra vermelha) ou *invA* (barra rosa) (H). Diferença de expressão dos genes *Retnla* e *Il10* nos MM (barra verde clara) e LpM (barra verde escura) provenientes de camundongos axênicos em homeostase (I). * $p < 0.05$.

## 5.2 RECAPITULAÇÃO *IN VITRO* DA REGULAÇÃO NEUROIMUNE PRESENTE NO INTESTINO

Visto que os MM que se localizam distantes do lúmen, onde o estímulo esta presente, alteram sua expressão gênica rapidamente após a chegada da *SpiB* no intestino, decidimos avaliar se esta alteração poderia estar sendo dada através de estímulos neuronais.

Utilizando o modelo de cocultura pudemos recriar *in vitro* condições para avaliar se células neuronais seriam capazes de induzir a expressão de genes característicos de macrófagos M2. Após 24h de cocultura analisamos a expressão gênica dos macrófagos da linhagem RAW (RM) e observamos que a presença dos neurônios era capaz de estimular a expressão da *Arg1*, e não tinha efeito sobre a expressão de *Tnf* e *Nos2* (Figura 2A). Reproduzimos os experimentos de cocultura também com macrófagos peritoneais (PM) provenientes dos camundongos $Arg^{YFP}$. Por RT-qPCR e citometria de fluxo confirmamos a indução da expressão da Arg1 nestes macrófagos quando estes estavam em contato com células neuronais (Figura 2B), por RT-qPCR observamos também o aumento da expressão de *Chi3l3* nos macrófagos submetidos a cocultura (Figura 2G). Observamos ainda que o cultivo de RM em meio condicionado proveniente da cocultura também induzia a expressão da *Arg1* (Figura 2C), indicando que esta indução não era contato dependente.

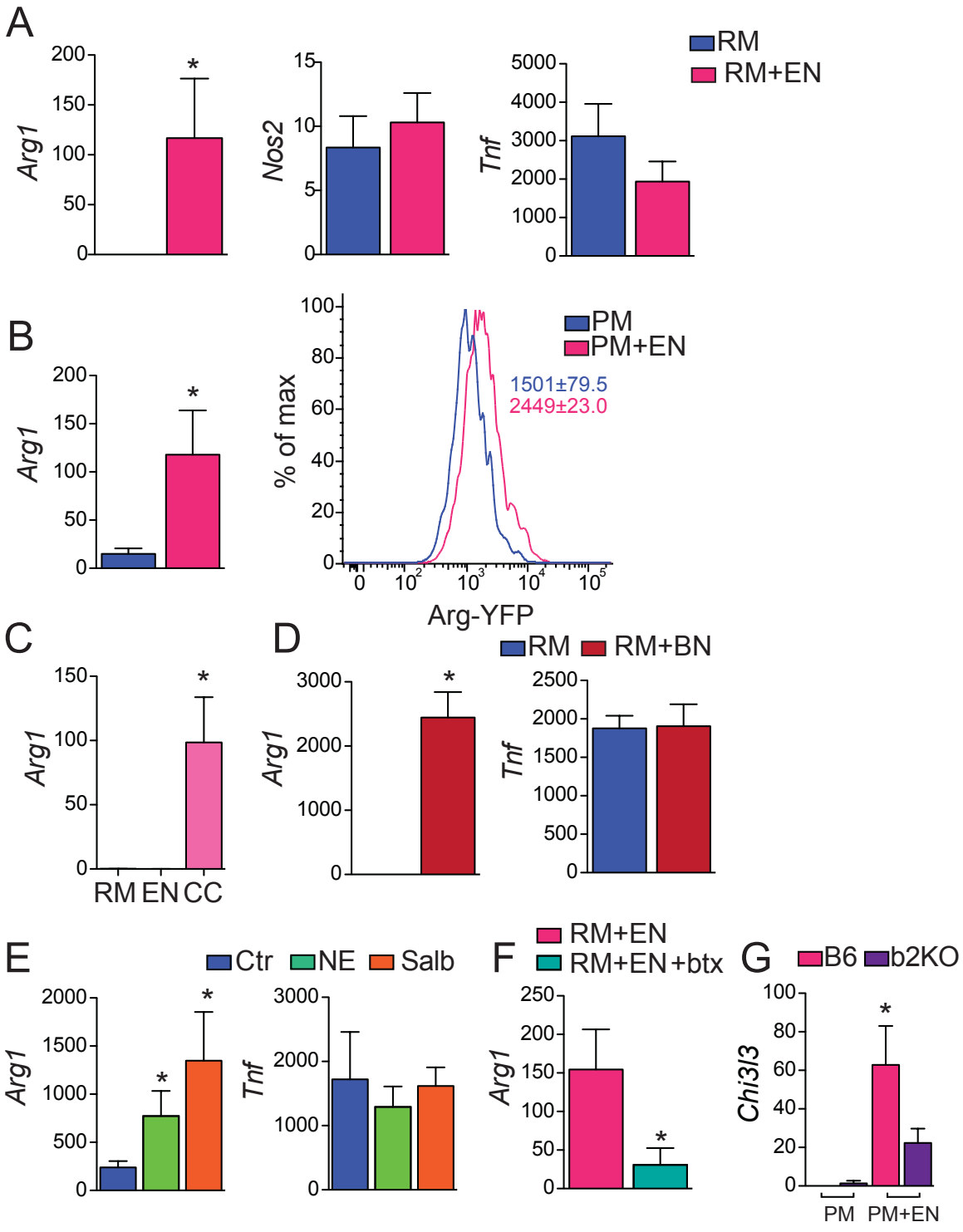
Como uma espécie de controle positivo cultivamos RM com neurônios provenientes do cérebro, nestas condições observamos as mesmas respostas obtidas quando estes macrófagos eram cultivados com neurônios provenientes do intestino (Figura 2D).

Sabendo que a indução de genes relacionados aos macrófagos do tipo M2 como a *Arg1* e *Chi3l3* pode ocorrer via adrb2R (GRAILER et al., 2014), decidimos analisar se a alteração da expressão gênica que observamos estaria ocorrendo via ativação destes receptores.

Primeiramente confirmamos que a ativação dos adrb2R induziria a expressão de *Arg1* em nossos macrófagos. Tratamos estas células por 1h com NE ou Salbutamol (salb), um agonista

especifico do adrb2R e confirmamos que a ativação deste receptor induz a expressão de *Arg1* e não afeta a expressão de *Tnf* (Figura 2E). Para avaliar se este receptor era relevante em nosso modelo de cocultura, procurando entender melhor como as células neuronais poderiam estar induzindo a expressão de *Arg1* adicionamos btx, um antagonista dos adrb2R, à cocultura. Confirmamos com isso que a ativação do adrb2R era relevante, pois observamos que na presença de btx, a indução da *Arg1* era inibida (Figura 2F). Outro resultado que apoia a ideia de que a ativação do adrb2R é relevante é a expressão de *Chi3l3* nos macrófagos peritoneais provenientes de camundongos b2KO submetidos a cocultura, quando comparamos esta expressão aquela observada em macrófagos peritoneais provenientes de camundongos C57BL/6, percebemos que indução de *Chi3l3* é significativamente menor nos macrófagos que não apresentam adrb2R funcionais (Figura 2G). Estes dados corroboram a ideia de que a indução dos genes característicos de macrófagos M2 estaria ocorrendo através da ativação dos adrb2R.

Figura 2 - Confirmação *in vitro* do papel dos neurônios nas alterações de expressão gênica dos macrófagos




Fonte: (GABANYI, I., 2015).

Legenda: Experimentos *in vitro* confirmaram que o aumento da expressão dos genes *Arg1* e *Chi3l3* poderia estar sendo induzida por neurônios. Os macrófagos da linhagem RAW (RM) foram analisados por RT-qPCR após a permanência em cocultura com neurônios provenientes de percursores neuronais intestinais (EN). Comparando a cultura de RM sozinhos (barra azul) e a cocultura (barra rosa) observamos, nestes macrófagos, a indução da expressão de *Arg1* e que a expressão de *Nos2* e *Tnf* não

era alterada (A). Macrófagos peritoneais (PM) de camundongos $Arg^{YFP}$ foram submetidos a cocultura e a expressão da Arg foi analisada por citometria de fluxo. Observamos um aumento da expressão, representado pela intensidade media de fluorescência ± erro padrao quando estes PM eram cultivados junto com os EN, por RT-qPCR observamos o aumento de *Arg1* e *Chi3l3* quando PM eram submetidos a cocultura (PM+EN) (B,G). A expressão de *Arg1* era também induzida quando cultivávamos RM em meio condicionado proveniente da cocultura (CC) (barra rosa clara), esta indução não era observada quando estes macrófagos eram cultivados com meio condicionado proveniente da cultura de RM sozinhos ou de EN sozinhos (C). A cocultura de RM com neurônios extraídos do cérebro (BN) (barra vermelho escuro) também induziu a expressão de *Arg1* e não alterou a expressão de *Tnf* (D). A adição de NE (barra verde clara) ou Salbutamol (barra laranja) por 1h, também induziram um aumento na expressão de *Arg1* e não tiveram efeito sobre a expressão de *Tnf* (E). A adição da btx durante a cocultura (barra verde) inibiu o aumento de expressão observado em cocultura (barra rosa) (F). Macrófagos peritoneais proveniente de C57BL/6 (B6; barra rosa) quando em cocultura tinham a expressão de *Chi3l3* induzida, já os macrófagos peritoneais provenientes de b2KO (barra roxa) submetidos as mesmas condições não apresentavam uma indução tão expressiva (G).
* $p < 0.05$.

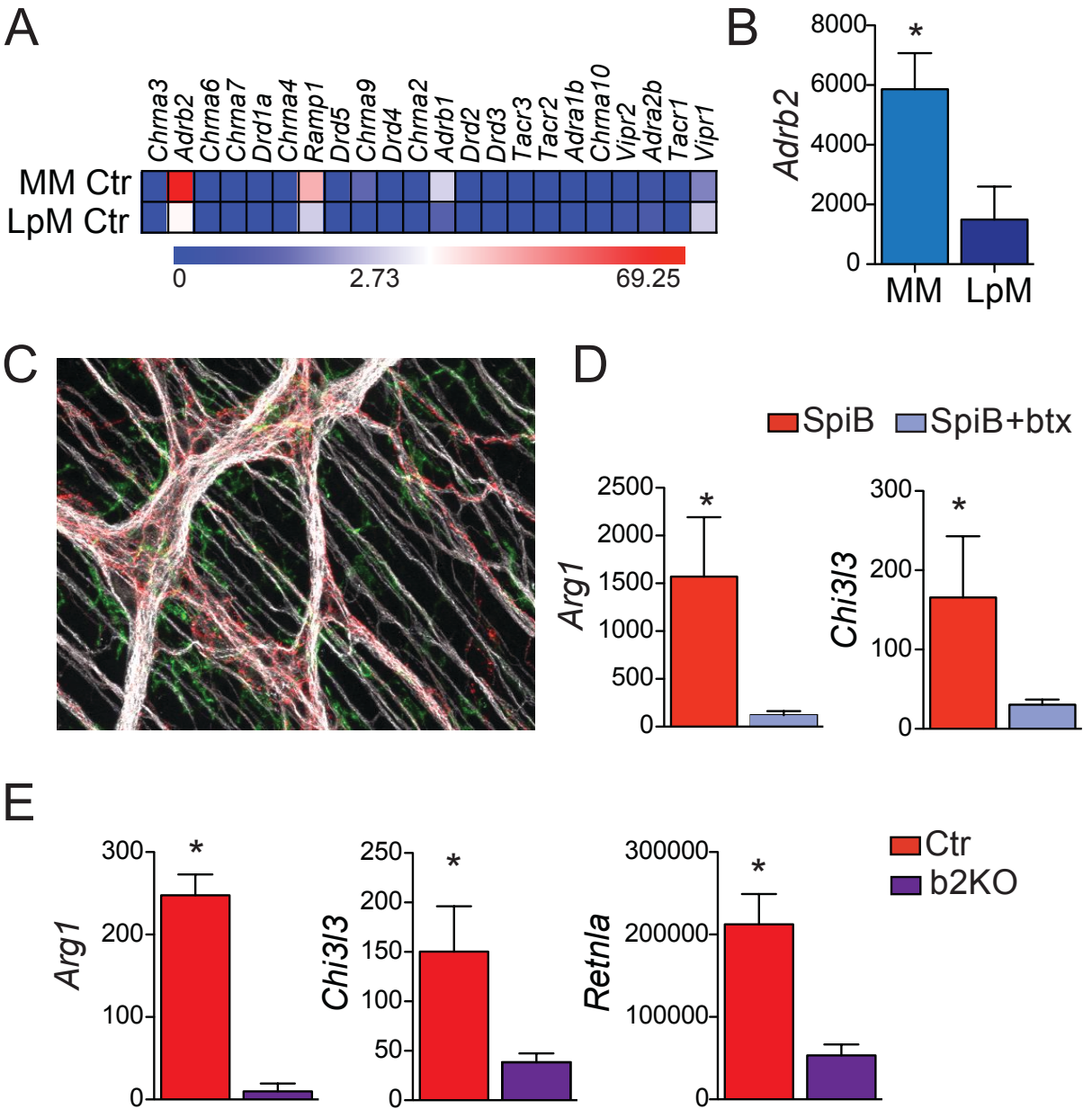
## 5.3 PAPEL DOS RECEPTORES β2 ADRENÉRGICOS NA REGULAÇÃO DE GENES ANTI-INFLAMATÓRIOS NOS MACRÓFAGOS INTESTINAIS

O rápido aumento da expressão de *Arg1* e *Chi3l3* nos MM que estão distantes do estímulo e o aumento da expressão destes genes em macrófagos cultivados com células neuronais, indicam a presença de um estímulo neuronal na regulação destes genes. A indução destes genes na presença de NE ou Salbutamol reforçam esta ideia e ainda indicam que o adrb2R também esta envolvido nesta regulação. A inibição deste aumento na presença de btx ou em macrófagos que não expressam adrb2R, evidencia ainda mais o papel deste receptor. Como estes últimos dados foram obtidos *in vitro*, decidimos avaliar, *in vivo,* o papel destes receptores.

Primeiramente analisamos quais receptores de estímulos neuronais estariam presentes nos macrófagos intestinais e quais teriam uma expressão diferencial entre as duas populações estudadas. Observamos que dentre os genes correspondentes aos receptores de estímulos neuronais, poucos tinham uma expressão considerável nestas células e que o *Adrb2* era o mais expresso deles, apresentando uma diferença significativa entre as duas populações sendo mais expresso nos MM (Figura 3A). Esta diferença foi confirmada no banco de dados do ImmGen e por RT-qPCR (Figura 3B). Os adrb2R respondem à NE, portanto fomos investigar se a NE poderia estar sendo liberada na região da *muscularis* do intestino. Os neurônios que produzem NE expressam a enzima tirosina hidroxilase (TH), através de imunofluorescência pudemos confirmar a presença desta enzima nos neurônios presentes na *muscularis* e que estes se

encontravam próximos aos MM (Figura 3C). Com o intuito de analisar se este receptor desempenhava de fato um papel importante na indução de genes anti-inflamatórios nos MM utilizamos novamente a btx, desta vez *in vivo*. Ao injetar a btx nos camundongos imediatamente antes da gavagem com SpiB éramos capazes de inibir o aumento da expressão de *Arg1* e *Chi3l3* nos MM destes animais (Figura 3D). Finalmente, utilizando camundongos b2KO, que não expressam adrb2R funcionais, observamos que na ausência deste receptor a indução da expressão dos genes *Arg1*, *Chi3l3* e *Retnla*, 2h após a gavagem com SpiB, não ocorria (Figura 3E).

Figura 3 – Papel do adrb2R na interação neurônio-macrófago no intestino




Fonte: (GABANYI, I., OLIVEIRA. Y. T., 2015).

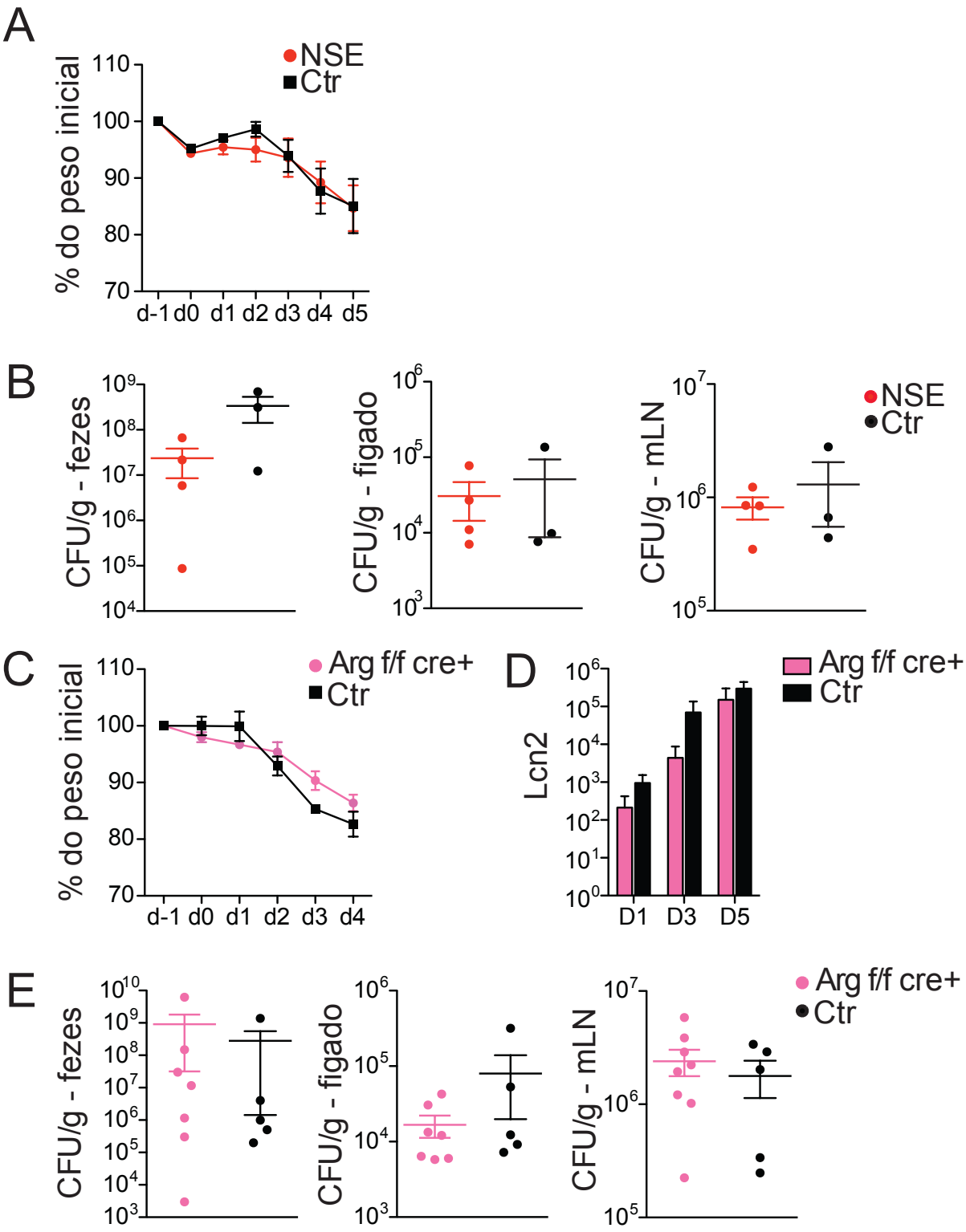
Legenda: Análise dos dados do transcriptoma revelaram que dentre os receptores de estímulos neuronais o adrb2R era o mais expresso e que havia uma expressão diferencial do gene *Adrb2*, sendo este mais expresso nos MM do que nos LpM (A). Por RT-qPCR confirmamos que este gene era mais expresso nos MM (barra azul clara) que nos LpM (barra azul escura) (B). Imunofluorescência da camada da *muscularis* do intestino, demonstrando a presença de TH marcado em vermelho, os neurônios marcados com anti-tubulina β3 em branco e em verde os macrófagos marcados com anti-MHCII, foto representativa, aumento de 200x (C). Adição de btx inibe o aumento de expressão da *Arg1* e *Chi3l3* (barra verde) observado após o estímulo por 2h com SpiB (barra vermelha) (D). Os MM dos camundongos b2KO (barra roxa) tem uma expressão muito menor dos genes *Arg1*, *Chi3l3* e *Retnla,* após o estímulo por 2h com *SpiB*, quando comparados com MM dos C57BL/6 (B6; barra vermelha) (E). * $p < 0.05$.

## 5.4 CAMUNDONGOS NSE-NOGGIN OU ARG$^{FLOX}$LYSM$^{CRE}$ NÃO APRESENTAM UMA RESPOSTA ALTERADA À INFECÇÃO POR *SALMONELLA*

Visto que a presença de *SpiB* induz a expressão de genes ligados ao reparo tecidual nos MM e que os resultados obtidos neste trabalho levam a crer que esta indução se da por via neuronal, decidimos verificar se o aumento do número de neurônios entéricos ou a ausência da enzima Arginase nos camundongos poderia provocar uma alteração na resposta à uma infecção por *Salmonella.* Para tal, utilizamos os camundongos NSE-Noggin que apresentam uma maior rede neuronal no intestino e os camundongos Arg$^{flox}$LysM$^{cre}$ que não expressam *Arg1* especificamente em macrófagos.

Acompanhamos o curso da infecção por *Salmonella* comparando estes camundongos com seus respectivos controles. Nos camundongos NSE-Noggin observamos que a perda de peso era muito similar ao controle (Figura 4A) e que no momento da eutanásia o número de unidades formadoras de colônia (CFU) encontradas nas fezes, fígado e linfonodos mesentéricos (mLN) era também muito similar (Figura 4B). Nos Arg$^{flox}$LysM$^{cre}$ também não observamos nenhuma diferença significativa na perda de peso (Figura 4C) nem na CFU coletadas dos diferentes locais (Figura 4E). Nestes animais verificamos, pela presença da Lcn2, a inflamação intestinal ao longo do curso da infecção, porém, também não encontramos diferenças significas entre as duas linhagens de camundongos infectados (Figura 4D).

Figura 4 – Análise da resposta a *Salmonella* em camundongos NSE-Noggin e $Arg^{flox}LysM^{cre}$




Fonte: (GABANYI, I., 2015).

Legenda: Infecção por *Salmonella* em camundongos NSE-Noggin (A,B) e $Arg^{flox}LysM^{cre}$ (C,D,E). Não foram observadas diferenças na resposta à infecção nestes camundongos quando comparados aos respectivos controles. Não houve diferença na perda de peso durante o curso da infecção. Em A e C os gráficos mostram a perda de peso relativa nos respectivos dias pós-infecção. Em B e E esta representado o

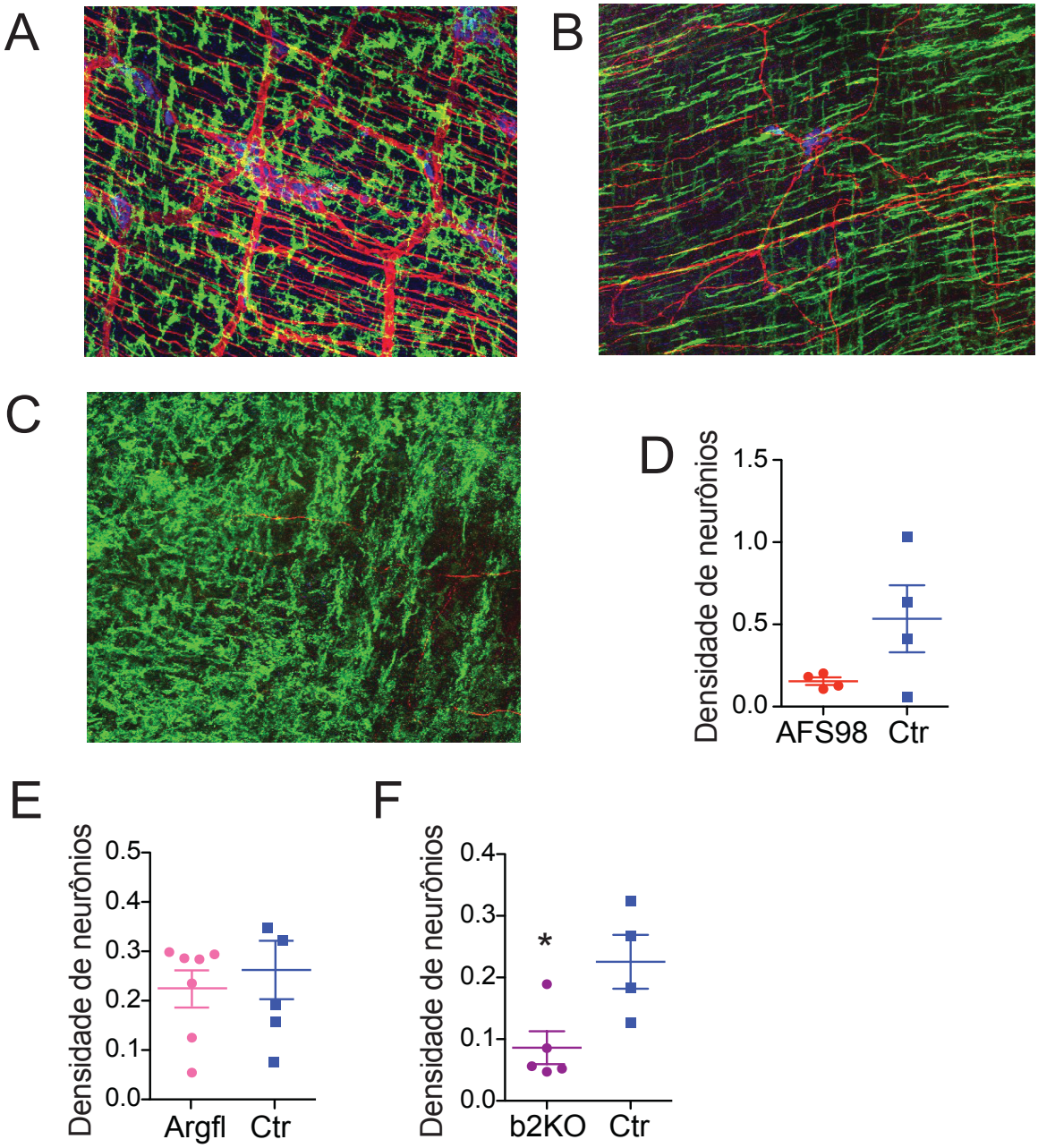
número de CFU por grama dos respectivos órgãos que foram analisados ao fim do curso da infecção. Em D, demonstramos que a expressão da proteína Lcn 2, um marcador de inflamação, nos dias 1, 3 e 5 pós-infecção é similar entre o $Arg^{flox}LysM^{cre}$ e o controle.

## 5.5 MACRÓFAGOS INTESTINAIS DESEMPENHAM PAPEL PROTETOR EM NEURÔNIOS INTESTINAIS

Uma das hipóteses que investigamos era a de que estes macrófagos presentes na região da *muscularis* poderiam ter um papel neuroprotetor, visto que frente a uma eminente injuria do tecido, dada pela presença da *Salmonella* no lúmen, estes passam a expressar genes ligados ao reparo tecidual.

Para verificar se estes MM poderiam proteger os neurônios da injuria, utilizamos um modelo químico de denervação do plexo mioentérico e avaliamos a recuperação neuronal em diferentes linhagens de camundongos. Passados 15 dias da injuria avaliamos por imunofluorescência o nível de regeneração dos neurônios, que quando comparados com o controle (Figura 5A) variavam entre danos médios (Figura 5B) e severos (Figura 5C). A quantificação da densidade neuronal após a injuria identificou que em camundongos tratados com anti-Csf1R (AFS98) capaz de eliminar os macrófagos intestinais (MACDONALD et al., 2010) a recuperação dos neurônios do plexo mioentérico parece estar comprometida, porém, apesar da clara tendência, essa diferença não chega a ser significativa (Figura 5D). Já na presença de macrófagos que não produzem a enzima Arginase a recuperação neuronal não é alterada (Figura 5E). No entanto na presença de macrófagos que não expressam adrb2R funcionais pudemos observar que a recuperação neuronal fica comprometida (Figura 5F) demonstrando que os MM podem sim desempenhar um papel neuroprotetor e que para cumprir esta função é necessário a presença do adrb2R.

Figura 5 – Recuperação neural de camundongos submetidos a denervação do plexo mioentérico




Fonte: (GABANYI, I., MULLER, P.A., 2015).

Legenda: A camada da *muscularis* intestinal dos camundongos submetidos a denervação do plexo mioentérico foram analisados por imunofluorescência 15 dias após a indução do dano e a densidade neuronal foi analisada. Imagens representativas de um local que não sofreu dano (A), um local com dano médio (B) e um severo (C). Os neurônios que aparecem em vermelho foram marcados com o anticorpo anti-tubulina b3, em azul o núcleo destes aparecem através da marcação com anti-HU e os macrófagos marcados em verde com anti-MHCII. A quantificação do dano foi analisada através da densidade de neurônio observada, em camundongos tratados com anticorpo anti-CSF1 (AFS98; pontos vermelhos) que leva a morte dos macrófagos observamos uma tendência forte de uma piora na recuperação dos neurônios intestinais, porém não significativa (D), em camundongos $Arg^{flox}LysM^{cre}$ (Argfl; pontos rosas) a recuperação era bastante similar ao controle (E), utilizando camundongos b2KO (pontos roxos) observamos que sua recuperação era pior do que a observada nos camundongos controle (quadrados azuis) (F). * $p < 0.05$.

# 6 DISCUSSÃO

O conjunto de dados obtidos neste trabalho indica a presença de uma relação bidirecional entre os neurônios presentes no intestino e os MM, na qual neurônios ao perceberem a presença de uma bactéria potencialmente patogênica no lúmen intestinal liberam NE. Esta catecolamina inicia uma cascata de sinais através da ativação dos adrb2R que induzem os MM a exibirem um fenótipo anti-inflamatório e reparador de tecido, esta alteração de fenótipo poderia então ajudar na proteção destes neurônios em caso de injuria tecidual.

Os resultados aqui apresentados reforçam ainda que as populações de macrófagos encontradas no intestino, LpM e MM, além do perfil de expressão genica distinto em homeostase, não respondem da mesma forma à presença de bactérias potencialmente patogênicas no lúmen. Portanto estas populações devem ser estudadas em separado e generalizações a respeito do comportamento dos macrófagos intestinais devem ser vistas com cautela, dado a existência de duas populações de macrófagos que podem responder de forma oposta a determinados estímulos.

As interações que ocorrem no intestino se tornam ainda mais complexas quando consideramos a microbiota que esta presente no lúmen intestinal, por exemplo, a colonização e a homeostase das células da Glia na mucosa intestinal são controladas pela microbiota (KABOURIDIS et al., 2015). Poderíamos supor que os LpM apresentam um perfil mais relacionado aos macrófagos M1 pois estão mais próximos e expostos as bactérias comensais e seus produtos, porém a diferença de expressão gênica dos LpM e MM não parece estar relacionada com a microbiota pois observamos que em camundongos axênicos essa diferença de perfil entre as duas populações de macrófagos intestinais continua a existir. Uma outra explicação que não fomos capazes de testar neste trabalho, seria a de que esta diferença se deva a densidade neuronal relativa à qual estas células estão expostas, a maior densidade neuronal na *muscularis* poderia levar os macrófagos ai presentes a um perfil mais M2.

Os macrófagos intestinais exibem uma função tolerogênica no intestino mediada pela expressão do receptor de IL-10, na ausência destes receptores os macrófagos se tornam mais pró-inflamatórios e geram colite nos camundongos (ZIGMOND et al., 2014). Pela analise do transcriptoma, comparando as duas populações de macrófagos presentes no intestino observamos que os MM tem uma expressão maior dos *Il10R,* reforçando a nossa ideia de que

estes macrófagos se assemelham mais aos macrófagos anti-inflamatórios do que os LpM. Poderíamos fazer uma analogia entre o papel da IL-10 e da NE, pois durante a homeostase a IL-10 mantem os macrófagos em um estado tolerogênico, evitando uma resposta inflamatória desnecessária, porém, na presença de uma eminente infecção sua influência sobre os macrófagos se tornaria menos relevante, quando estes passariam a responder a NE que os manteria em um perfil anti-inflamatório, prevenindo assim uma resposta inflamatória excessiva, prejudicial as células do tecido, incluindo os próprios neurônios pois inflamação aguda severa interfere com a neurogênese e a capacidade regenerativa do sistema nervoso (KABOURIDIS; PACHNIS, 2015).

Escolhemos utilizar neste trabalho um tempo curto entre estímulo e análise (2h pós-gavagem) e mutantes de *Salmonella* (SpiB e invA) que dificilmente atingem a região da *muscularis* intestinal, para avaliar a possível existência de uma transmissão de sinal neuronal proveniente do lúmen que atingisse os MM. Ao verificar que os MM respondiam rapidamente ao estímulo presente no lúmen, utilizamos um sistema de cocultura entre neurônios e macrófagos cujos resultados obtidos *in vitro* reforçam a hipótese que implica os neurônios como indutores das alterações de expressão gênica observadas nos MM. Fomos capazes ainda de estabelecer, segundo nosso resultados *in vitro e in vivo* que estas alterações eram mediadas pelos adrb2R em resposta à liberação de NE próxima a estes macrófagos.

Não podemos afirmar de forma definitiva que a indução da alteração da expressão gênica nos MM é de fato neuronal, pois outros tipos celulares são também capazes de liberar NE. Como exemplo, células T e B do baço são capazes de produzir catecolaminas em resposta ao estresse (LAUKOVA et al., 2013), e macrófagos do tipo M2 encontrados no tecido adiposo são responsáveis pela expressão de catecolaminas em resposta ao frio (NGUYEN et al., 2011).

Porém em nosso trabalho, ao analisar no intestino a presença da enzima TH responsável por catalisar a conversão de (L-) tirosina em L-DOPA, precursor para a geração de NE, observamos sua presença somente nas células neuronais. O padrão de marcação encontrado indica a presença de TH nas ramificações neuronais e não nos corpos neuronais sugerindo que a NE estaria sendo produzida pelos neurônios simpáticos que inervam o intestino.

Para confirmar definitivamente que são os adrb2R presentes nos MM e não em algum outro tipo celular, como por exemplo, os neurônios entéricos que também expressam estes receptores, teríamos que utilizar camundongos cuja expressão do adrb2R seja inibida somente em macrófagos, cruzando por exemplo um camundongos $LysM^{cre}$ com $adrb2^{flox}$, porém

infelizmente estes camundongos não estavam disponíveis a tempo durante para a realização deste trabalho. Contudo nossos resultados *in vitro*, utilizando macrófagos peritoneais provenientes de camundongos b2ko indicam que de fato são os adrb2R presentes nos macrófagos que tem um papel essencial na indução da expressão de genes relacionados com macrófagos do tipo M2.

A ideia de que a NE possa induzir alterações nas células imunes não é nova, sabe-se que o sistema nervoso autônomo pode agir como um importante modulador de respostas imunes, exercendo papel tanto pró como anti-inflamatório através de sua influência nas células imunes efetoras (HANOUN et al., 2015). As catecolaminas já foram implicadas em diversos aspectos da imunidade inata e adaptativa, incluindo a capacidade de modular a eficiência da apresentação de antígenos pelas células dendríticas, a expansão clonal de linfócitos entre outros (TRACEY, 2009).

Camundongos que não são capazes de produzir NE exibem uma resposta alterada após infecção ou desafio imunológico, apesar destes camundongos apresentarem um sistema imunológico normal em condições SPF (*Specific Pathogen Free*) (ALANIZ et al., 1999). Em nosso trabalho, descrevemos mais um aspecto da imunidade inata na qual a NE estaria atuando, a modulação de uma resposta anti-inflamatória e reparadora de tecido nos MM frente a uma possível infecção intestinal bacteriana.

A importância da regulação de diversos processo via SNS vai além de sua atuação sobre as células do sistema imune. A influência dos neurônios simpáticos já foi descrita nos mais diversos sistemas, incluindo por exemplo o tecido ósseo, onde a sinalização via adrb2R presente nos osteoblastos controla a formação óssea (TAKEDA et al., 2002).

Nossos resultados indicam que no caso da imunidade inata, especificamente nos macrófagos presentes na região da *muscularis* intestinal, a ausência de adrb2R funcionais impede uma resposta apropriada a estímulos provenientes do lúmen, enfatizando a importância destes receptores na via de ativação de genes ligados a macrófagos M2 após o desafio com bactérias potencialmente patogênicas.

A implicação dos adrb2R em vias de resposta anti-inflamatória também não é novidade, porém é possível encontrar na literatura uma diversidade em relação ao papel dos receptores β adrenérgicos, cuja resposta a sua ativação parece depender de quais estímulos estão presentes e das características intrínsecas das células analisadas.

Em modelos de injuria aguda experimental no pulmão o uso de agonistas do adrb2R apresentou um efeito anti-inflamatório, reduzindo os níveis de mediadores pró-inflamatórios e neutrófilos acumulados nos pulmões. Neste mesmo trabalho observou-se também os efeitos

anti-inflamatórios da ativação dos adrb2R *in vitro* em macrófagos peritoneais, sendo que estes efeitos pareciam ser mediados pela fosforilação da quinase Jun-N-terminal (JNK) (BOSMANN et al., 2012). Outros trabalhos *in vitro* corroboram a ideia de que a ativação dos adrb2R induza uma resposta anti-inflamatória no macrófagos de diversos tecidos. Os macrófagos provenientes do baço ou dos linfonodos tem a expressão de Tnf suprimida em resposta ao LPS quando estimulados com agonistas do adrb2R (IGNATOWSKI; GALLANT; SPENGLER, 1996). Em células U937 diferenciadas em macrófagos observa-se a diminuição não só do TNF como também da IL6 e um aumento da produção de IL10, quando estas são desafiadas com LPS na presença de agonistas do adrb2R (IZEBOUD et al., 1999).

No entanto, outros trabalhos indicam que a sinalização via adrb2R pode ocorrer de distintas maneiras o que pode levar a resultados opostos, como por exemplo, a ativação destes receptores na ausência de outro estímulo como o LPS pode levar a uma regulação positiva da expressão de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1β e IL-6 (TAN et al., 2007) e na presença de PMA a ativação dos receptores β adrenérgicos leva a um aumento da produção de Tnf, Il12 e NO, sendo que na presença de LPS a produção de mediadores inflamatórios é diminuída. É importante notar que neste trabalho também ficou demonstrado que a presença de agonistas dos receptores β adrenérgicos suprimi a fosforilação de ERK1/2 e p38 induzida pelo LPS porém exacerba a fosforilação induzida pelo PMA (SZELENYI et al., 2006). Resultados opostos também foram observados na secreção de IL-6, na ausência de TNF a NE via receptores β adrenérgicos induz a produção de IL-6, enquanto na presença de TNF a mesma via inibe esta produção, sendo que estes resultados são observados somente no tecido intestinal normal e não no inflamado (STRAUB et al., 2005). Portanto apesar do nosso e de diversos outros trabalhos implicarem a NE e os adrb2R em processo anti-inflamatórios, é importante lembrar que os macrófagos dos diferentes tecidos exibem um fenótipo especifico e estão expostos a um microambiente especifico (DAVIES et al., 2013; LAVIN et al., 2014) o que pode fazer com que a ativação dos adrb2R nas diferentes condições nem sempre leve a uma resposta de perfil anti-inflamatório.

Vale lembrar também que em alguns trabalhos que indicam um efeito pró-inflamatório da NE em macrófagos não fica claro por qual via a NE estaria atuando (XIU; STANOJCIC; JESCHKE, 2013). Tendo em vista a descrição de efeitos antagônicos na ativação dos receptores α e β adrenérgicos (SZELENYI; KISS; VIZI, 2000) é possível imaginar que a NE possa estar atuando via os receptores α nos casos onde este neurotransmissor induz uma resposta pró-inflamatória.

Os receptores adrenérgicos do tipo α parecem ter um papel importante na regulação da produção de NO e no desenvolvimento do íleo pós-operatório, no qual, os monócitos recrutados após a operação expressando os receptores α e não os macrófagos residentes do tecido, parecem produzir NO a partir da ativação destes receptores e piorar o quadro inflamatório observado (KREISS; TOEGEL; BAUER, 2004). Nosso resultados mostram que a expressão de receptores adrenérgicos do tipo α é extremamente baixa nos macrófagos intestinais. A diferença de expressão dos diferentes tipos de receptores adrenérgicos nas distintas populações de macrófagos deve ser avaliada a fim de entender melhor os efeitos da NE nas populações de interesse.

Não analisamos o porque dos LpM não responderem a liberação de NE de forma similar aos MM, porém algumas evidências aqui encontradas podem explicar este fenômeno. Em primeiro lugar a expressão dos adrb2R nos LpM é muito mais baixa que nos MM, em segundo lugar o microambiente ao qual os LpM e os MM estão expostos são diferentes. Os LpM se localizam próximos as bactérias intestinais e seus produtos, em um local que parece receber uma inervação simpática menos densa que a observada próxima aos MM (CHEN et al., 2015). Portanto, provavelmente os LpM não respondem de forma similar à NE pois em seu entorno a liberação deste neurotransmissor seria menos expressiva e sua capacidade de responder a este sinal também seria menos eficiente devido a uma menor expressão dos receptores β adrenérgicos.

Fomos capazes de descrever neste trabalho pela primeira vez uma interação entre os neurônios e os macrófagos intestinais, na qual a liberação de NE induzida pela presença de uma bactéria potencialmente patogênica no lúmen intestinal induz nos MM um fenótipo mais similar aos macrófagos M2 via adrb2R. Visto que na literatura trabalhos sugerem que a interação hospedeiro-patógeno presente no intestino talvez tenha que ser vista de outra forma, na qual ao invés do hospedeiro estar produzindo mecanismos de defesa em resposta a uma possível infecção, poderia ser o próprio patógeno a estar alterando sua virulência e invasividade por vias que envolvam neurotransmissores (LOMAX; SHARKEY; FURNESS, 2010). E que é possível que bactérias altamente patogênicas possam ter evoluído a habilidade de explorar a via de regulação neuroimune capaz de suprimir a resposta imune para facilitar sua virulência e disseminação nos tecidos infectados (CHIU et al., 2013).

Decidimos portanto, avaliar se a indução da liberação de NE e a consequente elevação na expressão dos genes anti-inflamatórios após o estimulo com SpiB poderiam ser benéficas para o patógeno, pois a capacidade de neurotransmissores atuarem no curso de infecções bactérianas já foi demonstrada. Em modelo de peritonite induzido por *E.Coli* o tratamento

com nicotina levou a uma maior mortalidade, por reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias e o influxo de neutrófilos (VAN WESTERLOO et al., 2005). Já em infecções por *Salmonella* o tratamento sub-crônico com inibidores da enzima Acetilcolinesterase, que gera um acúmulo de acetilcolina, aumentou a sobrevida destes animais (FERNANDEZ-CABEZUDO et al., 2010). Visto que o Oxido nítrico tem um alto poder microbicida e que a enzima iNOS esta altamente relacionada com atividade antimicrobiana, o aumento da enzima Arginase, enzima que compete com iNOS por terem o mesmo substrato (L-arginina) pode ser benéfica para o sucesso da infecção (LAHIRI et al., 2010).

Sendo a *Arg1* um dos genes cuja indução era mais expressiva, após a exposição dos animas à SpiB, decidimos submeter camundongos $Arg^{flox}LysM^{cre}$ à infecções com *Salmonella.* Porém, comparando com seus respectivos controles, fomos incapazes de detectar alterações nas respostas dos $Arg^{flox}LysM^{cre}$ durante o curso da infecção por *Salmonella,* indicando que esta via não é beneficial para a *Salmonella.* Porém é importante ressaltar que neste modelo fomos capazes somente de avaliar a importância de um único gene, como a resposta à *Salmonella* depende de diversos fatores, poderia ser esperado que a ausência de um único gene não altere o curso da infecção, portanto estes resultados não apoiam ou refutam a ideia de que a *Salmonella* possa estar induzindo a liberação de NE para beneficio próprio. Idealmente gostaríamos de testar a resposta dos camundongos b2ko a este tipo de infecção, pois na ausência destes receptores diversos genes seriam inibidos, porém estes camundongos são gerados a partir de uma mistura de genótipos que impedia o uso de controles apropriados.

Visto que a indução dos genes anti-inflamatórios parece ser via neuronal avaliamos também se seriamos capazes de encontrar respostas alteradas a infecções por *Salmonella* no camundongos NSE-Noggin, no entanto apesar de já haver sido demonstrado que os NSE-Noggin são mais susceptíveis a modelos de inflamação intestinal (MARGOLIS et al., 2011), nossos resultados demonstraram que frente a uma infecção bacteriana estes camundongos não apresentam uma resposta diferente do controle.

Decidimos então avaliar a relevância desta via anti-inflamatória e destes macrófagos em outro contexto, visto que a importância dos macrófagos intestinais, por exemplo, como reparadores de tecido já foi demonstrada em modelos de injuria do tecido epitelial intestinal, no qual a ausência de neutrófilos ou citocinas Th1 não influenciou a resolução final da injuria, porém em camundongos cujos macrófagos não expressavam o gene ligado ao reparo tecidual, *Trem2* a injuria não era resolvida (SENO et al., 2009), gene este que apresenta uma maior expressão nos MM que nos LpM.

Apoiados na ideia de que as relações neuroimunes podem ser bidirecionais, sendo o sistema nervoso capaz de regular células do sistema imune, assim como estas células são capazes de afetar neurônios, modulando por exemplo a formação e/ou remodelamento de redes neuronais (ROSAS-BALLINA; TRACEY, 2009), e fazendo uma analogia com a micróglia, os macrófagos residentes do cérebro, que parecem desempenhar um papel de monitoramento do bem estar dos neurônios e serem capazes de alterar seu comportamento quando percebem mudanças no nível de atividade neuronal e responder prontamente à injurias no cérebro (NIMMERJAHN; KIRCHHOFF; HELMCHEN, 2005). Decidimos analisar se esta comunicação que havíamos observado entre neurônios e macrófagos intestinais, não seria na verdade uma comunicação bidirecional, onde os neurônios induziram a expressão de determinados genes nos MM, afim de que estas células executassem um papel neuro-protetor frente a um potencial dano no tecido.

Outros dados descritos na literatura corroboravam essa ideia, dentre os genes responsivos à NE que descrevemos aqui o *Retnla* já foi implicado em modular a expressão gênica de neurônios periférico sensórias no pulmão (HOLCOMB et al., 2000) e a ativação da enzima Arginase esta implicada em processos de reparo de danos teciduais através da geração de prolina que leva a um aumento na síntese de colágeno (MUNDER, 2009) e geração de poliaminas, que desempenham um papel importante no aumento de proliferação celular, no desenvolvimento do sistema nervoso, axogênesis e efeitos antiapoptóticos e regenerativos nos neurônios (CAI et al., 2002), além de também afetarem diretamente a polimerização e organização de microtúbulos durante a recuperação da mucosa gástrica (MCCORMACK; JOHNSON, 1991; BANAN; MCCORMACK; JOHNSON, 1998). Em modelos animais de esclerose amiotrófica lateral, uma doença neurodegenerativa, o tratamento com L-arginina e a geração de poliaminas via arginase, foram capazes de proteger os neurônios motores da medula espinhal, retardando o aparecimento dos sintomas da doença e prolongando o tempo de vida destes animais (LEE; RYU; KOWALL, 2009). O papel da arginase em suprimir a produção de NO por consumir arginina, produto inicial da síntese de NO, parece também ter um papel importante na proteção dos neurônios entéricos visto que em modelos de colite induzida por TNBS demonstrou-se que o principal fator que gerava a morte neuronal era a produção de NO pelas células imunes que infiltravam o tecido durante a inflamação. A inibição da enzima iNOS levou a uma redução significativa na morte neuronal neste modelo, enquanto a inflamação permaneceu inalterada, demonstrando o papel especifico do NO em induzir a morte celular e não outros eventos relacionados a inflamação (VENKATARAMANA et al., 2015).

Com o intuito de elucidar o possível papel neuro-protetor dos MM utilizamos um modelo químico de injuria neuronal nos neurônios presentes na *muscularis* intestinal. Aplicamos este químico em 3 situações distintas: na ausência de macrófagos, na ausência de Arginase nos macrófagos e na ausência de adrb2R em todas as células do animal e avaliamos a recuperação neuronal nestes 3 contextos 15 dias após a indução dos danos neuronais comparando-os com seus respectivos controles.

Para eliminar os macrófagos presentes no intestino, tratamos o camundongos com anti-CSF1R, ao comparar a injuria destes com animais não tratados observamos uma tendência forte porém não significativa de que a ausência dos macrófagos levava à uma piora na recuperação dos neurônios, a falta de significância pode ser devido ao número reduzido de animais que utilizamos visto que há uma grande variação nos controles, um número maior de animais poderia nos ajudar a determinar se essa diferença era de fato significativa ou não. Entretanto, o uso do anti-CSF1R não garante a total eliminação dos macrófagos presentes no intestino pois este anticorpo não é capaz de eliminar os monócitos $Ly6C^{hi}$, somente os $Ly6C^{low}$, (MACDONALD et al., 2010) visto que os macrófagos intestinais são constantemente repopulados pelos monócitos Ly6Chi (YONA et al., 2013), com o uso deste anticorpo provavelmente estávamos conseguindo apenas uma depleção parcial dos macrófagos intestinais, visto que eles podiam ser repopulados pelos monócitos.

Testamos então a resposta de camundongos $Arg^{flox}LysM^{cre}$ à injuria intestinal, visto que diversos trabalhos citados anteriormente implicam a arginase em processos neuro-protetores, porém observamos que a ausência somente desta enzima nos macrófagos, não é capaz de alterar a recuperação neuronal, novamente como o observado no caso das infecções com *Salmonella* acreditamos que em processos tão complexos a ausência de um único gene não deve ser suficiente para alterar todo o processo, considerando tal hipótese, analisamos se a ausência dos adrb2R que poderia impedir a expressão de uma gama de genes relacionados a proteção tecidual poderia dificultar a recuperação dos neurônios intestinais. Corroborando a nossa hipótese, observamos que na ausência destes receptores a recuperação neuronal se torna deficiente.

Uma função neuro-protetora foi descrita também para as células musculares em modelos de colite induzida por TNBS onde estas células demonstraram a capacidade de induzir a regeneração e proliferação dos axônios dos neurônios intestinais de através da produção de GDNF (HAN et al., 2015). Em nosso trabalho descrevemos e pela primeira vez uma via de interação neuroimune que induz a expressão de um fenótipo de proteção tecidual nos macrófagos que também é benéfico para os neurônios.

Neste trabalho não fomos capazes de analisar como se da a percepção inicial do estímulo. Podemos supor que esta percepção poderia ocorrer de forma direta, visto que os neurônios entéricos apresentam receptores para ácidos graxos de cadeia curta que são produzidos por diversas bactérias (MAYER; TILLISCH; GUPTA, 2015), e que em um modelo de infecção cutânea observou-se que as bactérias, no caso *Staphylococcus aureus,* ativavam diretamente os neurônios que induziam a sensação de dor nos camundongos. Estes mesmo neurônios liberavam peptídeos que modulavam a resposta imune inata durante a infecção, sendo que sua inibição levava a um aumento na inflamação local. Este trabalho ainda testou outras seis espécies de bactérias e todas elas foram capazes de ativar neurônios do gânglio da raiz dorsal, estes neurônios apresentavam um padrão de resposta especifico para cada bactéria oque indica que cada espécie bacteriana utilize moléculas especificas para ativar os neurônios por diferentes mecanismos (CHIU et al., 2013). Infelizmente dentre as bactérias testadas não estava a *Salmonella*, portanto ainda não somos capazes de afirmar que estas bactérias são capazes de ativar neurônios diretamente. Seria possível imaginar uma via indireta na qual os neurônios percebem a presença da bactéria por citocinas geradas pelas células imunes em resposta a presença deste patógeno, dado que neurônios como por exemplo o nervo vago nervo vago é capaz de perceber uma resposta inflamatória através de receptores da citocina Il1b (GOEHLER et al., 2000).

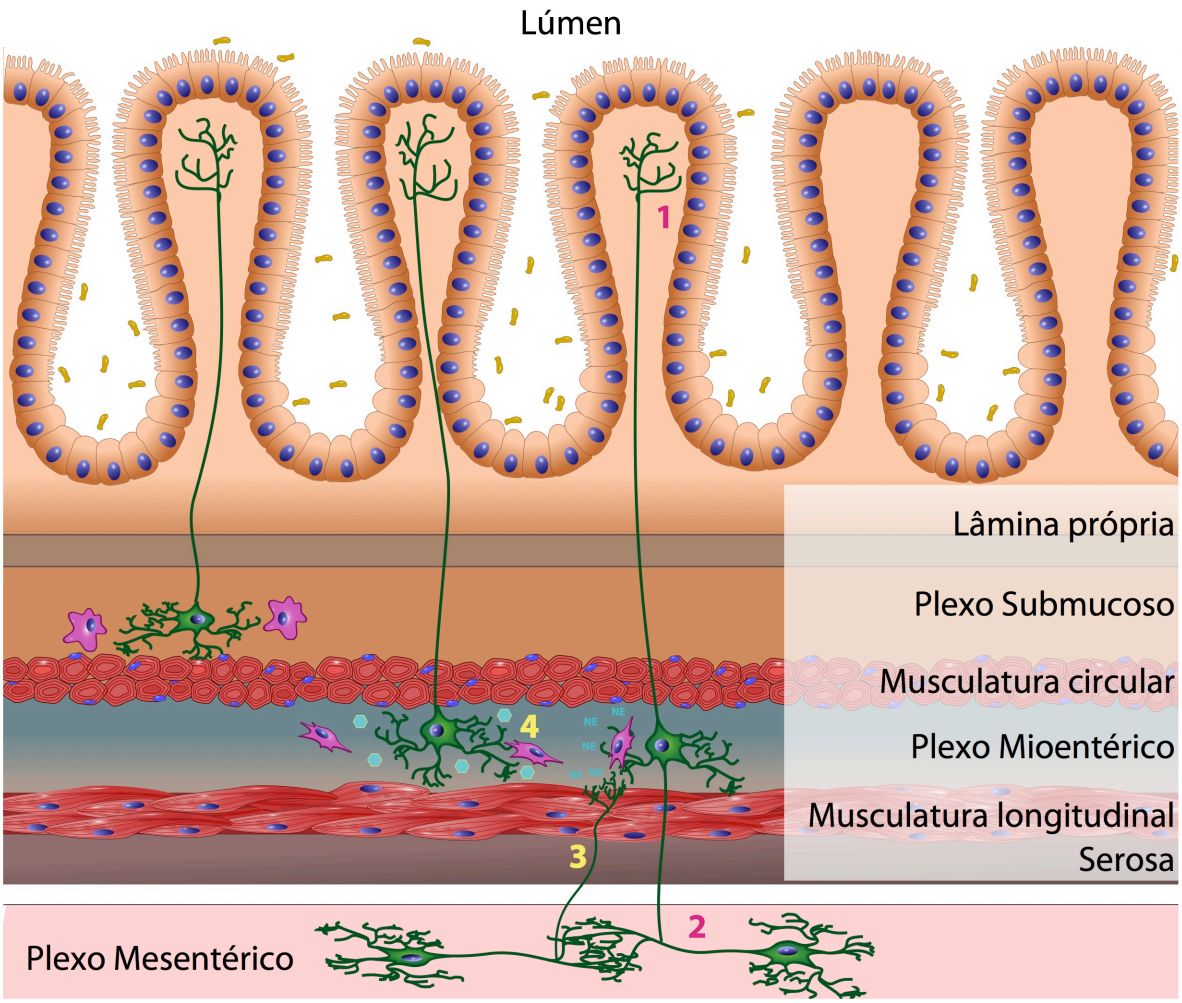
Além da percepção inicial também não investigamos neste trabalho qual seria a fonte de NE, especulamos a partir de dados da literatura e da marcação para TH que obtivemos na *muscularis* intestinal que a NE seria proveniente dos neurônios simpático que inervam o intestino. Dado que os axônios dos neurônios intestinais da classe intestinofugal formam sinapses com o corpo celular de neurônios do gânglio paravertebral simpático, cujos axônios se projetam para o intestino (FURNESS; KUNZE; CLERC, 1999), é possível propor um modelo que inclua uma comunicação entre os neurônios do sistema nervoso entérico e simpático que estejam atuando na percepção das bactérias no lúmen e consequente sinalização e ativação dos MM via adrb2R. Um modelo similar foi proposto nos casos de infecção cutânea por Staphylococous, neste caso foi observado uma supressão da resposta imune nos linfonodos por via neuronal. Este órgão é inervado tanto pelos como por neurônios do sistema nervoso autônomo, portanto a imunossupressão pode ser mediada diretamente pelos neurônios nociceptivos ativados pelas bactérias ou por um circuito que envolva também a ativação dos neurônios do sistemas autônomo (CHIU et al., 2013).

# 7 CONCLUSÕES

Os dados aqui apresentados indicam a existência de uma comunicação bidirecional no intestino entre neurônios e macrófagos (Figura 6). Esta comunicação ocorreria através da ativação dos adrb2R presentes no MM pela presença de NE liberada pelos neurônios simpáticos que inervam o intestino. Com isso estes macrófagos passariam a regular positivamente a expressão de genes anti-inflamatórios e reparadores de tecido, sendo capazes assim de proteger os neurônios no caso de uma injuria tecidual.

Aumentar o entendimento da modulação do sistema nervoso nas células imunes abre caminhos para novas opções terapêuticas para controlar doenças inflamatórias intestinais (HANOUN et al., 2015). Portanto, um maior entendimento da comunicação neuroimune proposta neste trabalho poderá num futuro levar ao desenvolvimento de tratamentos alternativos àqueles frequentemente empregados atualmente no controle de tais doenças.

Figura 6 – Esquema proposto da comunicação bidirecional neurônio-macrófago




(OLIVEIRA. Y. T., GABANYI. I., 2015).

Legenda: Os neurônios por via direta ou indireta percebem a presença de bactérias não-comensais no intestino (1). Este sinal é retransmitido em vários níveis podendo culminar com a ativação de neurônios simpáticos que inervam o intestino (2). Estes neurônios liberam NE próximo aos MM (3). Estes macrófagos liberam moléculas que colaboram na proteção dos neurônios intestinais (4).

# REFERÊNCIAS

ALANIZ, R. C.; THOMAS, S. A.; PEREZ-MELGOSA, M.; MUELLER, K.; FARR, A. G.; PALMITER, R. D.; WILSON, C. B. Dopamine beta-hydroxylase deficiency impairs cellular immunity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 5, p. 2274-2278, 1999.

BANAN, A.; MCCORMACK, S. A.; JOHNSON, L. R. Polyamines are required for microtubule formation during gastric mucosal healing. **Am J Physiol**, v. 274, n. 5, p. G879-885, 1998.

BLERIOT, C.; DUPUIS, T.; JOUVION, G.; EBERL, G.; DISSON, O.; LECUIT, M. Liver-resident macrophage necroptosis orchestrates type 1 microbicidal inflammation and type-2-mediated tissue repair during bacterial infection. **Immunity**, v. 42, n. 1, p. 145-158, 2015.

BOGUNOVIC, M.; MORTHA, A.; MULLER, P. A.; MERAD, M. Mononuclear phagocyte diversity in the intestine. **Immunol Res**, v. 54, n. 1-3, p. 37-49, 2012.

BOSMANN, M.; GRAILER, J. J.; ZHU, K.; MATTHAY, M. A.; SARMA, J. V.; ZETOUNE, F. S.; WARD, P. A. Anti-inflammatory effects of beta2 adrenergic receptor agonists in experimental acute lung injury. **FASEB J**, v. 26, n. 5, p. 2137-2144, 2012.

BUHNER, S.; SCHEMANN, M. Mast cell-nerve axis with a focus on the human gut. **Biochim Biophys Acta**, v. 1822, n. 1, p. 85-92, 2012.

CAI, D.; DENG, K.; MELLADO, W.; LEE, J.; RATAN, R. R.; FILBIN, M. T. Arginase I and polyamines act downstream from cyclic AMP in overcoming inhibition of axonal growth MAG and myelin in vitro. **Neuron**, v. 35, n. 4, p. 711-719, 2002.

CHALAZONITIS, A.; D'AUTREAUX, F.; GUHA, U.; PHAM, T. D.; FAURE, C.; CHEN, J. J.; ROMAN, D.; KAN, L.; ROTHMAN, T. P.; KESSLER, J. A.; GERSHON, M. D. Bone morphogenetic protein-2 and -4 limit the number of enteric neurons but promote development of a TrkC-expressing neurotrophin-3-dependent subset. **J Neurosci**, v. 24, n. 17, p. 4266-4282, 2004.

CHANDRASEKHARAN, B.; BALA, V.; KOLACHALA, V. L.; VIJAY-KUMAR, M.; JONES, D.; GEWIRTZ, A. T.; SITARAMAN, S. V.; SRINIVASAN, S. Targeted deletion of neuropeptide Y (NPY) modulates experimental colitis. **PLoS One**, v. 3, n. 10, p. e3304, 2008.

CHASSAING, B.; SRINIVASAN, G.; DELGADO, M. A.; YOUNG, A. N.; GEWIRTZ, A. T.; VIJAY-KUMAR, M. Fecal lipocalin 2, a sensitive and broadly dynamic non-invasive biomarker for intestinal inflammation. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e44328, 2012.

CHEN, B. N.; SHARRAD, D. F.; HIBBERD, T. J.; ZAGORODNYUK, V. P.; COSTA, M.; BROOKES, S. J. Neurochemical characterization of extrinsic nerves in myenteric ganglia of the guinea pig distal colon. **J Comp Neurol**, v. 523, n. 5, p. 742-756, 2015.

CHIU, I. M.; HEESTERS, B. A.; GHASEMLOU, N.; VON HEHN, C. A.; ZHAO, F.; TRAN, J.; WAINGER, B.; STROMINGER, A.; MURALIDHARAN, S.; HORSWILL, A. R.; BUBECK WARDENBURG, J.; HWANG, S. W.; CARROLL, M. C.; WOOLF, C. J. Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation. **Nature**, v. 501, n. 7465, p. 52-57, 2013.

CLAUSEN, B. E.; BURKHARDT, C.; REITH, W.; RENKAWITZ, R.; FORSTER, I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. **Transgenic Res**, v. 8, n. 4, p. 265-277, 1999.

COLLINS, S. M. The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders. **Gastroenterology**, v. 111, n. 6, p. 1683-1699, 1996.

DAVIES, L. C.; JENKINS, S. J.; ALLEN, J. E.; TAYLOR, P. R. Tissue-resident macrophages. **Nat Immunol**, v. 14, n. 10, p. 986-995, 2013.

FERNANDEZ-CABEZUDO, M. J.; LORKE, D. E.; AZIMULLAH, S.; MECHKARSKA, M.; HASAN, M. Y.; PETROIANU, G. A.; AL-RAMADI, B. K. Cholinergic stimulation of the immune system protects against lethal infection by Salmonella enterica serovar Typhimurium. **Immunology**, v. 130, n. 3, p. 388-398, 2010.

FURNESS, J. B.; KUNZE, W. A.; CLERC, N. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses. **Am J Physiol**, v. 277, n. 5 Pt 1, p. G922-928, 1999.

FURNESS, J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. **J Auton Nerv Syst**, v. 81, n. 1-3, p. 87-96, 2000.

GALAN, J. E.; GINOCCHIO, C.; COSTEAS, P. Molecular and functional characterization of the Salmonella invasion gene invA: homology of InvA to members of a new protein family. **J Bacteriol**, v. 174, n. 13, p. 4338-4349, 1992.

GAUTIER, E. L.; SHAY, T.; MILLER, J.; GRETER, M.; JAKUBZICK, C.; IVANOV, S.; HELFT, J.; CHOW, A.; ELPEK, K. G.; GORDONOV, S.; MAZLOOM, A. R.; MA'AYAN, A.; CHUA, W. J.; HANSEN, T. H.; TURLEY, S. J.; MERAD, M.; RANDOLPH, G. J. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. **Nat Immunol**, v. 13, n. 11, p. 1118-1128, 2012.

GEBOES, K.; COLLINS, S. Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. **Neurogastroenterol Motil**, v. 10, n. 3, p. 189-202, 1998.

GOEHLER, L. E.; GAYKEMA, R. P.; HANSEN, M. K.; ANDERSON, K.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway. **Auton Neurosci**, v. 85, n. 1-3, p. 49-59, 2000.

GRAILER, J. J.; HAGGADONE, M. D.; SARMA, J. V.; ZETOUNE, F. S.; WARD, P. A. Induction of M2 regulatory macrophages through the beta2-adrenergic receptor with protection during endotoxemia and acute lung injury. **J Innate Immun**, v. 6, n. 5, p. 607-618, 2014.

HAN, T. Y.; LOURENSSEN, S.; MILLER, K. G.; BLENNERHASSETT, M. G. Intestinal smooth muscle phenotype determines enteric neuronal survival via GDNF expression. **Neuroscience**, v. 290, p. 357-368, 2015.

HANANI, M.; LEDDER, O.; YUTKIN, V.; ABU-DALU, R.; HUANG, T. Y.; HARTIG, W.; VANNUCCHI, M. G.; FAUSSONE-PELLEGRINI, M. S. Regeneration of myenteric plexus in the mouse colon after experimental denervation with benzalkonium chloride. **J Comp Neurol**, v. 462, n. 3, p. 315-327, 2003.

HANOUN, M.; MARYANOVICH, M.; ARNAL-ESTAPE, A.; FRENETTE, P. S. Neural Regulation of Hematopoiesis, Inflammation, and Cancer. **Neuron**, v. 86, n. 2, p. 360-373, 2015.

HENG, T. S.; PAINTER, M. W.; ELPEK, K.; LUKACS-KORNEK, V.; MAUERMANN, N.; TURLEY, S. J.; KOLLER, D.; KIM, F. S.; WAGERS, A. J.; ASINOVSKI, N.; DAVIS, S.; FASSETT, M.; FEUERER, M.; GRAY, D. H.; HAXHINASTO, S.; HILL, J. A.; HYATT, G.; LAPLACE, G.; LEATHERBEE, K.; MATHIS, D.; BENOIST, C.; JIANU, R.; LAIDLAW, D. H.; BEST, J. A.; KNELL, J.; GOLDRATH, A. W.; JARJOURA, J.; SUN, J. C.; ZHU, Y.; LANIER, L. L.; ERGUN, A.; LI, Z.; COLLINS, J. J.; SHINTON, S. A.; HARDY, R. R.; FRIEDLINE, R.; SYLVIA, K.; KANG, J. The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. **Nat Immunol,** v.9, p.1091-1094, 2008.

HOLCOMB, I. N.; KABAKOFF, R. C.; CHAN, B.; BAKER, T. W.; GURNEY, A.; HENZEL, W.; NELSON, C.; LOWMAN, H. B.; WRIGHT, B. D.; SKELTON, N. J.; FRANTZ, G. D.; TUMAS, D. B.; PEALE, F. V., JR.; SHELTON, D. L.; HEBERT, C. C. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. **EMBO J**, v. 19, n. 15, p. 4046-4055, 2000.

HOLLANDER, D. Inflammatory bowel diseases and brain-gut axis. **J Physiol Pharmacol**, v. 54, p. 183-190, 2003, Supplement 4.

HSIEH, C. L.; KIM, C. C.; RYBA, B. E.; NIEMI, E. C.; BANDO, J. K.; LOCKSLEY, R. M.; LIU, J.; NAKAMURA, M. C.; SEAMAN, W. E. Traumatic brain injury induces macrophage subsets in the brain. **Eur J Immunol**, v. 43, n. 8, p. 2010-2022, 2013.

HUANG DA, W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nat Protoc**, v. 4, n. 1, p. 44-57, 2009.

IGNATOWSKI, T. A.; GALLANT, S.; SPENGLER, R. N. Temporal regulation by adrenergic receptor stimulation of macrophage (M phi)-derived tumor necrosis factor (TNF) production post-LPS challenge. **J Neuroimmunol**, v. 65, n. 2, p. 107-117, 1996.

IZEBOUD, C. A.; MOCKING, J. A.; MONSHOUWER, M.; VAN MIERT, A. S.; WITKAMP, R. F. Participation of beta-adrenergic receptors on macrophages in modulation of LPS-induced cytokine release. **J Recept Signal Transduct Res**, v. 19, n. 1-4, p. 191-202, 1999.

KABOURIDIS, P. S.; PACHNIS, V. Emerging roles of gut microbiota and the immune system in the development of the enteric nervous system. **J Clin Invest**, v. 125, n. 3, p. 956-964, 2015.

KABOURIDIS, P. S.; LASRADO, R.; MCCALLUM, S.; CHNG, S. H.; SNIPPERT, H. J.; CLEVERS, H.; PETTERSSON, S.; PACHNIS, V. Microbiota controls the homeostasis of glial cells in the gut lamina propria. **Neuron**, v. 85, n. 2, p. 289-295, 2015.

KREISS, C.; TOEGEL, S.; BAUER, A. J. Alpha2-adrenergic regulation of NO production alters postoperative intestinal smooth muscle dysfunction in rodents. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 287, n. 3, p. G658-666, 2004.

LAHIRI, A.; LAHIRI, A.; IYER, N.; DAS, P.; CHAKRAVORTTY, D. Visiting the cell biology of Salmonella infection. **Microbes Infect**, v. 12, n. 11, p. 809-818, 2010.

LARANJEIRA, C.; PACHNIS, V. Enteric nervous system development: Recent progress and future challenges. **Auton Neurosci**, v. 151, n. 1, p. 61-69, 2009.

LAUKOVA, M.; VARGOVIC, P.; VLCEK, M.; LEJAVOVA, K.; HUDECOVA, S.; KRIZANOVA, O.; KVETNANSKY, R. Catecholamine production is differently regulated in splenic T- and B-cells following stress exposure. **Immunobiology**, v. 218, n. 5, p. 780-789, 2013.

LAVIN, Y.; WINTER, D.; BLECHER-GONEN, R.; DAVID, E.; KEREN-SHAUL, H.; MERAD, M.; JUNG, S.; AMIT, I. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. **Cell**, v. 159, n. 6, p. 1312-1326, 2014.

LEE, J.; RYU, H.; KOWALL, N. W. Motor neuronal protection by L-arginine prolongs survival of mutant SOD1 (G93A) ALS mice. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 384, n. 4, p. 524-529, 2009.

LOMAX, A. E.; SHARKEY, K. A.; FURNESS, J. B. The participation of the sympathetic innervation of the gastrointestinal tract in disease states. **Neurogastroenterol Motil**, v. 22, n. 1, p. 7-18, 2010.

MACDONALD, K. P.; PALMER, J. S.; CRONAU, S.; SEPPANEN, E.; OLVER, S.; RAFFELT, N. C.; KUNS, R.; PETTIT, A. R.; CLOUSTON, A.; WAINWRIGHT, B.; BRANSTETTER, D.; SMITH, J.; PAXTON, R. J.; CERRETTI, D. P.; BONHAM, L.; HILL, G. R.; HUME, D. A. An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation. **Blood**, v. 116, n. 19, p. 3955-3963, 2010.

MANTOVANI, A.; MARCHESI, F. IL-10 and macrophages orchestrate gut homeostasis. **Immunity**, v. 40, n. 5, p. 637-639, 2014.

MARGOLIS, K. G.; STEVANOVIC, K.; KARAMOOZ, N.; LI, Z. S.; AHUJA, A.; D'AUTREAUX, F.; SAURMAN, V.; CHALAZONITIS, A.; GERSHON, M. D. Enteric neuronal density contributes to the severity of intestinal inflammation. **Gastroenterology**, v. 141, n. 2, p. 588-598, 2011.

MAYER, E. A.; TILLISCH, K.; GUPTA, A. Gut/brain axis and the microbiota. **J Clin Invest**, v. 125, n. 3, p. 926-938, 2015.

MCCORMACK, S. A.; JOHNSON, L. R. Role of polyamines in gastrointestinal mucosal growth. **Am J Physiol**, v. 260, n. 6, p. G795-806, 1991.

MULLER, P. A.; KOSCSO, B.; RAJANI, G. M.; STEVANOVIC, K.; BERRES, M. L.; HASHIMOTO, D.; MORTHA, A.; LEBOEUF, M.; LI, X. M.; MUCIDA, D.; STANLEY, E. R.; DAHAN, S.; MARGOLIS, K. G.; GERSHON, M. D.; MERAD, M.; BOGUNOVIC, M. Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility. **Cell**, v. 158, n. 2, p. 300-313, 2014.

MUNDER, M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. **Br J Pharmacol**, v. 158, n. 3, p. 638-651, 2009.

NANCE, D. M.; SANDERS, V. M. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). **Brain Behav Immun**, v. 21, n. 6, p. 736-745, 2007.

NGUYEN, K. D.; QIU, Y.; CUI, X.; GOH, Y. P.; MWANGI, J.; DAVID, T.; MUKUNDAN, L.; BROMBACHER, F.; LOCKSLEY, R. M.; CHAWLA, A. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. **Nature**, v. 480, n. 7375, p. 104-108, 2011.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1314-1318, 2005.

OCHMAN, H.; SONCINI, F. C.; SOLOMON, F.; GROISMAN, E. A. Identification of a pathogenicity island required for Salmonella survival in host cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 15, p. 7800-7804, 1996.

PHILLIPS, R. J.; POWLEY, T. L. Macrophages associated with the intrinsic and extrinsic autonomic innervation of the rat gastrointestinal tract. **Auton Neurosci**, v. 169, n. 1, p. 12-27, 2012.

RAES, G.; NOEL, W.; BESCHIN, A.; BRYS, L.; DE BAETSELIER, P.; HASSANZADEH, G. H. FIZZ1 and Ym as tools to discriminate between differentially activated macrophages. **Dev Immunol**, v. 9, n. 3, p. 151-159, 2002.

ROSAS-BALLINA, M.; TRACEY, K. J. The neurology of the immune system: neural reflexes regulate immunity. **Neuron**, v. 64, n. 1, p. 28-32, 2009.

SANDERS, V. M.; KASPROWICZ, D. J.; SWANSON-MUNGERSON, M. A.; PODOJIL, J. R.; KOHM, A. P. Adaptive immunity in mice lacking the beta(2)-adrenergic receptor. **Brain Behav Immun**, v. 17, n. 1, p. 55-67, 2003.

SENO, H.; MIYOSHI, H.; BROWN, S. L.; GESKE, M. J.; COLONNA, M.; STAPPENBECK, T. S. Efficient colonic mucosal wound repair requires Trem2 signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 1, p. 256-261, 2009.

STRAUB, R. H.; STEBNER, K.; HARLE, P.; KEES, F.; FALK, W.; SCHOLMERICH, J. Key role of the sympathetic microenvironment for the interplay of tumour necrosis factor and interleukin 6 in normal but not in inflamed mouse colon mucosa. **Gut**, v. 54, n. 8, p. 1098-1106, 2005.

SZELENYI, J.; KISS, J. P.; VIZI, E. S. Differential involvement of sympathetic nervous system and immune system in the modulation of TNF-alpha production by alpha2- and beta-adrenoceptors in mice. **J Neuroimmunol**, v. 103, n. 1, p. 34-40, 2000.

SZELENYI, J.; SELMECZY, Z.; BROZIK, A.; MEDGYESI, D.; MAGOCSI, M. Dual beta-adrenergic modulation in the immune system: stimulus-dependent effect of isoproterenol on MAPK activation and inflammatory mediator production in macrophages. **Neurochem Int**, v. 49, n. 1, p. 94-103, 2006.

TAKEDA, S.; ELEFTERIOU, F.; LEVASSEUR, R.; LIU, X.; ZHAO, L.; PARKER, K. L.; ARMSTRONG, D.; DUCY, P.; KARSENTY, G. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. **Cell**, v. 111, n. 3, p. 305-317, 2002.

TAN, K. S.; NACKLEY, A. G.; SATTERFIELD, K.; MAIXNER, W.; DIATCHENKO, L.; FLOOD, P. M. Beta2 adrenergic receptor activation stimulates pro-inflammatory cytokine production in macrophages via PKA- and NF-kappaB-independent mechanisms. **Cell Signal**, v. 19, n. 2, p. 251-260, 2007.

TRACEY, K. J. Reflex control of immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 6, p. 418-428, 2009.

VAN WESTERLOO, D. J.; GIEBELEN, I. A.; FLORQUIN, S.; DAALHUISEN, J.; BRUNO, M. J.; DE VOS, A. F.; TRACEY, K. J.; VAN DER POLL, T. The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis. **J Infect Dis**, v. 191, n. 12, p. 2138-2148, 2005.

VENKATARAMANA, S.; LOURENSSEN, S.; MILLER, K. G.; BLENNERHASSETT, M. G. Early inflammatory damage to intestinal neurons occurs via inducible nitric oxide synthase. **Neurobiol Dis**, v. 75, p. 40-52, 2015.

VILLANACCI, V.; BASSOTTI, G.; NASCIMBENI, R.; ANTONELLI, E.; CADEI, M.; FISOGNI, S.; SALERNI, B.; GEBOES, K. Enteric nervous system abnormalities in inflammatory bowel diseases. **Neurogastroenterol Motil**, v. 20, n. 9, p. 1009-1016, 2008.

XIU, F.; STANOJCIC, M.; JESCHKE, M. G. Norepinephrine inhibits macrophage migration by decreasing CCR2 expression. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69167, 2013.

YONA, S.; KIM, K. W.; WOLF, Y.; MILDNER, A.; VAROL, D.; BREKER, M.; STRAUSS-AYALI, D.; VIUKOV, S.; GUILLIAMS, M.; MISHARIN, A.; HUME, D. A.; PERLMAN, H.; MALISSEN, B.; ZELZER, E.; JUNG, S. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. **Immunity**, v. 38, n. 1, p. 79-91, 2013.

ZIGMOND, E.; VAROL, C.; FARACHE, J.; ELMALIAH, E.; SATPATHY, A. T.; FRIEDLANDER, G.; MACK, M.; SHPIGEL, N.; BONECA, I. G.; MURPHY, K. M.; SHAKHAR, G.; HALPERN, Z.; JUNG, S. Ly6C hi monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen-presenting cells. **Immunity**, v. 37, n. 6, p. 1076-1090, 2012.

ZIGMOND, E.; JUNG, S. Intestinal macrophages: well educated exceptions from the rule. **Trends Immunol**, v. 34, n. 4, p. 162-168, 2013.

ZIGMOND, E.; BERNSHTEIN, B.; FRIEDLANDER, G.; WALKER, C. R.; YONA, S.; KIM, K. W.; BRENNER, O.; KRAUTHGAMER, R.; VAROL, C.; MULLER, W.; JUNG, S. Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis. **Immunity**, v. 40, n. 5, p. 720-733, 2014.