DANIEL SANZIO GIMENES DA CRUZ

**Caracterização fenotípica e funcional de células dendríticas após
vagotomia unilateral cervical em camundongos C57BL/6**

**São Paulo
2013**

DANIEL SANZIO GIMENES DA CRUZ

**Caracterização fenotípica e funcional de células dendríticas após
vagotomia unilateral cervical em camundongos C57BL/6**

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

Departamento:
Patologia

Área de Concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:
Prof^a. Dr^a Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes

São Paulo
2013

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2803
FMVZ

Cruz, Daniel Sanzio Gimenes da
Caracterização fenotípica e funcional de células dendríticas após vagotomia unilateral cervical em camundongos C57BL/6 / Daniel Sanzio Gimenes da Cruz. -- 2013.
112 f. : il.

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

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes.

1. Nervo vago. 2. Células dendríticas. 3. Neuroimunomodulação. I. Título.

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Diferenciação, capacidade endocítica e função apresentadora de antígeno de células dendríticas isoladas de camundongos submetidos à vagotomia subdiafragmática", protocolado sob o nº 2330/2011, utilizando 60 (sessenta) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luciano Freitas Felício, 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 "Differentiation, endocytic capacity and antigen-presenting function of dendritic cells isolated from mice subjected to subdiaphragmatic vagotomy", protocol number 2330/2011, utilizing 60 (sixty) mice, under the responsibility Prof. Dr. Luciano Freitas Felício, 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, 30 de setembro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CRUZ, Daniel Sanzio Gimenes da

Título: Caracterização fenotípica e funcional de células dendríticas após vagotomia unilateral cervical em camundongos C57BL/6

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a):

Instituição:

Julgamento

Prof(a). Dr(a):

Instituição:

Julgamento

Prof(a). Dr(a):

Instituição:

Julgamento

À minha mãe Vilma, por seu amor insubstituível. Obrigado por todo o suporte, carinho e ensinamentos ao longo de todos estes anos. Se eu devo este trabalho a alguém hoje, é a você. Obrigado por acreditar nos meus sonhos, me instruir e ajudar a conquistá-los. Você é a melhor mãe do mundo.

À minha namorada Patrícia, pela paciência, compreensão e auxílio incondicionais. Não posso expressar o quão grato sou a você. Obrigado por ser parte da minha vida. Você me faz uma pessoa melhor e a minha vida mais feliz. Te amo.

À minha orientadora Cristina, um anjo que caiu na minha vida. Sem você este trabalho não seria possível. Mais do que uma professora, uma amiga. É uma honra imensa ser seu orientado. Obrigado por tudo.

Agradecimentos

Aos meus irmãos, Alexandre e Dalila, por serem parte de toda a minha vida e sempre confiarem em mim. A saudade é grande demais.

À minha segunda mãe, Percília. Uma das pessoas mais doces e guerreiras que já conheci. Sinto muito sua falta.

À toda a minha família, pelo suporte e amor incondicional, vocês são incríveis.

Aos meus futuros sogros, Jorge e Creusa, por serem praticamente meus pais adotivos em São Paulo. Obrigado por me receberem tão bem em sua família, não tenho nem palavras suficientes para agradecer.

Aos meus amigos de graduação, pelos divertidos anos em que construímos a melhor turma de Biomedicina da UEL. Em especial aos meus amigos que agora continuam suas jornadas juntamente comigo na capital paulista, Camila, Fernando, Cauê e Narciso. É um prazer contar com vocês por perto.

Ao meu também amigo de graduação Kalil, que me recebeu de portas abertas em sua residência em Ribeirão Preto quando precisei. Espero um dia poder retribuir seu grande favor.

Ao pesquisador Alexandre Kanashiro, pela sua constante disposição e paciência em me ajudar. Além de um grande pesquisador é também uma das pessoas mais “gente boa” que já conheci. Sem você este trabalho não seria possível.

Ao Prof. Dr. Luciano Felício, por me ajudar prontamente durante todo o período em que fui seu orientado provisório e além.

Ao Prof. Dr. João Palermo-Neto por me receber de braços abertos no grupo de Neuroimunomodulação e por ser uma grande inspiração a todos que o cercam.

À Prof. Maria Lúcia Daigli e seus alunos, que sempre me ajudaram quando precisei de algum reagente ou utilizar algum equipamento do seu laboratório.

Aos técnicos do laboratório de Farmacologia, Herculano e Vagner e à especialista Nicolle, pela ajuda constante diária e pela ótima amizade que formamos durante estes anos de convivência.

À médica veterinária responsável pelo biotério Cláudia Mori, por estar sempre de prontidão a ajudar e por sempre se desdobrar para me fornecer animais.

Aos técnicos do biotério Idalina, Luciana, Nelsinho, Aline e Mauro, pela contribuição no trabalho e pela agradável convivência.

Aos funcionários da biblioteca, que sempre me auxiliaram quando necessário.

Aos meus colegas de pós-graduação: Adriana Tiemi, Adriano Zager, Alison Ribeiro, Ana Paula Ligeiro, André Gomes, Atílio Calefi, Bruno Honda, Carolina Costola, Daniel Natô, Denise Kinoshita, Eduardo Kenji, Fernando Pípole, Gabriela, Glaucie Alves, João Gimenes, Lilian Namazu, Luciana Cunha, Milena Pinheiro, Poliana Gomes, Rodrigo Vieira, Thalita Machado, Thiago Aloia, Thiago Kirsten, Thiago Marinho, Vinicius Izidio, Viviane Ferraz e Wanderley Quintero pelo auxílio quando necessário e pela agradável convivência.

À todos os membros do Grupo de Neuroimunomodulação. Aprendi e pretendo aprender muito mais com todos vocês.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Patologia, por ser agora minha segunda casa e me fornecer todos os meios para execução deste trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido pela bolsa de estudos (2011/16261-2) e pelo projeto temático (09/51886-3) do qual este trabalho faz parte.

*Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os
únicos benfeitores do mundo.*

Walter S. Landor

RESUMO

CRUZ, D. S. G. **Caracterização fenotípica e funcional de células dendríticas após vagotomia unilateral cervical em camundongos C57BL/6**. [Phenotypic and functional characterization of dendritic cells following unilateral cervical vagotomy in C57BL/6 mice]. 2013. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O nervo vago exerce um papel importante na regulação da homeostase, e seus ramos eferentes emitem sinais capazes de atenuar a resposta inflamatória através da via do reflexo inflamatório. Nossa hipótese foi de que esta via pode também alterar a função das células dendríticas (DCs), uma vez que estas células possuem receptores colinérgicos e podem ser reguladas pelas citocinas inflamatórias. Sendo assim, DCs esplênicas e DCs geradas a partir de células precursoras da medula óssea de animais vagotomizados unilateralmente foram analisadas quanto aos marcadores fenotípicos CD11c e MHC-II e as moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86. As DCs derivadas da medula óssea ainda foram avaliadas quanto a função fagocítica, a apresentação de antígenos, bem como, a produção de citocinas do co-cultivo destas com linfócitos de camundongos OT-II. Um ensaio de reação de hipersensibilidade tardia (DTH) para se avaliar a resposta imune celular também foi realizado, mas não mostrou alterações significantes. A análise dos marcadores fenotípicos revelou um aumento da expressão de CD80 em DCs esplênicas de animais vagotomizados unilateralmente, mas não houveram alterações nas DCs derivadas da medula óssea. A avaliação da capacidade fagocítica revelou uma diminuição significativa em DCs derivadas da medula óssea de animais vagotomizados unilateralmente enquanto no ensaio de proliferação de linfócitos OT-II não houve efeito significativo. Entre as citocinas avaliadas, a IL-6 e IFN- γ se apresentaram aumentadas nos animais vagotomizados unilateralmente. Portanto, o presente trabalho foi capaz de evidenciar que as DCs também estão sujeitas à modulação do sistema nervoso parassimpático, e que, uma vez moduladas, estas células são capazes de exercer influências sobre outras células do sistema imunológico.

Palavras-Chave: Nervo vago, células dendríticas, neuroimunomodulação.

ABSTRACT

CRUZ, D. S. G. **Phenotypic and functional characterization of dendritic cells following unilateral cervical vagotomy in C57BL/6 mice.** [Caracterização fenotípica e funcional de células dendríticas após vagotomia unilateral cervical em camundongos C57BL/6]. 2013. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The vagus nerve plays an important role in the regulation of homeostasis and its efferent branches emit signals capable of attenuating the inflammatory response via the inflammatory reflex. Our hypothesis was that this pathway may also alter the function of dendritic cells (DCs), since these cells have cholinergic receptors and can be regulated by the inflammatory cytokines. Thus, splenic DCs and DCs generated from bone marrow precursor cells unilaterally vagotomized animals were analyzed for phenotypic markers CD11c and MHC-II and co-stimulatory molecules CD80 and CD86. The bone marrow-derived DCs were also evaluated for phagocytic function, antigen presentation, as well as the production of cytokines such co-culture with lymphocytes from mice OT-II. A delayed type hypersensitivity test (DTH) was also performed to evaluate the cellular immune response was also performed, but showed no significant changes. The analysis of phenotypic markers showed increased CD80 expression in splenic DCs from unilaterally vagotomized animals but there were no changes in bone marrow-derived DCs. The evaluation of phagocytic ability showed a significant decrease in DCs from unilaterally vagotomized animals while in the OT-II lymphocyte proliferation assay there was no significant effect. Among the cytokines evaluated, IL-6 and IFN- γ were increased in unilaterally vagotomized animals. Therefore, this study was able to demonstrate that DCs are also subject to modulation of the parasympathetic nervous system, which, once modulated, these cells are able to exert influence on other cells.

Keywords: Vagus nerve, dendritic cells, neuroimmunomodulation.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ACK	Amônio-cloreto-potássio
ACTH	Hôrmônio adrenocorticotrófico
CCR7	Receptor de quimiocina C-C 7
CD	do inglês, <i>cluster of differentiation</i>
cDC	Célula dendrítica convencional
CDP	Célula progenitora comum de células dendríticas
CFA	Adjuvante completo de <i>Freund</i>
CFDA-SE	Diacetato de carboxifluoresceína succinimidil ester
ChAT	Colina acetiltransferase
CLP	do inglês, <i>common lymphoid progenitor</i>
CLR	Receptor de lectina do tipo C
CMP	do inglês, <i>common myeloid progenitor</i>
CREB	Proteína ligante de elemento de resposta ao AMP cíclico
CRH	Fator liberador de corticotropina
CTL	Linfócito T citotóxico
CTLA-4	do inglês, <i>cytotoxic t-lymphocyte antigen 4</i>
DC	do inglês, <i>Dendritic Cell</i>
DC-dMO	Célula dendrítica derivada da medula óssea
DTH	do inglês, <i>delayed-type hypersensitivity</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	do inglês, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Flt3L	do inglês, <i>fms-related tyrosine kinase 3 ligand</i>
GM-CSF	do inglês, <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	Fator de crescimento estimulador de colônia de granulócitos e monócitos
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
ICAM-1	Moléculas de adesão intracelular 1
iDC	do inglês, <i>immature Dendritic Cell</i>
MFI	Média da intensidade de fluorescência
IFN	Interferon
IL	Interleucina
Jak2	Janus quinase 2

KLH	do inglês, <i>keyhole limpet hemocyanin</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos
mDC	do inglês, mature <i>Dendritic Cell</i>
MDP	Célula progenitora de macrófagos-células dendríticas
MHC-II	do inglês, <i>major histocompatibility complex</i>
MIP	do inglês, <i>macrophage inflammation protein</i>
nACh α 7	Receptores nicotínicos de acetilcolina do tipo α 7
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NTS	Núcleo do trato solitário
OVA	Ovalbumina
PAMP	do inglês, <i>pathogen-association molecular pattern</i>
PBS	Solução tampão de fosfato
pDC	Célula dendrítica plasmocitóide
PE	Ficoeritrina
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
SAPI	<i>Staphylococcus aureus</i> marcados com iodeto de propídeo
SBF	Soro bovino fetal
SI	Sistema imune
Siglec-H	do inglês, <i>sialic acid binding immunoglobulin-like lectin H</i>
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SNS	Sistema nervoso simpático
STAT3	Proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição
TCR	Receptor de célula T
TGF- β	Fator de transcrição do crescimento
TLRs	do inglês, <i>toll-like receptors</i>
Tr1	Célula T regulatória do tipo 1
VCU	Vagotomia cervical unilateral
Vgx	Camundongos vagotomizados

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – As conexões entre o cérebro e o sistema imune	21
Figura 2 - Via colinérgica anti-inflamatória	28
Figura 3 - O sistema vagal	45
Figura 4 – Fotografia exemplificando a injeção subcutânea na base da cauda dos camundongos.....	46
Figura 5 – Fotografia exemplificando a injeção intradermal no coxim plantar dos camundongos.....	47
Figura 6 – Células NIH/3T3 em cultura	48
Figura 7 – Curva padrão do teste de ELISA para determinação da concentração do GM-CSF presente no sobrenadante das células NIH/3T3	49
Figura 8 – Diagrama da geração de DCs-dMO	51
Figura 9 – Esquema demonstrando a seleção das populações avaliadas por citometria de fluxo nos experimentos de fenotipagem de DCs-dMO.....	53
Figura 10 – Esquema demonstrando a seleção das populações avaliadas por citometria de fluxo nos experimentos de fenotipagem	55
Figura 11 – Esquema demonstrando a seleção das populações avaliadas por citometria de fluxo nos experimentos de fagocitose de SAPI.....	56
Figura 12 – Ilustração do procedimento de separação de linfócitos por Ficoll-Paque PLUS.....	59
Figura 13 – Representação dos eventos moleculares que ocorrem durante a marcação das células com CFDA, SE).	60
Figura 14 – Esquema demonstrando a seleção das populações avaliadas por citometria de fluxo nos experimentos de proliferação de linfócitos de camundongos OT-II	60
Figura 15 – Gráficos ilustrativos dos plots de citometria no ensaio do CBA	61
Figura 16 – Esquema ilustrando as pesagens de acompanhamento do período pós-cirúrgico.....	64
Figura 17 - Curva de acompanhamento dos pesos médios dos animais submetidos a vagotomia ou apenas o procedimento cirúrgico exploratório (<i>sham</i>)	65
Figura 18 – Esquema ilustrando o delineamento no experimento da avaliação da DTH. No dia 0, os animais foram submetidos a vagotomia, ou apenas ao procedimento exploratório (<i>sham</i>).....	66

Figura 19 - Curva representativa da magnitude do inchaço das patas dos animais submetidos a vagotomia (Vgx) ou apenas ao procedimento cirúrgico exploratório (<i>sham</i>), imunizados e desafiados com KLH	67
Figura 20 - Figura representativa da medida da massa das patas dos animais submetidos a vagotomia (Vgx) ou apenas ao procedimento cirúrgico exploratório (<i>sham</i>), imunizados e desafiados com KLH	68
Figura 21 – Esquema ilustrando o delineamento do experimento de fenotipagem das DCs-dMO provenientes de animais Vgx e <i>sham</i>	69
Figura 22 – Histograma representativo da % de Células CD11c ⁺ MHC-II ⁺ geradas a partir de células precursoras da medula óssea de camundongos.....	70
Figura 23 – Histogramas representativos da % de (A) células CD11c ⁺ MHC-II ^{High} ; (B) células CD11c ⁺ MHC-II ^{High} CD80 ⁺ e (C) células CD11c ⁺ MHC-II ^{High} CD86 ⁺ geradas a partir de células precursoras da medula óssea de camundongos.....	71
Figura 24 – Histogramas representativos da média da intensidade de fluorescência (MFI) de (A) células CD11c ⁺ MHC-II ^{High} ; (B) células CD11c ⁺ MHC-II ^{High} CD80 ⁺ e (C) células CD11c ⁺ MHC-II ^{High} CD86 ⁺ geradas a partir de células precursoras da medula óssea.....	73
Figura 25 – Esquema ilustrando o delineamento do experimento de avaliação da fagocitose das DCs-dMO de animais Vgx e <i>sham</i>	75
Figura 26 – Histograma representativo da % de Células CD11c ⁺ SAP1 ⁺ de DCs geradas a partir de células precursoras da medula óssea de camundongos.....	76
Figura 27 – Média da intensidade de fluorescência (MFI) das células CD11c ⁺ que realizaram fagocitose do <i>Staphylococcus aureus</i>	76
Figura 28 - Esquema ilustrando o delineamento do experiento de proliferação de linfócitos OT-II co-cultivadas com DCs-dMO de animais Vgx e <i>sham</i>	77
Figura 29 – Curvas de proliferação de linfócitos OT-II que foram co-cultivados com DCs-dMO de animais (A) Vgx e (B) <i>sham</i> carregadas com OVA.....	78
Figura 30 – Histograma representativo da % de divisões de linfócitos OT-II que foram co-cultivados com DCs-dMO carregadas com OVA.....	79
Figura 31 – Histogramas da concentração de citocinas presentes no sobrenadante do cultivo entre os linfócitos OT-II e as DCs-dMO carregadas com OVA	80

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	NEUROIMUNOMODULAÇÃO	20
2.2	O NERVO VAGO E O REFLEXO ANTI-INFLAMATÓRIO	23
2.3	CÉLULAS DENDRÍTICAS	30
3	OBJETIVOS	42
3.1	OBJETIVO GERAL	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4	MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1	ANIMAIS	44
4.2	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	44
4.3.1	Ensaio de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH)	46
4.4	CÉLULAS NIH/3T3 SECRETORAS DE GM-CSF	47
4.5	CULTIVO DAS CÉLULAS NIH/3T3	48
4.5.1	Determinação da concentração de GM-CSF no sobrenadante do cultivo das células NIH/3T3	49
4.6	PREPARAÇÃO E CULTURA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA (DCs-dMO)	50
4.7	ANÁLISE DE MARCADORES FENOTÍPICOS DE MEMBRANA	51
4.7.1	DCs-dMO	51
4.7.2	Imunofenotipagem de linfócitos de animais OT-II	53
4.8	ENSAIO DE FAGOCITOSE	56
4.9	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS OT-II	56
4.10	DOSAGEM DE CITOCINAS PRESENTES NO SOBRENADANTE DO CO-CULTIVO ENTRE AS DCs-dMO E OS LINFÓCITOS OT-II	61
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
5.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS	64
5.1	AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO	64
5.1.1	Resultados	65
5.2	EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DA DTH	65
5.2.1	Resultados	67
5.3	EXPERIMENTO 2 - FENÓTIPO E CARACTERÍSTICAS DE DCs-dMO IMATURAS E MADURAS	68
5.3.1	Resultados	69
5.4	EXPERIMENTO 3 - CAPACIDADE DE FAGOCITOSE DAS DCs-dMO	74
5.4.1	Resultados	75
5.5	EXPERIMENTO 4 - PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS OT-II FRENTE A APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENO DAS DCs-dMO	77
5.5.1	Resultados	78
6.	DISCUSSÃO	83
7.	CONCLUSÕES	93
7.1	CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	93

7.2	CONCLUSÃO GERAL.....	94
	REFERÊNCIAS.....	96

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Enquanto investigações do controle neural da resposta imune tem tradicionalmente focado no sistema nervoso simpático e neurônios sensoriais, uma série de estudos mais recentes conduzidos por Tracey e colaboradores nos anos 90 demonstraram o papel do sistema nervoso parassimpático e, em particular, o envolvimento do ramo eferente do nervo vago na regulação da inflamação através da sinalização colinérgica via receptor nicotínico $\alpha 7$ (nACh $\alpha 7$) (BOROVIKOVA et al., 2000a; BERNIK et al., 2002; WANG et al., 2003; PAVLOV; TRACEY, 2005; PAVLOV et al., 2007).

Estudos aprofundados demonstraram que as propriedades anti-inflamatórias do nervo vago são mediadas através do seu principal neurotransmissor, a acetilcolina (ACh). Esta interage com os receptores nicotínicos de macrófagos resultando na inibição das respostas induzidas por endotoxinas (BOROVIKOVA et al., 2000b; WANG et al., 2003). No entanto, novas evidências sugerem que células dendríticas (DCs), células endoteliais, e linfócitos também possuam receptores colinérgicos do tipo $\alpha 7$ (KAWASHIMA et al., 2007; COOKE; GHEBRAMARIAM, 2008; NI et al., 2010). Embora se tenha conhecimento do significativo papel destas células na ativação imune, através da síntese e liberação de citocinas, pouco se sabe sobre o papel do vago na modulação da geração e atividade das mesmas.

Alguns autores buscaram avaliar a ação da vagotomia em linfócitos, demonstrando uma diminuição na ativação destas células, bem como uma diminuição na população de células T regulatórias nos animais submetidos a cirurgia. Embora seja possível que o vago possa exercer uma influência direta nas células T regulatórias, uma teoria é que outros intermediários celulares possivelmente estejam envolvidos.

Um destes possíveis intermediários são as DCs, visto sua importância na interface entre a resposta imune inata e adaptativa, tendo influência direta no cometimento das linhagens de células T e desta forma em grande parte dos processos inflamatórios. Nos pareceu relevante hipotetizar sobre uma possível ação do nervo vago sobre as DCs, efeito este que pode ser contínuo ou situacional, direto ou indireto em suas características fenotípicas e funcionais.

Um melhor entendimento das bases fundamentais deste fenômeno tem potencial no sentido de contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos e, possivelmente, para terapias associadas ao reflexo vagal anti-inflamatório.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO

A neuroimunologia é uma área de pesquisa multidisciplinar relativamente recente que visa integrar a neurociência – o estudo do sistema nervoso – e a imunologia – o estudo do sistema imunológico –. A grande maioria dos trabalhos iniciais na área eram focados em um fluxo causal no qual alterações comportamentais e psicológicas levavam a alterações no cérebro, gerando respostas nervosas autonômas e endócrinas, e que por fim, causavam alterações nos órgãos e células do sistema imune (SI). Com os avanços realizados, contudo, hoje sabe-se que moléculas do sistema imunológico, tais como prostaglandinas, citocinas e imunoglobulinas também são capazes de modular a atividade do sistema nervoso central (SNC) (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996; GOEHLER; LYTE; GAYKEMA, 2007). Desta forma, atualmente, a neuroimunologia é definida como a área que estuda a inter-relação bidirecional entre os dois sistemas (Figura 1). Embora alguma controvérsia ainda exista em certos aspectos pouco esclarecidos desta comunicação, uma grande gama de trabalhos ao longo dos anos têm fornecido fortes evidências de interações importantes entre o SNC e o SI, não sendo atualmente passíveis de serem ignoradas em estudos realizados que considerem absolutamente cada sistema funcionando de forma isolada e autônoma.

Figura 1 – As conexões entre o cérebro e o sistema imune

Legenda: A sinalização entre os sistemas de forma sistêmica está representada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), pelo sistema nervoso simpático (SNS), pelo sistema nervoso periférico (SNP) e pelo nervo vago. Os ramos aferentes e eferentes do vago se encontram no núcleo do trato solitário (NTS), demonstrado no inserto.

Fonte: Modificado de (THAYER; STERNBERG, 2010).

Os efeitos dos glicocorticóides sobre o SI são conhecidos há muitos anos, sendo que estes fármacos são utilizados no tratamento de doenças inflamatórias desde meados de 1940. Neste âmbito, os experimentos pioneiros de Selye em 1936 (apud SELYE, 1998) foram os primeiros a mostrarem evidências empíricas de que formas diferentes de estressores eram igualmente capazes de gerar uma síndrome em ratos que incluía como alguns sintomas a hipertrofia de glândulas adrenais, diminuição do baço, do timo e dos linfonodos. Um pouco mais tarde, no ano de 1950, Kendall, Reichstein, e Hench receberam o prêmio Nobel de medicina pelos seus estudos envolvendo o cortisol e o hormônio adrenocorticotrófico

(ACTH) no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatóide (HENCH et al., 1950).

Além dos efeitos imunossupressores sistêmicos decorrentes da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) que culmina na liberação de glicocorticóides, o SNC também pode regular a resposta imune de forma local, como ocorre no caso do sistema nervoso periférico (SNP). O SNP libera neuropeptídeos, como a substância P, o peptídeo vasoativo e o fator liberador de corticotropina (CRH) através dos nervos sensoriais periféricos relacionados a dor, temperatura e tato (STERNBERG, 2006). Estes neuropeptídeos são expressos nos sítios de inflamação (AGELAKI et al., 2002; CUESTA et al., 2002), favorecendo-a geralmente com o propósito de eliminar agentes nocivos. Além desta via, o SNC pode modular o sistema imune de maneira regional, através na inervação de órgãos imunes, como o timo, o baço e os linfonodos, pelo sistema nervoso autonômico simpático (SNS). As influências simpáticas podem ocorrer em determinadas situações pró-inflamatórias (MADDEN; SANDERS; FELTEN, 1995; JOHNSON et al., 2005), mas geralmente são inibidoras da inflamação (MAESTRONI; MAZZOLA, 2003). O SNS é ativo na redistribuição de populações celulares do sistema imune de forma aguda, e no caso de situações de estresse atua como imunossupressor através da liberação de grandes quantidades de catecolaminas nos órgãos imunes (KENNEDY et al., 2005; NANCE; SANDERS, 2007).

Embora por muito tempo tenha-se considerado o cérebro como um órgão “imuno-privilegiado”, hoje sabe-se que este perfil não é absoluto, dependendo das regiões cerebrais (GALEA; BECHMANN; PERRY, 2007). O cérebro possui algumas populações de células imunes, como macrófagos e células dendríticas nas meninges e no plexo coróide. Além disso, existe uma população de macrófagos específicos situados no parênquima cerebral denominada microglia. Estas células embora não favoreçam a inflamação como outros macrófagos de outros tecidos, respondem a estímulos inflamatórios liberando citocinas e prostaglandinas. Em adição, outras células cerebrais, como os neurônios e as células da glia, expressam receptores para estes mediadores (DANTZER et al., 1999).

Embora a barreira hemato-encefálica não permita a passagem de células e proteínas, tais como as citocinas em condições de homeostase, atualmente

sabemos sobre algumas vias nas quais o cérebro é capaz de receber sinais do SI vindos da periferia. Estas vias permitem que o SNC receba sinais do que está acontecendo na periferia, sem no entanto ser afetado pelos danos teciduais resultantes dos processos inflamatórios.

A primeira destas vias acontece através de macrófagos que se situam no plexo coróide e nos órgãos circunventriculares. Estes macrófagos possuem receptores do tipo *Toll* (TLRs), capazes de reconhecer padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) circulantes e responder liberando citocinas inflamatórias (QUAN; WHITESIDE; HERKENHAM, 1998). Estas regiões cerebrais se situam fora da barreira hemato-encefálica e desta forma, as proteínas secretadas atravessam para os tecidos cerebrais por difusão (VITKOVIC et al., 2000). A segunda via que permite a comunicação entre o SI→SNC são os transportadores de citocinas presentes na barreira hemato-encefálica, que fazem a passagem das citocinas presentes na circulação sistêmica para o cérebro (BANKS, 2006). A terceira via envolve a presença de receptores de IL-1 em macrófagos e células endoteliais presentes nas vênulas cerebrais. A ativação destes receptores leva a produção local de prostaglandina E2 (SCHILTZ; SAWCHENKO, 2002; KONSMAN et al., 2004). A quarta via, por sua vez envolve os nervos sensoriais aferentes, como os nervos trigêmeos durante infecções oro-linguais (ROMEO et al., 2001) e o nervo vago, principalmente durante infecções abdominais e viscerais.

2.2 O NERVO VAGO E O REFLEXO ANTI-INFLAMATÓRIO

O nervo vago é o 10º par de nervos cranianos, sendo o principal nervo parassimpático do organismo. Ele difere dos outros nervos cranianos por inervar predominantemente as cavidades torácicas e abdominais. O nervo vago foi intitulado desta forma justamente por ter um curso complexo no qual ele “caminha” ou “vaga” pelos órgãos os quais inerva.

O nervo vago é composto de fibras nervosas sensoriais aferentes, que levam a informação da periferia para o SNC e também fibras eferentes motoras, que são responsáveis por levar os comandos das informações processadas no cérebro para a periferia. O seu principal neurotransmissor é a ACh. Cerca de 80%

das fibras do nervo vago são aferentes (BERTHOUD; NEUHUBER, 2000). As conexões das fibras aferentes são encontradas em diversos órgãos em diferentes espécies, inclusive humanos, como no coração, vias aéreas, esôfago, estômago, intestino, ilhotas pancreáticas, dentre outros (BERTHOUD; NEUHUBER, 2000). Estas fibras sensoriais são capazes de detectar naturezas diversas de estímulos, sendo que são encontrados mecanoreceptores e quimiorreceptores para nutrientes no trato gastrointestinal, além de termoreceptores e osmoreceptores (GRUNDY, 2005). Além disso, embora o nervo vago não seja comumente associado a nocicepção e dor, evidências crescentes indicam um papel complexo da inervação vagal nesta área, sendo que os trabalhos iniciados por Bluthé et al. (1994) e Watkins et al. (1994, 1995) a partir dos anos 1990 – no qual foram mostrados que a hiperalgesia e os sintomas associados ao comportamento doentio provocados por LPS ou IL-1 β eram dependentes de um nervo vago íntegro – forneceram a base para os trabalhos atuais envolvendo o nervo vago e sinalização imune.

Um pouco mais tarde, foi hipotetizado e demonstrado evidências de que esta comunicação neuroimune da IL-1 β poderia acontecer através de elementos sensoriais do vago, mais especificamente nos paragânglios. Estes são agrupamentos de células não-neuronais que se situam em contato próximo e realizam sinapses com os nervos. A população majoritária de células presentes nos paragânglios são as células de glomus, que possuem funções quimiorreceptoras, auxiliando na regulação da pressão sanguínea e na respiração. De fato, Goehler et al. (1997) comprovaram que estas células expressam receptores funcionais para IL-1 β . Desta forma, os paragânglios são capazes de receber os estímulos teciduais, transmitindo as informações para o nervo vago, atingindo finalmente o SNC. Além disso, foi demonstrado que células dendritiformes expressando complexo de histocompatibilidade do tipo II (MHC-II) –possivelmente células dendríticas ou macrófagos – se situam próximas aos paragânglios, onde potencialmente poderiam se comunicar com as células de glomus pela liberação de citocinas (GOEHLER et al., 1999).

Os sinais enviados pelo sistema imune, como a IL-1 β pelo nervo vago, são transmitidos para algumas regiões cerebrais, sendo a mais importante o núcleo do trato solitário (NTS). As informações vagais aferentes convergem para o

NTS de diversas regiões do organismo (MAIER; WATKINS, 1998), podendo desta forma fornecer informações anatômicas específicas da localização de um patógeno, e consequentemente coordenar a montagem de uma resposta imune específica naquela região. Além disso, o NTS possui conexões diretas e indiretas com diversas outras regiões cerebrais, sendo assim o nervo vago pode ser capaz de influenciar uma grande gama de processos imunológicos (GROVES; BROWN, 2005).

Embora como descrito anteriormente, o nervo vago seja composto majoritariamente por fibras aferentes sensoriais, ele também possui fibras eferentes ou motoras. As evidências da modulação do sistema imune pelo nervo vago eferente começaram a surgir a partir dos trabalhos do grupo do pesquisador Kevin Tracey, ainda nos anos 1990. Estes trabalhos começaram com os estudos do composto CNI-1493 em processos inflamatórios agudos, no qual o uso do fármaco era capaz de reduzir a produção de citocinas inflamatórias, como o TNF, IL-1 β , IL-6, MIP-1 α e MIP-1 β em monócitos/macrófagos humanos estimulados com LPS (BIANCHI et al., 1996; COHEN et al., 1996; TRACEY, 1998) e de inibir a mortalidade em um modelo de sepse em camundongos (VILLA et al., 1997). Depois, foi demonstrado que os efeitos anti-inflamatórios do CNI-1493 eram dependentes do nervo vago intacto, uma vez que a vagotomia bilateral ou o bloqueio com atropina aboliam estes efeitos. Além disso, a estimulação elétrica do nervo vago distal era capaz de atenuar a inflamação aguda em um modelo de edema de pata (BOROVIKOVA et al., 2000a). Borovikova et al. (2000b) demonstraram também que a acetilcolina é capaz de diminuir a liberação de IL-1 β , IL-6, TNF e IL-18, mas não IL-10, de macrófagos estimulados com LPS *in vitro*. Além disso, a estimulação elétrica do nervo vago de ratos *in vivo* durante uma endotoxemia letal diminuiu a síntese de TNF no fígado, atenuou os níveis séricos de TNF e preveniu o desenvolvimento do choque séptico.

Estes resultados, em conjunto, levaram a formação de um mecanismo fisiológico denominado de via colinérgica anti-inflamatória ou “reflexo anti-inflamatório”. A composição desta via pode ser simplificada da seguinte forma: Os produtos da inflamação produzidos nos tecidos danificados ativam as fibras aferentes do nervo vago que retransmitem os sinais para o núcleo do trato solitário. Após o processamento das informações no SNC, o nervo vago eferente é ativado e inibe a síntese de citocinas inflamatórias nos tecidos alvo (TRACEY, 2002).

Pesquisas subsequentes adicionaram mais informações importantes à construção desta via. Wang et al. (2003) demonstraram, utilizando camundongos *knockout* para os receptores nicotínicos $\alpha 7$, que estes são essenciais para a observação do efeito anti-inflamatório do nervo vago em modelo de sepse. Alguns mecanismos moleculares que explicam a redução na produção de citocinas inflamatórias após a ativação deste receptor foram propostos. A ligação de agonistas no receptor $\alpha 7$ promove uma interação deste com a adenilato ciclase 6, aumentando os níveis intracelulares de AMPc. Este aumento ativa a fosforilação da proteína ligante de elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB), a qual eleva a expressão de *cfos*. A ativação de *cfos* inibe a atividade do fator nuclear κB (NF- κB), desta forma inibindo a transcrição de citocinas (ROSAS-BALLINA et al., 2009). Uma outra via de ativação do receptor $\alpha 7$ envolve o recrutamento da janus quinase 2 (Jak2) e a subsequente ativação da proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição 3 (STAT3) (DE JONGE et al., 2005). Considerando que a STAT3 não regula diretamente a transcrição de TNF (MURRAY, 2005) e que o NF- κB recruta e forma associações com a STAT3 (YOSHIDA et al., 2004), foi proposto que a atenuação da produção de citocinas através do receptor $\alpha 7$ pode implicar na colaboração entre o NF- κB e a via da Jak/STAT (DE JONGE; ULLOA, 2007).

Outro componente essencial para o potencial anti-inflamatório do vago na endotoxemia é o baço dos animais, uma vez que a esplenectomia anula este efeito (HUSTON et al., 2006). Este último resultado gerou controvérsias, uma vez que a inervação direta do nervo vago sobre o baço é fonte de inúmeros debates na literatura. Estudos pioneiros sugeriam que o baço era diretamente innervado pelo nervo vago (DALE; DUDLEY, 1929). Alguns estudos mais recentes sustentam e demonstram evidências desta inervação (CHEN et al., 1996; BUIJS et al., 2008). No trabalho citado de Buijs e colaboradores, por exemplo, os autores injetaram um vírus (*Pseudorabies*) retrógado trans-sináptico no baço e conseguiram observar o mesmo vírus em estruturas do SNC, mesmo após uma denervação simpática seletiva. No entanto, outros estudos que também utilizaram marcações retrógadas questionam este fato, mostrando evidências que sustentam que a inervação direta do vago sobre o baço é inexistente (BELLINGER et al., 1993; NANCE; BURNS, 1989; CANO et al., 2001).

Em outra vertente, foi proposto por Rosas-Ballina et al. (2008) que o nervo vago pode não inervar o baço diretamente, mas no entanto pode modular a função do nervo esplênico através de receptores nicotínicos do tipo $\alpha 7$ presentes no gânglio celíaco mesentérico superior, onde se encontra o término das fibras vagais. Os nervos parassimpático e o simpático estariam desta forma atuando sinergicamente e não de forma antagônica, como acontece majoritariamente nos diversos processos fisiológicos do organismo. O nervo esplênico uma vez estimulado pelo nervo vago, liberaria noradrenalina no baço, modulando a produção de TNF pelos macrófagos deste órgão. De fato, foi demonstrado que em camundongos *knockout* para o receptor nicotínico $\alpha 7$, a estimulação elétrica do nervo vago não era capaz de diminuir os níveis séricos de TNF em uma endotoxemia. Por outro lado, a estimulação elétrica do nervo esplênico, mesmo na ausência do receptor, conseguia diminuir os níveis séricos da citocina (VIDA et al., 2011a). O trabalho subsequente do mesmo grupo mostrou que os receptores $\beta 2$ adrenérgicos são necessários para modulação do sistema imune inato pelo nervo vago (VIDA et al., 2011b), e que a noradrenalina liberada pelo nervo esplênico se ligaria aos receptores adrenérgicos de uma população de linfócitos T $CD4^+CD25^-$. Esta população, por sua vez, estaria inibindo a produção de citocinas inflamatórias dos macrófagos esplênicos em uma situação de endotoxemia.

No entanto, estes resultados ainda não eram capazes de explicar a fonte de acetilcolina presente no baço (DALE; DUDLEY, 1929; TODMAN, 2008), uma vez que o nervo esplênico, por ser adrenérgico, utiliza noradrenalina como seu neurotransmissor. Foi então identificada uma população de linfócitos de memória, indispensáveis para o reflexo inflamatório. Esta população de células se situa próxima às terminações nervosas do nervo esplênico e possuem o fenótipo $CD4^+CD44^{high}CD62^{low}ChAT^+$. Neste trabalho também foi comprovado que esta população apresenta receptores adrenérgicos do tipo $\beta 1$ e $\beta 2$. Além disso, a estimulação elétrica do vago aumentou os níveis de acetilcolina no baço e a positividade destes linfócitos para a enzima colina acetiltransferase (ChAT) demonstrando que estes linfócitos são muito provavelmente a principal fonte deste neurotransmissor, uma vez que estas células são capazes de produzir e secretar acetilcolina. Portanto, é possível que o nervo vago libere acetilcolina no gânglio

celíaco mesentérico superior, onde existem receptores nicotínicos do tipo $\alpha 7$. A ligação da acetilcolina nestes receptores ativaria então o nervo esplênico, que por sua vez liberaria noradrenalina no baço. A noradrenalina se ligaria aos receptores $\beta 2$ da população de linfócitos $CD4^+CD44^{high}CD62^{low}ChAT^+$, que por conseguinte liberariam acetilcolina. Este neurotransmissor então finalmente, se ligaria aos receptores nicotínicos $\alpha 7$ de macrófagos esplênicos, inibindo a síntese de TNF (Resumido na Figura 2).

Figura 2 - Via colinérgica anti-inflamatória

Legenda: Para maiores detalhes, ver texto. Fonte: Modificado de (ANDERSSON; TRACEY, 2012).

Como anteriormente discutido, a via colinérgica anti-inflamatória ainda não está definitivamente construída e ainda é alvo de muitas controvérsias. A comunicação entre o nervo vago e o nervo esplênico no gânglio celíaco ainda não foi muito bem comprovada, sendo que um trabalho demonstrou especificamente que não existem conexões neurais entre o vago e os neurônios esplênicos (BRATTON et al., 2012). Neste trabalho, marcações retrógradas e anterógradas entre o baço e o núcleo motor do vago foram realizadas, onde não foram encontradas associações relevantes. Além disso foram analisados os efeitos da estimulação elétrica do vago no nervo esplênico, que resultou em uma atividade não detectável deste.

Um outro fator que contribui para as controvérsias, mas futuramente pode fornecer pistas ou soluções para os problemas ainda não esclarecidos é a evolução dos conhecimentos das neurotransmissões de maneira geral, em particular das junções autonômicas neuroefetoras (BURNSTOCK, 2009). Ao contrário das sinapses neuronais e das junções neuromusculares, as junções autonômicas neuroefetoras são compreendidas por varicosidades que movem-se continuamente e que alteram a sua relação com as membranas celulares neuroefetores ao longo do tempo, podendo ser apenas temporárias e portanto dificultando sua visualização. Além disso, um outro mecanismo importante que vêm sendo demonstrado, é o da co-transmissão. A idéia clássica de que cada neurônio utiliza exclusivamente um neurotransmissor mostrou-se equivocada, e hoje sabe-se que os neurônios podem liberar uma grande gama de substâncias que possuem interações umas com as outras e portanto abrem um grande leque de efeitos (BURNSTOCK, 2009).

De forma geral, embora a estrutura exata da comunicação entre o nervo vago e o baço ainda seja tema de debate, evidências crescentes têm mostrado que a funcionalidade do vago, a nicotina e os agonistas de receptores $\alpha 7$ são importantes não somente na modulação da atividade do baço, mas também em diversos outros modelos de inflamação locais e sistêmicas. Além dos já citados estudos demonstrando a importância do reflexo anti-inflamatório na endotoxemia e sepse, podemos citar o papel anti-inflamatório do nervo vago e da manipulação farmacológica de agentes colinérgicos em diversos outros modelos, como na pancreatite (VAN WESTERLOO et al., 2006); no choque hemorrágico (GUARINI et

al., 2003; GUARINI et al., 2004; LUYER et al., 2005); nas lesões causadas por isquemia-reperfusão (BERNIK et al., 2002; MIONI et al., 2005; SADIS et al., 2007; YEBOAH et al., 2008); doenças inflamatórias intestinais (GHIA et al., 2006) e artrite reumatóide (WALDBURGER et al., 2008; VAN MAANEN; VERVOORDELDONK; TAK, 2009a; VAN MAANEN et al., 2009b, VAN MANNEN et al, 2009c; LI et al., 2010; VAN MAANEN et al., 2010). Baseados nestes e outros trabalhos, novas abordagens terapêuticas para doenças inflamatórias vem sendo discutidas, como o tratamento com fármacos agonistas do receptor $\alpha 7$, como a nicotina e a colina (PULLAN et al., 1994); inibidores da acetilcolinesterase (PAVLOV et al., 2009) e estimulação elétrica do vago (FAMM et al., 2013).

2.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS

Nos anos 1970 uma série de artigos descreveu uma nova população de células no baço e linfonodos de camundongos que diferia morfológicamente dos monócitos, granulócitos e linfócitos até então conhecidos. Estas células receberam o nome de células dendríticas (DCs, do inglês *dendritic cells*) pela sua capacidade de assumir diversas ramificações e constantemente estender e retrair seus prolongamentos (STEINMAN; COHN, 1973; STEINMAN; COHN, 1974; STEINMAN; LUSTIG; COHN, 1974; STEINMAN; ADAMS; COHN, 1975). Ralph Steinman, considerado o pesquisador responsável pela descoberta e o papel destas células na imunidade adaptativa, foi laureado com o prêmio Nobel de medicina em 2011. Infelizmente, o anúncio foi realizado 3 dias após seu falecimento.

Um pouco depois da identificação das DCs nos órgãos linfóides, as células de Langerhans (primeiramente descritas por Paul Langerhans em 1868) foram reconhecidas como tendo propriedades semelhantes as das DCs (SCHULER; ROMANI; STEINMAN, 1985). Isto levou a idéia de que mais de um subtipo de DC poderia existir. Foi a partir de meados dos anos 1990 que a significância e a esfera de ação da diversidade de DCs começou a ser descoberta, com o descobrimento dos principais subtipos de DCs. Apesar de fortes evidências mostrando que as DCs de diferentes tecidos compartilham atributos fenotípicos e funcionais que as distinguem de outras células do sistema imune, as dificuldades em identificar uma

célula precursora exclusiva na medula óssea, aliada ao fato da dificuldade em encontrar marcadores fenotípicos específicos, contribuiu para um certo nível de ceticismo quanto a existência de uma linhagem de DCs unificada. No entanto, diferentes grupos identificaram uma linhagem progênitora que dá origem especificamente a DCs e não tem potencial de se transformar em outros leucócitos (NAIK et al., 2007; ONAI et al., 2007; LIU et al., 2009). Além disso, várias citocinas e fatores de transcrição que controlam o desenvolvimento destas células e a sua diversificação em camundongos nos últimos anos têm sido descobertas.

Atualmente, as DCs podem ser divididas em duas grandes classes: as células dendríticas convencionais ou cDCs e as células dendríticas plasmocitóides ou pDCs. As pDCs são caracterizadas pela habilidade de secretar grandes quantidades de IFN- α frente a um estímulo antigênico viral. Morfologicamente as pDCs apresentam um formato distinto das cDCs, sendo mais semelhante ao de células secretoras de anticorpos: os plasmócitos. No entanto, após a ativação estas células podem adquirir um formato dendritiforme, o que originalmente permitiu que elas fossem determinadas como DCs (GROUARD et al., 1997). Em termos de marcadores de superfície, estas células diferem das cDCs por expressarem B220, Siglec-H e *Bst2* (GROUARD et al., 1997; BLASIUS et al., 2006; ZHANG, 2006). Funcionalmente estas células realizam pouca fagocitose, e são apresentadoras de antígeno pouco competentes, uma vez que expressam baixo MHC-II e portanto são ineficientes na função de iniciar a resposta de linfócitos T CD4⁺ (REIZIS et al., 2011).

As células dendríticas convencionais ou cDCs são as células dendríticas originalmente descritas por Steinman e colaboradores, e receberam este nome para diferenciá-las das pDCs. A definição fenotípica das cDCs está em constante evolução e tende a continuar com as novas tecnologias que vem sendo desenvolvidas. Na membrana celular, as cDCs expressam constitutivamente marcadores hematopoiéticos, como o CD45, MHC-II e CD11c. As DCs não possuem a grande maioria dos marcadores de células T, células B, células NK, granulócitos e eritrócitos. As cDCs são eficientes na fagocitose, além do processamento e apresentação de antígenos. Como estas células possuem um período de meia vida curta (aproximadamente 3-5 dias), a sua reposição ocorre continuamente por células

precursoras da medula óssea, um processo dependente da citocina Flt3L (WASKOW et al., 2008).

As cDCs podem ser divididas ainda em duas populações de características fenotípicas e funcionais distintas. Uma pequena população que é positiva para o marcador de membrana CD8 α e uma grande população complementar que expressa o marcador de membrana CD4 (VREMEC et al., 1992; VREMEC et al., 2000). As DCs CD8 α^+ são células eficientes na apresentação cruzada de antígenos exógenos em moléculas de MHC I para linfócitos T CD8 $^+$ (DEN HAAN; LEHAR; BEVAN, 2000; POOLEY; HEATH; SHORTMAN, 2001). Em contrapartida as DCs CD4 $^+$ de forma geral são conhecidas como fracas apresentadoras de antígeno *in vivo*, mas podem ser mais eficientes na ativação de células T CD4 $^+$ via MHC-II (DUDZIAK et al., 2007; KAMPHORST et al., 2010). Estudos identificaram ainda duas subpopulações em órgãos periféricos não linfóides com funções análogas e os mesmos requisitos de desenvolvimento das cDCs CD8 α^+ e CD4 $^+$. Nos tecidos não linfóides periféricos as células CD8 α^+ não apresentam – ironicamente – o marcador CD8 α e são identificadas alternativamente pela expressão da integrina CD103 (GINHOUX et al., 2009; EDELSON et al., 2010). De maneira similar, o CD4 não é expresso nos órgãos periféricos, e as DCs nestes tecidos são identificadas pela alta expressão de CD11b (HEATH; CARBONE, 2009).

A ontogenia das DCs sugere que os progenitores destas células possam ser tanto células tronco linfóides progenitoras comuns (CLPs), quanto células tronco mielóides progenitoras comuns (CMPs), com evidências indicando que a grande maioria é proveniente deste último grupo, como sugerido por Schlenner et al. (2010). A primeira população precursora gerada a partir das CMPs capaz de dar origem a DCs são as células progenitoras de macrófagos-DCs (MDPs) (FOGG et al., 2006; AUFFRAY et al., 2009). Estas tem a capacidade de gerar pDCs, cDCs, monócitos e macrófagos, mas não neutrófilos e outras linhagens mielóides. Mais recentemente, foram descobertas as células progenitoras comuns de células dendríticas (CDPs), que vêm imediatamente abaixo das MDPs e possuem potencial para dar origem apenas às pDCs e cDCs (NAIK et al., 2007; ONAI et al., 2007).

Dentre os fatores de crescimento que regulam a diferenciação das DCs e dos macrófagos, os mais importantes são o Flt3L e o fator estimulador de

colônia de macrófagos (M-CSF), respectivamente (SCHMID et al., 2010). A expressão de Flt3 é mantida durante todo o desenvolvimento das DCs e nas células já diferenciadas, mas não em macrófagos. A expressão de M-CSFR, por sua vez, é mantida em macrófagos maduros mas passa a ser pouco expresso em DCs (SCHMID et al., 2010). No entanto, outros fatores estão ligados a geração destas células, como por exemplo o GM-CSF (KINGSTON et al., 2009). A associação destes fatores somados ao microambiente onde as células precursoras estão inseridas são cruciais na determinação da geração das DCs ou de macrófagos *in vivo*.

A relação próxima entre os precursores de DCs e os monócitos/macrófagos reflete na dificuldade encontrada por diversos grupos em encontrar marcadores específicos para a primeira. Esta dificuldade se traduziu em décadas de ceticismo de alguns pesquisadores, – que nos últimos anos ainda persiste (HUME, 2008) – inclusive em relação a existência propriamente dita das DCs desde a sua descoberta. Além disso, o uso de marcadores de membrana para diferenciar as linhagens têm sido problemáticos devido a grande heterogenicidade destes marcadores de acordo com o estado de maturação e localização anatômica destas células. Embora ainda não tenha sido encontrado um marcador universal e específico para as DCs, avanços têm sido obtidos nesta área, principalmente com o advento dos programas transcripcionais, sendo que recentemente, um marcador promissor foi identificado. O fator de transcrição dedo de zinco 46 (*zbtb46*) no sistema imune é restrito a linhagem de cDCs (MEREDITH et al., 2012; SATPATHY et al., 2012). Especificamente, o *zbtb46* começa a ser expresso na fase de pre-cDC e continua expresso nas cDCs esplênicas CD8⁺ e CD11b⁺, e em cDCs CD103⁺ de tecidos não-linfóides, enquanto é ausente em monócitos e macrófagos (MEREDITH et al., 2012; SATPATHY et al., 2012). A identificação deste e de outros marcadores de DCs são promissoras e podem fornecer pistas importantes no reconhecimento e manipulação de populações de DCs com alta especificidade.

As DCs se distribuem amplamente por todo o organismo, localizando-se principalmente na pele, nas mucosas, mas também no sangue e nos espaços intersticiais de muitos órgãos e tecidos (MAHNKE et al., 2002). Este posicionamento, que depende da expressão de uma série de moléculas de adesão,

quimiocinas e receptores de quimiocinas pelas DCs, é estratégico para o mecanismo inato de captura de antígenos. Após a captura destes, as DCs migram para os órgãos linfóides pelos vasos linfáticos aferentes em um processo controlado pelo receptor de quimiocina C-C 7 (CCR 7) (OHL et al., 2004), onde entram em contato com as zonas de células T para iniciar as respostas imunes adaptativas (ALLAN et al., 2006).

De forma a realizar estas funções, as cDCs existem em dois estados funcionais distintos (BANCHEREAU et al., 2000; MELLMAN; STEINMAN, 2001). As células presentes nos tecidos periféricos possuem um papel voltado a vigilância e a captura de agentes microbianos. Para executar este papel, estas células possuem alta capacidade endocítica, mas baixa expressão dos MHC I e II e foram denominadas células dendríticas imaturas (iDCs). Após entrar em contato com os agentes microbianos ou estímulos inflamatórios, estas células passam por uma série de mudanças, na qual perdem sua capacidade endocítica e passam a apresentar um fenótipo favorável a apresentação antigênica e ativação de linfócitos. Estas mudanças incluem uma reorganização citoplasmática, transporte dos complexos peptídeo-MHC para a superfície celular e aumento de moléculas co-estimuladoras de linfócitos, como o CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) (BANCHEREAU et al., 2000). Estas células, por sua vez foram denominadas células dendríticas maduras e são as principais estimuladoras das respostas de linfócitos T, como descrito em reações mistas de leucócitos primeiramente por Steinman et al. (1983).

O destino das células T auxiliares (do inglês *helper*) (T_H) virgens (do inglês *naïve*) é determinado por três sinais oriundos de DCs maduras. O primeiro sinal resulta da ligação da molécula de MHC-II conjugada com o peptídeo antigênico derivado dos patógenos no receptor de célula T (TCR), e determina a especificidade antigênica da resposta. A iniciação da polarização dos linfócitos também necessita de um segundo sinal, que é a ligação das moléculas co-estimuladoras das DCs (CUNNINGHAM; LAFFERTY, 1977), como o CD80 e o CD86 nos receptores CD28 dos linfócitos. A ausência deste sinal pode levar os linfócitos a um estado de anergia, induzindo tolerância. Após a ativação dos linfócitos pelas DCs através dos sinais 1 e 2, os linfócitos rapidamente expressam CD40L. Este receptor se liga ao CD40 das DCs e forma fortes conexões entre as duas células, resultando em uma

ativação contínua de fatores de transcrição, como o NF- κ B (O'SULLIVAN; THOMAS, 2002).

Além destes dois primeiros sinais, as DCs secretam uma série de citocinas específicas determinadas pela natureza antigênica que promoveu sua maturação. Essas citocinas fornecem o último sinal para o desenvolver os linfócitos em células protetoras efetivas. Várias citocinas com capacidade de polarização de linfócitos T_H derivadas das DCs foram identificadas. Dentre as citocinas mais consolidadas estão as responsáveis pela polarização de linfócitos T_H do tipo 1 (T_H1), como a Interleucina-12 (IL-12), IL-23, IL-27 (TRINCHIERI, 2003), interferons do tipo 1 (IFNs) (KADOWAKI et al., 2000) e as moléculas de adesão intracelular 1 (ICAM1) (SALOMON; BLUESTONE, 1998). Dentre os fatores de polarização dos linfócitos T_H2 estão as proteínas quimiotáticas de monócitos (MCP-1, também conhecidas como CCL2) e os ligantes de OX40 (OX40L) (OHSHIMA et al., 1998). Por fim, entre os fatores polarizadores de linfócitos T reguladores, estão a IL-10 e o fator de transcrição do crescimento (TGF- β) (GROUX et al., 1996; ZELLER et al., 1999).

As DCs podem reconhecer patógenos diretamente ou indiretamente, através de fatores como citocinas e quimiocinas produzidos por outras células em resposta a uma infecção. Embora sinais indiretos na forma de fatores endógenos possam alertar as DCs, a ativação direta através dos PAMPs são cruciais para a indução das respostas das células T. O reconhecimento dos PAMPs é mediado pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) tais como os receptores do tipo *Toll* (PALUCKA; BANCHEREAU, 2002) e os receptores de lectina do tipo C (CLR). Os padrões moleculares que são reconhecidos por estes receptores são indispensáveis para o ciclo vital dos patógenos, e a sua estrutura ou localização celular diferem do hospedeiro, permitindo a sua distinção pelas células sentinelas. O TLR é capaz de detectar componentes da parede celular na superfície de bactérias, fungos e protozoários ou estruturas dos ácidos nucleicos de bactérias e vírus em compartimentos endossomais especiais (PALUCKA; BANCHEREAU, 2002), enquanto o CLR está envolvido no reconhecimento de padrões de carboidratos associados aos patógenos (MCGREAL; GORDON, 2004). Notavelmente, tanto a exposição aos PAMPs, como o contato com os fatores teciduais pode promover a polarização das iDCs em mDCs efetoras que seletivamente influenciam a

diferenciação das células T_H virgens nos subtipos T_H1, T_H2 e células T reguladoras. Os principais fatores teciduais, bem como o tipo de polarização que eles produzem, está exemplificado na Tabela 1.

Tabela 1 – Fatores teciduais do tipo 1, tipo 2 e reguladores

Fatores Teciduais	Tipo 1	Tipo 2	Reguladores
Citocinas	IFN- γ , IFN- α/β , IL-12p70, TNF- β , IL-18, IL-27	IL-4, IL-5, IL-9, IL- 13, IL-25, TSLP	IL-10, TGF- β , TSP1
Quimiocinas	CXCL9, CXCL10, CCL21	CCL2, CCL7, CCL8, CCL13, CCL17	
Fatores co-estimuladores	ICAM1	OX40L	PD1/PD2L, CTLA4, GITRL, CD47, SIRP- α
Eicosanóides		PGE ₂	
Outros		Histamina	

Legenda: Fatores que polarizam as células dendríticas. CCL, ligante de quimiocina CC; CTLA4, antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico; CXCL, ligante de quimiocina CXC; GITRL, receptor relacionado ao ligante de TNF induzido por glicocorticóide; ICAM, molécula intercelular de adesão 1; IFN, interferon; IL, interleucina; PD, receptor de morte programada; PGE₂, prostaglandina E₂; SIRP- α , proteína- α reguladora de sinal; TGF- β , fator de crescimento transformador β ; TNF- β , fator de necrose tumoral β ; TSP1, trombospondina; TSLP, linfopoetina estromal tímica.

Fonte: Modificado de (KAPSENBERG, 2003).

Além de ativar as células T virgens e instigar respostas efetivas dos linfócitos T, atualmente também é reconhecido que as DCs também são importantes para a indução e manutenção da tolerância periférica de células T (STEINMAN; HAWIGER; NUSSENZWEIG, 2003). Diversos mecanismos pelos quais as DCs induzem a tolerância imune têm sido descritos, incluindo o bloqueio da expansão clonal e a indução da anergia de células T, deleção de células T, expressão de moléculas imunomoduladoras, produção de fatores imunossupressores e indução de células T reguladoras (T_{regs}). Dois grupos de T_{regs} foram definidas: T_{regs} que ocorrem naturalmente, provenientes do timo (nT_{regs}), e T_{regs} adaptativas que são induzidas na periferia (iT_{regs}) (BILATE; LAFAILLE, 2012; JOSEFOWICZ; RUDENSKY, 2012). As nT_{regs} aparentemente são capazes de suprimir as respostas imunes principalmente

por mecanismos contato-dependentes, incluindo a diminuição da expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 por um mecanismo de trans-endocitose mediado por CTLA-4 (QURESHI et al., 2011). Uma das iT_{regs} mais bem caracterizadas é a célula T regulatória do tipo 1 (Tr1). Estas células são induzidas a partir das células T virgens e controlam as respostas imunes principalmente através da produção de citocinas imunossupressoras (IL-10 e TGF- β), mas também agem lisando células alvo de origem mielóide (EZZELARAB; THOMSON, 2011).

O uso de DCs tolerogênicas têm sido extensivamente estudado com o objetivo de prolongar a sobrevivência de órgãos transplantados e ao mesmo tempo reduzir o uso de drogas imunossupressoras (EZZELARAB; THOMSON, 2011). Ainda, o uso destas células têm sido expandidas no desenvolvimento de imunoterapias para doenças autoimunes. Neste caso, as DCs tolerogênicas são utilizadas em terapias celular autólogas, no qual células precursoras de DCs são isoladas do paciente, diferenciadas *ex vivo* em DCs tolerogênicas, carregadas ou não com auto-antígenos alvo, e injetadas de volta nos pacientes, resultando em um decréscimo da resposta inflamatória (HILKENS; ISAACS, 2013).

Em contraste com a sua tolerogenicidade inerente, a capacidade das DCs de estimular respostas efetivas de células T faz com que estas células possuam também propriedades terapêuticas imunoestimuladoras (FINKELMAN et al., 1996). Estes atributos têm sido utilizados principalmente em estudos envolvendo vacinas antitumorais (BARBUTO et al., 2004). O princípio envolve fornecer peptídeos antigênicos tumorais às DCs, que por sua vez ativariam linfócitos T citotóxicos (CTL) direcionados às células tumorais. Nos últimos anos várias estratégias têm sido empregadas para gerar vacinas antitumorais envolvendo as DCs, como pulsar as estas células com peptídeos ou proteínas; transfectar as DCs com ácido desoxiribonucléico (DNA) e ácido ribonucléico (RNA); carregar as DCs com as células tumorais e com lisados destas; infectar as DCs com vetores bacterianos, fúngicos ou virais. Somadas as técnicas de carregamento de antígeno pelas DCs, drogas específicas têm sido utilizadas para facilitar a captura dos antígenos tumorais pelas DCs e para aumentar a expressão das moléculas co-estimuladoras destas *in vivo*. Ainda, o uso de adjuvantes induz a maturação das DCs, consequentemente levando a um aumento da ativação de CTLs direcionadas ao tumor (YONG et al.,

2012).

Embora a imunoterapia contra o câncer – que envolve, dentre outras, o uso de vacinas antitumorais com DCs geradas *ex vivo* – seja promissora, cada etapa da montagem da resposta imune está sujeita a regulação por sinais negativos, como por exemplo a exaustão e anergia das células T no microambiente tumoral. Ainda, as células tumorais possuem mecanismos de escape das ferramentas citotóxicas dos linfócitos. As T_{regs} parecem também serem fundamentais no favorecimento dos tumores (PALUCKA et al., 1997). Todos estes obstáculos dificultam a eficácia das vacinas antitumorais de DCs. Portanto, o uso de abordagens que potencializem a ativação imune provocada pelas DCs serão críticas no melhoramento das respostas de CTLs direcionadas às células tumorais. As estratégias mais eficazes no combate à doença provavelmente serão aquelas que irão associar sinergicamente a imunoterapia com outras terapias, como por exemplo a quimioterapia e a cirurgia.

Alguns trabalhos avaliaram as DCs em um contexto neuroimune. O grupo de Truckenmiller vêm mostrando a ação da corticosterona nas DCs. Em um dos trabalhos, eles mostraram que a ligação de corticosterona nos receptores de glicocorticóides das DCs suprimiu a formação dos complexos peptídeo-MHC-I reduzindo sua habilidade em ativar células T (TRUCKENMILLER et al., 2005). Em outro trabalho, o grupo também mostrou que a ligação de corticosterona nos receptores de glicocorticóides influi na maturação e na produção de citocinas das DCs (ELFTMAN et al., 2007). Ainda, foi demonstrado que a corticosterona, ou o estresse são capazes de reduzir a apresentação cruzada de antígenos, em um modelo utilizando ovalbumina (OVA) e células T com receptores específicos para este peptídeo (HUNZEKER et al., 2011).

O SNS também parece exercer efeitos nas DCs, a partir da liberação de noradrenalina na periferia. Este neurotransmissor por sua vez, pode ligar a receptores adrenérgicos presentes nas DCs, uma vez que estas células possuem mRNA para estes receptores (MAESTRONI, 2000; MAESTRONI; MAZZOLA, 2003). A ligação de agonistas colinérgicos em receptores adrenérgicos de DCs é capaz de modular a produção de citocinas, migração e capacidade de apresentação de antígeno destas células (MAESTRONI, 2000; MAESTRONI, 2002; SEIFFERT et al.,

2002; MAESTRONI; MAZZOLA, 2003). Ainda, Saint-Mezard et al. (2003) mostraram que estresse psicológico é capaz de exercer um efeito adjuvante em DCs, efeito este mediado pela noradrenalina.

Os efeitos do SNP nas DCs foram pouco estudados, mas sabe-se que estas células em camundongos possuem mRNA para todas as subunidades de receptores muscarínicos e subunidades de receptores nicotínicos $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 2$ e $\beta 4$ (KAWASHIMA et al., 2007). A acetilcolinesterase (AChE) é constitutivamente expressa em DCs. Em contrapartida, as DCs não apresentam colina acetiltransferase (ChAT), mas o tratamento com LPS é capaz de induzir a expressão desta enzima (KAWASHIMA et al., 2007). Embora estas células apresentem uma maquinaria colinérgica, os efeitos biológicos da ligação de antagonistas e agonistas nestes receptores, bem como as células usam estas enzimas ainda é pouco compreendido. Ainda, trabalhos envolvendo a modulação de DCs *in vitro* com nicotina são um pouco controversos na literatura. Existem estudos demonstrando que este agonista tem um efeito estimulatório em DCs (GAO; WAN; GU, 2007; GAO et al., 2011), enquanto outros têm demonstrado um efeito imunossupressor nestas células (NOURI-SHIRAZI; GUINET, 2003; NOURI-SHIRAZI; TINAJERO; GUINET, 2007).

Em um trabalho recente de doutorado realizado no nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado em um modelo de indução de resposta imune pela imunização com OVA, que o tratamento com a anabasina – um agonista de receptores nicotínicos do tipo $\alpha 7$ – foi capaz de diminuir a expressão de moléculas co-estimuladoras de DCs de linfonodos *in vivo* sete dias após a imunização, de diminuir a produção de IL-12 intracelular nas DCs esplênicas e geradas a partir da medula óssea *ex vivo* e foi capaz de diminuir a resposta de hipersensibilidade tardia. No entanto, o mesmo tratamento também aumentou a expressão de NF- κ B e de moléculas co-estimuladoras em DCs de baço (PINHEIRO, 2012), confirmando que os efeitos dos mediadores do sistema nervoso parassimpático em DCs ainda são nebulosos.

Desta maneira, a partir de evidências da existência de conexões muito próximas entre terminações nervosas e células imunes e de indicações da interação do sistema colinérgico com células reguladoras da imunidade, somados ao

fato da inexistência na literatura da observação dos efeitos do nervo vago sobre as DCs, este trabalho teve como objetivo verificar a interferência da via vagal na modulação das DCs *in vivo* e geradas a partir de precursores da medula óssea *ex vivo*.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a influência da via vagal sobre células dendríticas geradas a partir de células precursoras da medula óssea utilizando o modelo de vagotomia cervical unilateral em camundongos C57BL/6.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar a vagotomia cervical unilateral (VCU) e a partir de então:

- a) Avaliar a resposta imune celular *in vivo* através do teste de DTH.
- b) Verificar o fenótipo, função fagocítica e apresentação de antígeno de células dendríticas derivadas da medula óssea dos animais parcialmente vagotomizados.
- c) Determinar a resposta proliferativa de linfócitos OT-II frente ao co-cultivo com células dendríticas derivadas da medula óssea dos animais parcialmente vagotomizados.
- d) Avaliar a produção de citocinas do co-cultivo celular de células dendríticas derivadas da medula óssea dos animais parcialmente vagotomizados com linfócitos OT-II.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos fêmeas das linhagens C57BL/6 e OT-II (animais transgênicos com receptores de células T específicos para OVA) com idades variando entre 8-12 semanas. Os animais foram acondicionados em salas com controle de temperatura ($22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$), humidade (65-70%) e luz artificial (ciclo 12h claro/12h escuro, luzes acendendo as 7:00 da manhã), em gaiolas de polipropileno com acesso *ad libitum* a ração Nuvilab[®] para roedores (Companhia Nuvital) e água filtrada. Maravalha estéril foi utilizada como leito para os animais. Os camundongos foram procedentes do biotério do Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, no qual eles também foram mantidos durante todos os experimentos. Os animais foram utilizados seguindo as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório do Comitê de Ética da FMVZ – USP (2330/2011).

4.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

A técnica de vagotomia cervical unilateral (ou vagotomia parcial) foi baseada e adaptada de (VAN WESTERLOO et al., 2005). Sucintamente, os animais foram submetidos à analgesia com 0,1 mg/kg de fentanil, por via subcutânea e anestesiados com quetamina e xilazina nas doses de 0,05 mg/g e 0,02 mg/g de peso corporal, respectivamente, por via intraperitoneal. Uma incisão mediana ventral cervical foi realizada para expor o tronco vagal direito, o qual foi separado da artéria carótida e seccionado (Figura 3). A síntese da pele foi realizada com pontos isolados simples com fio nylon. Nos animais *sham*, a intervenção cirúrgica foi semelhante ao grupo denervado, porém o nervo não foi transeccionado. A vagotomia unilateral foi escolhida, pois a vagotomia cervical bilateral é letal em camundongos (VAN WESTERLOO et al., 2005). Sete dias após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram utilizados para os experimentos subsequentes. A eutanásia foi realizada em câmara de CO₂.

Figura 3 - O sistema vagal

Legenda: As principais vias são o vago cervical esquerdo que forma o tronco ventral e o vago cervical direito que forma o tronco dorsal. As vias menores são constituídas pelos cruzamentos entre o vago cervical esquerdo, que forma o tronco dorsal e o vago cervical direito que forma o tronco ventral. A seta em azul mostra o local onde foi realizada a transecção do ramo vagal (ramo cervical direito).
 Fonte: Modificado de (HORN; FRIEDMAN, 2005).

4.3 IMUNIZAÇÃO COM KLH *IN VIVO*

Camundongos foram imunizados com 100 µg de KLH (Hemocianina de *Megathura crenulata*, SIGMA) emulsificado 1:1 em CFA (adjuvante completo de *Freund*) ou apenas solução salina, na base da cauda (Figura 4). Após sete dias, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ para avaliação da reação de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) e para avaliação do fenótipo e função fagocítica DCs-dMO.

Figura 4 – Fotografia exemplificando a injeção subcutânea na base da cauda dos camundongos

Fonte: (http://hookelabs.com/protocols/eaeAI_C57BL6/7-2nd%20injection_240px.png)

4.3.1 Ensaio de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH)

A resposta de DTH foi utilizada como uma medida *in vivo* da resposta imune celular após um estímulo antigênico. Esta foi calculada como a diferença da espessura da pata dos camundongos antes e depois do desafio com o antígeno da imunização. Após os sete dias de imunização com KLH, a medida da espessura das patas esquerda e direitas foram realizadas com o auxílio de um paquímetro digital e imediatamente depois a reação do DTH foi induzida pela injeção intradérmica de 10 μ L de uma solução de KLH (2 μ g/mL em solução salina 0,9%) no coxim plantar das patas esquerdas (Figura 5). Como controle, apenas o veículo (solução salina 0,9%) foi injetado nas patas direitas. Após 12, 24 e 48 horas, a espessura das patas controle (salina) e desafiadas (KLH) foram medidas. As respostas de DTH foram expressas em relação a magnitude do edema das patas, utilizando os seguintes cálculos: Δ – [(espessura da pata da pata desafiada (KLH) – espessura da pata controle (Salina)] onde Δ = espessura da pata após o desafio – espessura da pata antes do desafio.

Após a última avaliação, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, e as patas foram coletadas e sua massa avaliada. O cálculo utilizado foi a massa da pata esquerda (KLH) – a massa da pata direita (salina). Os resultados foram expressos como média $\pm$ SEM.

Figura 5 – Fotografia exemplificando a injeção intradermal no coxim plantar dos camundongos

Fonte: (<http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S104620230600137X-gr4.jpg>)

4.4 CÉLULAS NIH/3T3 SECRETORAS DE GM-CSF

A linhagem celular NIH/3T3 (fibroblasto de camundongo) (Figura 6) transformada com o plasmídeo contendo o gene murino codificante do fator de crescimento estimulador de colônia de granulócitos e monócitos (GM-CSF) foi gentilmente cedida pela Prof^a. Dr^a. Marilene Demasi do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantã com o objetivo de se obter o GM-CSF e utilizá-lo na geração de DCs. Informações sobre a construção do plasmídeo e transformação celular estão em Qin et al., 1997, Ohl et al., 2004 e Schüler; Blankenstein, 2002.

Figura 6 – Células NIH/3T3 em cultura

Número ATCC: CRL-1658
Designação: NIH/3T3

Fonte: (<http://www.atcc.org/~media/Attachments/7/5/3/F/1825.ashx>)

4.5 CULTIVO DAS CÉLULAS NIH/3T3

As células NIH/3T3 foram mantidas em cultivo em meio RPMI-1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF – LGC Biotecnologia) penicilina (100 U/mL) (Gibco), estreptomicina (100 μg/mL) (Gibco) e L-Glutamina (Gibco) (2 mM). Para obtenção do sobrenadante contendo GM-CSF, foram seguidas as orientações de um trabalho prévio (PIASSA-FILHO, 2010), com algumas alterações. Sucintamente, $3,75 \times 10^5$ células foram contadas em câmara de Neubauer e semeadas em uma garrafa T225 contendo 8 mL de meio de cultura. No 4º dia o meio de cultura foi removido, centrifugado e devolvido para a garrafa com mais 8 mL de meio de cultura fresco. Após uma semana, as células foram suspendidas com tripsina (Gibco), centrifugadas e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C para posterior avaliação da concentração.

4.5.1 Determinação da concentração de GM-CSF no sobrenadante do cultivo das células NIH/3T3

O sobrenadante coletado dos cultivos foi descongelado e utilizado para determinação da concentração de GM-CSF presente através da técnica de ELISA sanduíche, utilizando o kit ELISA MAX™ Standard Sets Mouse GM-CSF (Biolegend) segundo as recomendações do fabricante. Sucintamente, no dia 1 uma placa de 96 wells foi incubada com solução de anticorpo de captura *overnight*. No 2º dia os poços foram lavados e em seguida bloqueados com *assay diluent* (Biolegend). Após a incubação, os poços foram lavados e os padrões da curva e as amostras foram adicionadas. Após nova lavagem, foram adicionados aos poços solução de anticorpo de detecção. A placa foi novamente lavada e foram adicionados aos poços solução de substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Após 15 minutos, por fim, foram adicionados aos poços 100 µL de *stop solution* (Cell Signaling Technologies) para parar a reação. A placa foi lida em leitora de microplacas espectrofotométrica na absorbância de 450 nm. Os cálculos de concentração das amostras foram obtidos a partir das concentrações da curva (Figura 7).

Figura 7 – Curva padrão do teste de ELISA para determinação da concentração do GM-CSF presente no sobrenadante das células NIH/3T3

Legenda: (r=0,999). Fonte: CRUZ, 2013.

4.6 PREPARAÇÃO E CULTURA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA (DCs-dMO)

Com o intuito de se avaliar a possibilidade dos precursores das DCs serem modulados pela inervação vagal, foram coletadas células da medula óssea de animais Vgx, as quais foram comparadas com as células de animais submetidos apenas ao procedimento cirúrgico exploratório, células controle (*sham*).

Para isso foi utilizado o método proposto por (LUTZ et al., 1999) com algumas adaptações (Figura 8). Em suma, a medula óssea foi retirada de fêmures e tíbias dos camundongos pela lavagem do interior dos ossos com meio RPMI-1640, por intermédio de agulhas estéreis. A suspensão foi centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C. As hemácias foram lisadas com tampão de lise ACK. As células restantes foram novamente lavadas, contadas em câmara de Neubauer e mantidas em meio de cultura para células dendríticas (DC-RPMI), que consistia em meio RPMI-1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF – LGC Biotecnologia) penicilina (100 U/mL) (Gibco), estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco) e L-Glutamina (Gibco) (2mM), 2-mercaptoetanol (Gibco) (5×10^{-5} M) e 3% (30 µL/ em 1 mL de meio de cultura) de sobrenadante de células NIH/3T3 contendo GM-CSF. As células foram semeadas em placa de 24 poços na concentração de $7,5 \times 10^5$ células/poço em um volume final de 1 mL e mantidas em estufa de CO₂ 5% a 37°C. No terceiro dia de cultivo, mais 1 mL de DC-RPMI foi adicionado a todos os poços. No sexto dia, metade do meio de cultura dos poços foi retirado, centrifugado, ressuspenso em DC-RPMI e devolvido a placa. A eficiência da geração de DCs foi avaliada por citometria de fluxo pela análise das células que expressavam o marcador de membrana CD11c e MHC-II em aparelho FACSCalibur (Becton & Dickinson). No sétimo dia, para maturação das células nas últimas 24 horas de cultivo, foi adicionado 1 µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS). As células que foram tratadas apenas com meio de cultura foram consideradas células dendríticas imaturas (iDCs) e as tratadas com LPS, maduras (mDCs).

Figura 8 – Diagrama da geração de DCs-dMO

Legenda: A Figura demonstra o processo para obter as células dendríticas derivadas da medula óssea. Tanto as tíbias, quanto os fêmures foram dissecados, removendo-se os tecidos adjacentes. As extremidades dos ossos foram cortadas e as células da medula óssea foram retiradas com um jato de meio RPMI. Após a eliminação das hemácias, as células da medula óssea foram cultivadas por 8 dias na presença de GM-CSF para diferenciá-las em DCs.

Fonte: Modificado de (MUCCIOLI et al., 2011).

4.7 ANÁLISE DE MARCADORES FENOTÍPICOS DE MEMBRANA

4.7.1 DCs-dMO

Para avaliar o estágio de maturação *in vitro* das células dendríticas geradas a partir da medula óssea foram analisadas a expressão de moléculas de superfície, selecionando a população positiva para as moléculas CD11c e IA^b (MHC-II), e desta população foi avaliada a frequência e a intensidade das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 por citometria de fluxo, uma vez que a expressão aumentada destes marcadores é comumente associada a células dendríticas maduras.

Em suma, as células obtidas no item 4.7 foram marcadas com os anticorpos CD11c, IA^b, CD80 e CD86 (Tabela 2) por 30 minutos no gelo e no escuro. Pelo menos 5×10^5 células foram utilizadas na marcação. Após este período, as células foram lavadas duas vezes, ressuspensas em PBS e submetidas à leitura em citômetro de fluxo. Pelo menos 10000 eventos foram obtidos de cada amostra. Para a aquisição dos resultados foi utilizado o *software Cellquest Pro* (BD). Para a

análise dos resultados foi utilizado o *software Flowjo* (TreeStar) versão 10 e *Flowjo* versão 7.6.1 (TreeStar). Os resultados foram expressos em média geométrica $\pm$ SEM. A Figura 9 detalha a estratégia para a seleção das populações celulares obtidas para as análises.

Tabela 2 – Anticorpos monoclonais utilizados nos experimentos de fenotipagem e proliferação

Especificidade	Clone	Origem	Marcação	Fabricante
Mouse anti - CD11c	N418	Armenian Hamster IgG	FITC	Biolegend
Mouse anti – IAb	AF6120.1	Mouse (BALB/c) IgG2a, κ	PE	BD
Mouse anti – CD80	16-10A1	Armenian Hamster IgG2, κ	APC	BD Biosciences
Mouse anti – CD86	GL-1	Rat IgG2a, κ	PerCP	Biolegend
Mouse anti – CD4	RM4-5	Rat (DA) IgG2a, κ	APC	BD
Mouse anti – CD3e	145-2C11	Armenian Hamster IgG1, κ	FITC	BD
Mouse anti – Vα2	B20.1	IgG2a, λ	PE	BD Pharmingen
Mouse anti – CD3e	145-2C11	Armenian Hamster IgG1, κ	PE	BD Pharmingen

Fonte: CRUZ, 2013.

Figura 9 – Esquema demonstrando a seleção das populações avaliadas por citometria de fluxo nos experimentos de fenotipagem de DCs-dMO

Legenda: As setas indicam o fluxo de análise dos dados obtidos.

Fonte: CRUZ, 2013.

4.7.2 Imunofenotipagem de linfócitos de animais OT-II

Os animais OT-II são camundongos transgênicos que carregam um transgene que codifica um receptor de célula T ($V\alpha 2$ e $V\beta 5$) específicos para o peptídeo da ovalbumina de frango (323-339) apresentado pela molécula do MHC de classe II H2-Ab1 (I-Ab) (BARNDEN et al, 1998).

Antes dos experimentos foi necessário avaliar se os camundongos apresentavam um fenótipo de animais OT-II, ou seja, se apresentavam majoritariamente receptores específicos para OVA. Para tal, o sangue dos animais foi coletado pela cauda, as hemácias foram lisadas com tampão de lise ACK e os leucócitos foram marcados com os anticorpos anti-CD4 (para seleção dos linfócitos T *helper*) e anti- $V\alpha 2$ (subunidade do receptor da células T) (Tabela 2) por 30 minutos a 4°C no escuro. Em seguida, as células foram lavadas com PBS duas vezes, ressuspensas e então os eventos foram adquiridos em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson). Para a aquisição dos resultados foi utilizado o software *Cellquest Pro* (BD). Para a análise dos resultados foi utilizado o software *Flowjo* (TreeStar) versão 10 e *Flowjo* versão 7.6.1 (TreeStar). A Figura 10 mostra a

seleção das populações obtidas para as análises. Os camundongos selecionados para os experimentos de proliferação foram aqueles que continham linfócitos T CD4⁺ expressando majoritariamente a subunidade V- α 2 [Figura 10, (a)]. Os camundongos que continham poucos linfócitos T CD4⁺ positivos para a subunidade V- α 2 foram descartados para os experimentos subsequentes [Figura 10, (b)].

Figura 10 – Esquema demonstrando a seleção das populações avaliadas por citometria de fluxo nos experimentos de fenotipagem

Legenda: As setas indicam o fluxo de análise dos dados obtidos. Em (A), camundongos que foram selecionados para os experimentos de proliferação por conterem linfócitos T CD4 que expressam majoritariamente a subunidade V- α 2. Em (B), camundongos que foram descartados para os experimentos posteriores de proliferação por conterem poucos linfócitos T CD4 positivos para a subunidade V- α 2.

Fonte: CRUZ, 2013.

4.8 ENSAIO DE FAGOCITOSE

Para avaliar a capacidade fagocítica das DCs-dMO, 2×10^5 células foram incubadas com *Staphylococcus aureus* mortos e corados com iodeto de propídio (SAPI) e anticorpo monoclonal anti-CD11c (Tabela 2) por 1 hora em estufa a 37°C. A reação foi parada com adição de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 3 mM gelado e lavagem das células. Estas foram então submetidas à leitura em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson). Pelo menos 10000 eventos foram adquiridos. Foram consideradas a porcentagem de células que realizaram a fagocitose, bem como a média da intensidade de fluorescência do SAPI nas células positivas (Geometric Mean). Para a aquisição dos resultados foi utilizado o *software Cellquest Pro* (BD). Para a análise dos resultados foi utilizado o *software Flowjo* (TreeStar) versão 10 e *Flowjo* versão 7.6.1 (TreeStar). Os resultados foram expressos em média $\pm$ SEM. A Figura 11, mostra a seleção das populações obtidas para as análises.

Figura 11 – Esquema demonstrando a seleção das populações avaliadas por citometria de fluxo nos experimentos de fagocitose de SAPI

Legenda: As setas indicam o fluxo de análise dos dados obtidos.

Fonte: CRUZ, 2013.

4.9 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS OT-II

Para melhor avaliar a capacidade apresentadora de antígenos das DCs-dMO, camundongos C57BL/6 foram submetidos à cirurgia (vagotomizados e controles *sham*). Sete dias após a cirurgia, a medula óssea dos camundongos foi

coletada para geração de DCs-dMO (como descrito no item 4.6). Após a geração das DCs-dMO, estas, na concentração de 1×10^6 células/mL foram incubadas por 4 horas com 1 mg/mL de ovalbumina de grau II (SIGMA) em estufa de CO₂ 5% a 37°C para internalização da proteína. Em seguida, adicionou-se 1 µg/mL de LPS, para induzir a maturação das células e estas retornaram à estufa por mais 24 horas. Os linfócitos foram coletados e separados de baços provenientes de animais OT-II com Ficoll-Paque PLUS™ (GE Healthcare Lifesciences). Sucintamente, 6 mL de suspensão de esplenócitos foram adicionados sobre 3 mL de Ficoll-Paque PLUS™, e então sucedeu-se uma centrifugação a 400 xg por 30 minutos sem freio (Figura 13). Os linfócitos foram então coletados da camada situada entre o plasma e o Ficoll-Paque PLUS™ (Figura 12). As células obtidas foram então contadas em câmara de Neubauer, o número de células ajustado, coradas com diacetato de carboxifluoresceína succinimidil ester (CFSE) (5 µg/mL) por 20 minutos a 37°C, e ao final da incubação adicionou-se 2 mL de soro fetal bovino. As células foram lavadas e semeadas na concentração de 2×10^5 células/poço em co-cultivo com as DCs-dMO obtidas nas seguintes razões: 1:5, 1:25, 1:50 e 1:100 (2000, 4000, 8000 e 40000 DCs-dMO, respectivamente). O experimento foi realizado em placas de 96 poços de fundo em U e as placas foram incubadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C por 4 dias. O CFSE se liga de forma covalente a moléculas intracelulares através da carboxyfluoresceína, um corante fluorescente. Portanto, quando uma célula marcada com CFSE entra em divisão, a sua progênie carrega metade do número de moléculas marcadas com carboxifluoresceína e desta forma cada divisão celular consegue ser avaliada medindo-se a diminuição correspondente da fluorescência celular por citometria de fluxo. A base molecular da marcação com CFSE está ilustrada na (Figura 13). Esta pode ser dividida em duas partes: 1) Entrada nas células e 2) Marcação de proteínas. 1) Entrada nas células: A entrada do corante na célula é mediada pela forma diacetilada do corante, o diacetato de carboxifluoresceína succinimidil ester (CFDA, SE). O acetato faz com que o corante fique altamente permeável às membranas, permitindo seu fluxo rápido através da mesma. As esterases presentes na célula clivam os acetatos do CFDA, SE e portanto levam a formação do CFSE, que é muito menos permeável e consequentemente fica concentrado no interior celular. 2) Marcação das proteínas:

Enquanto tanto o CFDA, SE e o CFSE possuem cadeias laterais amino-reativas de succinimidil, apenas o CFSE é fluorescente. Geralmente o acrônimo CFSE, e não CFDA, SE é utilizado para descrever o reagente e o procedimento de marcação em um geral. (QUAH; PARISH, 2010).

Ao término das 96 horas, o sobrenadante do cultivo foi armazenado a -80°C, as células foram coletadas e a aquisição da proliferação foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson). Para análise dos dados de fluorescência, foram considerados os valores da % de divisões celulares e o índice de proliferação das células. O índice de proliferação é o número total de divisões dividido pelo número de células que entraram em divisão. Este índice leva em conta as células que tiveram pelo menos uma divisão, ou seja, o valor reflete apenas as células respondentes. Para a aquisição dos resultados foi utilizado o *software Cellquest Pro* (BD). Para a análise dos resultados foi utilizado o *software Flowjo* (TreeStar) versão 10 e *Flowjo* versão 7.6.1 (TreeStar). Os resultados foram expressos como média $\pm$ SEM. A Figura 14 mostra a seleção das populações obtidas para as análises.

Figura 12 – Ilustração do procedimento de separação de linfócitos por Ficoll-Paque PLUS

Legenda: Inicialmente a tampa azul foi retirada do frasco (1). Após inverter várias vezes o frasco, foram retirados 3 mL de Ficoll com uma seringa (2). O Ficoll foi então despejado em um tubo, e a suspensão celular foi lentamente adicionada sobre a camada de Ficoll (3). As células foram então centrifugadas, resultando na separação ilustrada em 4. A camada superior foi removida e os linfócitos foram então coletados (5, seta azul). Para mais detalhes, ver texto.

Fonte: Modificado do manual do usuário Ficoll Paque Plus – *For in vitro isolation of lymphocytes* – Amersham Biosciences.

(<http://pro.unibz.it/staff2/sbenini/documents/Protein%20purification%20handbooks/Don't%20move/18115269AB.pdf>).

Figura 13 – Representação dos eventos moleculares que ocorrem durante a marcação das células com CFDA, SE).

Legenda: Para detalhes, ver o texto.

Fonte: (QUAH; PARISH, 2010).

Figura 14 – Esquema demonstrando a seleção das populações avaliadas por citometria de fluxo nos experimentos de proliferação de linfócitos de camundongos OT-II

Legenda: As setas indicam o fluxo de análise dos dados obtidos.

Fonte: CRUZ, 2013.

4.10 DOSAGEM DE CITOCINAS PRESENTES NO SOBRENADANTE DO CO-CULTIVO ENTRE AS DCs-dMO E OS LINFÓCITOS OT-II.

A dosagem de citocinas foi realizada pelo teste de *Cytometry Bead Array* (CBA) *Mouse Inflammation Kit* (BD Biosciences) que pode ser utilizado para medir quantitativamente TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-12 p70, IL-10 e MCP-1 em uma única amostra de sobrenadante. O CBA pode ser comparado ao método de ELISA sanduíche e o protocolo de análise foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. De forma resumida, os *nanobeads* de captura e detecção, e as citocinas recombinantes da curva padrão específicos para cada citocina analisada foram diluídas nas concentrações recomendadas. Cada *nanobead* está ligado a anticorpos específicos para a citocina/quimiocina a ser quantificada e apresenta fluorescências diferentes, o que permite a diferenciação de cada citocina, em diferentes picos de média da intensidade de fluorescência, como demonstrado na Figura 15.

Figura 15 – Gráficos ilustrativos dos plots de citometria no ensaio do CBA

Legenda: (a) Citograma que ilustra as populações de *nanobeads* da curva padrão para as diferentes citocinas na concentração de 625 pg/mL. (b) Histograma que ilustra os picos de média da intensidade de fluorescência para as diferentes populações de *nanobeads*.

Fonte: Modificado do manual do usuário do CBA *mouse inflammation kit* – BD Biosciences http://www.bdbiosciences.com/documents/CBA_MouseInflammation_Kit_Manual.pdf.

Os reagentes foram adicionados aos tubos de citometria relativos aos padrões e as amostras na seguinte ordem: suspensão de *nanobeads* de captura (50 μ L), padrões nas diferentes diluições e amostras (50 μ L) e os *nanobeads* de detecção (50 μ L); essa mistura ficou sob incubação por 2 horas em temperatura ambiente no escuro. Após o período de incubação os tubos contendo os padrões e as amostras foram centrifugados a 250 xg por 5 minutos, lavados com PBS,

centrifugados novamente e ressuspendidos para leitura no citômetro de fluxo, com determinação da média da intensidade de fluorescência referente ao fluoróforo PE (detector FL3). Os limites de detecção foram: IL-12p70 (10,7 pg/mL); TNF (7,3 pg/mL); IFN- γ (2,5 pg/mL); MCP-1 (52,7 pg/mL); IL-10 (17,5 pg/mL); IL-6 (5 pg/mL).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram expressos em média $\pm$ SEM. Diferenças estatísticas foram calculadas utilizando o teste *t* de *Student*. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas e os gráficos resultantes foram gerados pelo software *GraphPad Prism* versão 6.0 para *Windows*.

Delineamento Experimental e Resultados

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO

Embora seja evidente a transecção do nervo vago durante os procedimentos cirúrgicos, um acompanhamento foi realizado para garantir que as cirurgias foram bem sucedidas no que se diz respeito à vagotomia, a recuperação dos animais e, assim, garantir a validade dos experimentos subsequentes. Portanto, inicialmente foram realizadas pesagens dos animais desde o dia 0 (dia da cirurgia), até o 11º dia (Figura 16).

Figura 16 – Esquema ilustrando as pesagens de acompanhamento do período pós-cirúrgico

Legenda: Dia inicial do experimento (dia 0), quando foi realizada a cirurgia, e os dias nos quais os animais foram acompanhados através da massa corporal. F

Fonte: CRUZ, 2013.

5.1.1 Resultados

Na curva de acompanhamento (Figura 17), pode-se notar que a massa dos animais *sham* variou pouco, enquanto os animais vagotomizados perderam massa acentuadamente nos dias 1 e 2 pós-cirurgia, muito provavelmente por hipofagia. No entanto, a recuperação começou no 3º dia, no qual os animais começaram a se alimentar normalmente e voltaram a ganhar massa. Embora os animais vagotomizados não voltem a sua massa inicial (Dia 0), a curva mostra que aproximadamente no 7º dia a massa dos dois grupos se apresenta muito próxima, eliminando um possível viés da cirurgia que é a diferença de massa. Portanto todos os experimentos subsequentes foram realizados após 7 dias de recuperação dos procedimentos cirúrgicos.

Figura 17 - Curva de acompanhamento dos pesos médios dos animais submetidos a vagotomia ou apenas o procedimento cirúrgico exploratório (*sham*)

Legenda: A Figura representa 2 experimentos independentes (n=12 animais/grupo/experimento).
Fonte: CRUZ, 2013.

5.2 EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DA DTH

De forma a avaliar se a vagotomia seria capaz de alterar uma resposta imune *in vivo*, realizamos o ensaio do DTH, no qual os animais foram imunizados com KLH no 7º dia pós-cirurgia e 7 dias após a imunização foram

desafiados com o mesmo antígeno. A espessura da pata foi então mensurada em um período de 48 horas, com intervalos de 12 horas. No fim do experimento, os animais foram eutanasiados e as patas tiveram a massa aferida (Figura 18 – delineamento experimental).

Figura 18 – Esquema ilustrando o delineamento no experimento da avaliação da DTH. No dia 0, os animais foram submetidos a vagotomia, ou apenas ao procedimento exploratório (*sham*)

Legenda: No 7º dia, os camundongos foram imunizados com KLH e CFA na proporção de 1:1. No 14º dia, os animais foram desafiados com KLH na pata esquerda e salina na direita. Logo após o desafio e durante 48 horas (com intervalos de 12 horas) a espessura das patas foi avaliada. Ao fim das 48 horas os animais foram sacrificados e as patas tiveram a massa aferida.

Fonte: CRUZ, 2013.

5.2.1 Resultados

A Figura 19 mostra o desenvolvimento do inchaço das patas após o desafio (hora 0). É possível observar que a imunização foi efetiva, pois ambos os grupos desenvolveram um inchaço que começou 12 horas após o desafio e foi significativo a partir de 24 horas do mesmo. Embora a comparação entre o grupo *sham* e o grupo Vgx não tenha resultado em diferenças estatisticamente significantes, é possível observar que no grupo *sham*, o pico do inchaço foi atingido 24 horas após o desafio, e depois de 48 horas a inflamação já se apresentou bastante reduzida. No caso do grupo Vgx, após 24 horas do desafio, uma certa inflamação já pode ser observada, no entanto, foi só em 48 horas que a inflamação se instaurou de fato.

Figura 19 - Curva representativa da magnitude do inchaço das patas dos animais submetidos a vagotomia (Vgx) ou apenas ao procedimento cirúrgico exploratório (*sham*), imunizados e desafiados com KLH

Legenda: A Figura representa 2 experimentos independentes (n=3 animais/grupo/experimento). Os valores mostram a média $\pm$ SEM dos experimentos. (*) $p < 0,05$ vs grupo *sham* na hora 0. (#) $p < 0,05$ vs grupo Vgx na hora 0 (teste *t* de Student).

Fonte: CRUZ, 2013.

A análise do inchaço das patas pela massa não mostrou nenhuma diferença significativa entre o grupo experimental quando comparado ao controle (Figura 20).

Figura 20 - Figura representativa da medida da massa das patas dos animais submetidos a vagotomia (Vgx) ou apenas ao procedimento cirúrgico exploratório (*sham*), imunizados e desafiados com KLH

Legenda: A Figura representa 2 experimentos independentes (n=3 animais/grupo/experimento). Os valores mostram a média $\pm$ SEM dos experimentos.
Fonte: CRUZ, 2013.

5.3 EXPERIMENTO 2 - FENÓTIPO E CARACTERÍSTICAS DE DCs-dMO IMATURAS E MADURAS.

Antes de utilizar o sobrenadante das células NIH/3T3 contendo GM-CSF para geração de DCs em cultura, a concentração do fator de crescimento presente no meio foi avaliada. O método de obtenção do sobrenadante foi baseado segundo Piassa-Filho, (2010). A metodologia utilizada para determinar a concentração de GM-CSF foi o teste de ELISA Mouse GM-CSF ELISA MAX™ Standard (Biolegend) em diferentes diluições do sobrenadante. O teste determinou que 3% do sobrenadante utilizado nos experimentos correspondeu a uma concentração de 200 ng/mL. O GM-CSF foi utilizado nos experimentos subsequentes que envolveram a diferenciação de DCs *ex vivo*.

As DCs foram então diferenciadas a partir de células precursoras da medula óssea em cultura na presença do GM-CSF obtido. As DCs maduras foram geradas a partir das DCs-dMO de animais vagotomizados ou controles através da ativação com LPS. Está descrito na literatura que iDCs expostas a LPS aumentam a

expressão de algumas moléculas de membrana, como o MHC-II, e as moléculas co-estimuladoras, CD80 e CD86 (BANCHEREAU et al. 2000). A Figura 21 mostra o delineamento do experimento.

Figura 21 – Esquema ilustrando o delineamento do experimento de fenotipagem das DCs-dMO provenientes de animais Vgx e *sham*

Legenda: Sete dias após a cirurgia, os animais foram imunizados com KLH ou solução salina. As células precursoras da medula óssea foram cultivadas por 7 dias com GM-GSF obtido de células NIH/3T3. No 7º dia, as células receberam LPS como estímulo para maturação. Após 24 horas as células foram avaliadas em citômetro de fluxo.

Fonte: CRUZ, 2013.

5.3.1 Resultados

A Figura 22 mostra os histogramas da expressão de CD11c⁺ nos grupos estudados. Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos. Embora o tratamento com LPS não tenha sido capaz de aumentar a % de células MHC-II⁺ de forma significativa, é possível observar que na cultura de DCs gerada haviam duas populações de MHC, uma com menor expressão (Low) e uma com maior expressão (High) desta molécula (Figura 9 – Material e Métodos).

Figura 22 – Histograma representativo da % de Células CD11c⁺MHC-II⁺ geradas a partir de células precursoras da medula óssea de camundongos

Legenda: A Figura representa 2 experimentos independentes (n=3 animais/grupo/experimento). Os valores mostram a média $\pm$ SEM dos experimentos.
 Fonte: CRUZ, 2013.

A população CD11c⁺ MHCII^{High} (Figura 23) foi escolhida para as análises seguintes, pois esta população caracteriza mais fielmente as DCs maduras do que a população CD11c⁺MHCII^{Low} (BANCHEREAU et al., 2000). Desta forma, as análises das moléculas CD80 e CD86 foram feitas a partir da seleção desta população. O tratamento com LPS também não foi capaz de aumentar de forma significativa a quantidade de células expressando os marcadores CD80 e CD86 (Figura 23 – B e C).

Figura 23 – Histogramas representativos da % de (A) células CD11c+MHC-II^{High}; (B) células CD11cMHC-II^{High}CD80⁺ e (C) células CD11c+MHC-II^{High}CD86⁺ geradas a partir de células precursoras da medula óssea de camundongos

(Continua)

Legenda: A Figura representa 2 experimentos independentes (n=3 animais/grupo/experimento). Os valores mostram a média $\pm$ SEM dos experimentos. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo sem tratamento com LPS (*teste t de Student*).

Fonte: CRUZ, 2013.

Para determinar a quantidade de moléculas expressas nas células positivas, foi avaliado a média da intensidade de fluorescência (MFI) das amostras. Neste caso, o tratamento com LPS foi capaz de aumentar a IF referente ao MHC-II nos grupos *sham* e Vgx (Figura 24 - A). O LPS também aumentou a IF referente ao CD80 (Figura 24 - B) em todos os grupos estudados. No entanto, o tratamento não foi capaz de alterar a fluorescência referente ao CD86 (Figura 24 - C).

Figura 24 – Histogramas representativos da média da intensidade de fluorescência (MFI) de (A) células CD11c⁺MHC-II^{High}; (B) células CD11c⁺MHC-II^{High}CD80⁺ e (C) células CD11c⁺MHC-II^{High} CD86⁺ geradas a partir de células precursoras da medula óssea

(Continua)

Legenda: A Figura representa 2 experimentos independentes (n=3 animais/grupo/experimento). Os valores mostram a média $\pm$ SEM dos experimentos. (*) $p < 0,05$ em relação ao seu relativo grupos sem tratamento com LPS (*teste t de Student*).

Fonte: CRUZ, 2013.

5.4 EXPERIMENTO 3 - CAPACIDADE DE FAGOCITOSE DAS DCs-dMO

As DCs imaturas são células eficientes na captura de proteínas, enquanto as DCs maduras alteram seu papel, no qual se tornam células competentes na apresentação de antígeno (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998).

Através da citometria de fluxo, foi investigado a capacidade das iDCs de animais controle *sham* e de animais vagotomizados de fagocitar SAPI. A Figura 25 ilustra o delineamento do experimento.

Figura 25 – Esquema ilustrando o delineamento do experimento de avaliação da fagocitose das DCs-dMO de animais Vgx e *sham*

Legenda: Sete dias após a cirurgia, os animais foram imunizados com KLH ou solução salina. As células precursoras da medula óssea foram cultivadas por 7 dias com GM-CSF obtido de células NIH/3T3. No 7º dia, as células foram avaliadas em citômetro de fluxo.

Fonte: CRUZ, 2013.

5.4.1 Resultados

Como demonstrado na Figura 26, as DCs-dMO imaturas de ambas as origens possuem capacidades fagocíticas similares. A análise da IF do SAPI nas células CD11c⁺, mostrou uma redução no número de bactérias fagocitadas pelas DCs-dMO provenientes de animais Vgx quando comparados ao controle *sham* (MFI: *Sham* = 550,6; Vgx= 434,8) (Figura 27).

Figura 26 – Histograma representativo da % de Células CD11c+SAP⁺ de DCs geradas a partir de células precursoras da medula óssea de camundongos

Legenda: A Figura representa 2 experimentos independentes (n=3 animais/grupo/experimento). Os valores mostram a média $\pm$ SEM dos experimentos.

Fonte: CRUZ, 2013.

Figura 27 – Média da intensidade de fluorescência (MFI) das células CD11c+ que realizaram fagocitose do *Staphylococcus aureus*

Legenda: A Figura representa 2 experimentos independentes (n=3 animais/grupo/experimento). Os valores mostram a média $\pm$ SEM dos experimentos. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham salina* (*teste t de Student*).

Fonte: CRUZ, 2013.

5.5 EXPERIMENTO 4 - PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS OT-II FRENTE A APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENO DAS DCs-dMO

Os linfócitos dos camundongos transgênicos OT-II expressam um transgene que codifica receptores específicos para ovalbumina (OVA) (BARNDEN, et al, 1998) na maioria de seus linfócitos T $CD4^+$. Inicialmente, os linfócitos do sangue destes animais foram fenotipados para confirmar a expressão majoritária dos receptores específicos para OVA (Figura 10 – Material e Métodos).

Os linfócitos dos animais positivos foram então isolados do baço e semeados em co-cultivo com DCs-dMO geradas de animais *sham* ou *Vgx* que por sua vez foram previamente carregadas com OVA (conforme descrito no item 4.9). Após 4 dias, a proliferação dos linfócitos foi avaliada por citometria de fluxo e o sobrenadante do cultivo foi coletado para análise de citocinas (Figura 28 – delineamento experimental).

Figura 28 - Esquema ilustrando o delineamento do experiento de proliferação de linfócitos OT-II co-cultivadas com DCs-dMO de animais *Vgx* e *sham*

Legenda: As células precursoras da medula óssea foram geradas em cultura por 7 dias. No 7º dia, as células foram incubadas com OVA por 4 horas e em seguida receberam LPS como estímulo para maturação. Após 24 horas as células foram incubadas em um co-cultivo de linfócitos obtidos de animais OT-II marcados com CFSE. Após 96 horas, as células foram avaliadas quanto a proliferação por citometria de fluxo.

Fonte: CRUZ, 2013.

5.5.1 Resultados

Em todas as razões Linfócitos:DCs, como pode ser observado na Figura 29, foi possível visualizar uma resposta de proliferação. A análise da % de divisão das células mostrou uma proliferação crescente, de acordo com a quantidade de DCs-dMO em cultura (Figura 30). No entanto, não foi possível observar diferenças significantes entre os grupos *sham* e Vgx.

Figura 29 – Curvas de proliferação de linfócitos OT-II que foram co-cultivados com DCs-dMO de animais (A) Vgx e (B) *sham* carregadas com OVA

Legenda: O grupo controle (C) consistiu de DCs-dMO que não foram incubadas com OVA. Nestes histogramas, a razão Linfócitos:DCs é de 100.
Fonte: CRUZ, 2013.

Figura 30 – Histograma representativo da % de divisões de linfócitos OT-II que foram co-cultivados com DCs-dMO carregadas com OVA

Legenda: O grupo controle consistiu de DCs-dMO que não foram incubadas com OVA. A Figura é representativa de 1 experimento (n=10 animais/grupo/experimento). Os valores mostram a média $\pm$ SEM das replicatas de cada animal.

Fonte: CRUZ, 2013.

A Figura 32 mostra os histogramas relativos a concentração das citocinas avaliadas. Pelo método empregado não foram encontrados níveis detectáveis de IL-10 e IL-12 nos sobrenadantes das cultura. O perfil dos gráficos de citocina são condizentes com o perfil do gráfico de proliferação (Figura 30), no qual um aumento da proporção de Linfócitos:DCs, além de gerar uma maior proliferação de células, também leva a um aumento gradual na produção de citocinas.

A análise da produção de IL-6 mostrou uma tendência de maior produção de citocina pelo grupo Vgx, quando comparado ao grupo *sham*, começando discreta na razão celular de 25, aumentando em 50 e se tornando estatisticamente significativa na proporção de 100. A análise do MCP-1 e do TNF- α revelaram um perfil semelhante, embora não tenha sido encontrada diferença estatística significativa entre os grupos. Já os resultados do IFN- γ mostram uma tendência de aumento de produção das citocinas que começa a partir de 5, e pode ser vista também nas proporções de 25 e 100, embora não tenham sido significantes. A proporção de 50, no entanto, revelou uma diferença significativa

entre os grupos estudados.

Figura 31 – Histogramas da concentração de citocinas presentes no sobrenadante do cultivo entre os linfócitos OT-II e as DCs-dMO carregadas com OVA

(Continua)

Legenda: O grupo controle consistiu de DCs-dMO que não foram incubadas com OVA. A Figura é representativa de 1 experimento (n=10 animais/grupo/experimento). Os valores mostram a média $\pm$ SEM das replicatas de cada animal (n=10). N.D. = níveis não detectados. (*) $p<0,05$ em relação ao grupo sham (teste *t* de Student).
Fonte: CRUZ, 2013.

Discussão

6. DISCUSSÃO

Evidências crescentes têm indicado o papel do nervo vago nas respostas imunes, sendo o reflexo anti-inflamatório vagal um mecanismo importante da comunicação neuro-imune na manutenção da homeostase. Particularmente, em determinadas condições inflamatórias, as fibras aferentes do nervo vago levam as informações periféricas da resposta imune ao SNC, que por sua vez envia sinais anti-inflamatórios através das fibras eferentes do vago, culminando na liberação de ACh nestes sítios. A ACh liberada, então, parece ser capaz de regular a função das células imunes (TRACEY, 2002). Especificamente, trabalhos recentes foram capazes de demonstrar a interação do nervo vago com linfócitos, que por sua vez, são capazes de orquestrar outras células imunes, como, por exemplo, os macrófagos (ANDERSSON; TRACEY, 2012).

Em nosso trabalho, resolvemos avaliar uma possível função moduladora do vago diretamente nas DCs, seja em seus marcadores de maturação, ou até mesmo em ensaios funcionais, que pudessem indicar uma possível colaboração do SNP na atividade destas células. Para isso, escolhemos o modelo de vagotomia cervical unilateral (VCU), no qual um dos ramos do nervo vago foi transeccionado, com o objetivo de reduzir a transmissão colinérgica em órgãos periféricos, incluindo a medula óssea e o baço, que foram os órgãos alvo de avaliação de DCs em nossos experimentos. Embora ainda não tenha sido comprovado uma inervação vagal direta nestes órgãos, com algumas evidências mostrando justamente o contrário – como no caso do baço (NANCE; SANDERS, 2007) –, ainda assim é possível especular que a influência do nervo vago não se restrinja aos órgãos que inerva diretamente, visto a importância da integridade deste no reflexo colinérgico anti-inflamatório na endotoxemia (BOROVIKOVA et al., 2000; VIDA et al., 2011), na sepse (VAN WESTERLOO et al., 2005) e na atividade de células T esplênicas (KARIMI et al., 2010).

Além disso, a maioria dos estudos *in vivo* ou *ex vivo* analisaram os efeitos do nervo vago e de drogas agonistas colinérgicas nas células imunes em contextos de respostas inflamatórias normalmente exacerbadas, como é o caso da sepse, da pancreatite e de inflamações intestinais crônicas por exemplo, e raramente em condições “não-inflamatórias”, sem estimulação antigênica microbiana

ou auto-imune. Em nosso estudo, buscamos avaliar as duas situações: com e sem desafio antigênico, pois por um lado o vago poderia exercer uma modulação tônica no controle homeostático do sistema imune, – sem estímulos inflamatórios *in vivo* – em especial no objeto de estudo deste trabalho: as DCs. No entanto, é possível também argumentar que sem um estímulo antigênico o sistema imune não sofra grandes alterações, uma vez que não precisa elaborar uma resposta inflamatória. Por isso, em alguns experimentos nós utilizamos um estímulo antigênico para ativar o sistema imune *in vivo* nos animais parcialmente vagotomizados que foi a imunização com KLH, e subsequentemente avaliamos os parâmetros fenotípicos e funcionais de células provenientes destes animais.

Ainda, em relação à vagotomia, o modelo de VCU foi escolhido, pois a vagotomia subdiafragmática é problemática tanto na execução do procedimento, devido as inúmeras ramificações do vago abaixo do diafragma tornando difícil a transecção de todos os ramos como, ainda, pode confundir a interpretação dos resultados experimentais, uma vez que ela remove tanto as fibras aferentes, como eferentes vagais, o que não ocorre na VCU (HORN; FRIEDMAN, 2005).

As alterações na massa corpórea provocadas no período pós-operatório da vagotomia podem se explicadas pelo envolvimento do nervo com as áreas cerebrais de controle de ingestão alimentar e saciedade. O hipotálamo está relacionado com a regulação da ingestão alimentar, balanço energético e o Sistema Nervoso Autônomo (SNA). O hipotálamo pode ser dividido em duas zonas diferentes, de acordo com suas conexões, sendo que a área lateral do hipotálamo (LHA) pertence à zona do SNA parassimpático e a área medial do hipotálamo, principalmente o núcleo ventromedial (VMH), pertence à zona do SNA simpático (ROZKOWSKA; FONBERG, 1971). A ingestão alimentar é controlada por estes centros. No VMH está localizado o centro da saciedade e na LHA o centro da fome. Estímulos elétricos na LHA aumentam a atividade vagal hepática e diminuem a atividade da inervação esplâncnica, acompanhado de aumento da ingestão alimentar. Por outro lado, a estimulação do VMH aumenta a atividade simpática e reduz os efeitos vagais, provocando intensa hipofagia no animal. Ainda, lesões na LHA causam diminuição da ingestão alimentar, do ganho de peso, perda de tecido adiposo e protéico (ROZKOWSKA; FONBERG, 1971). Enquanto a vagotomia

subdiafragmática leva a deficiências motoras gastrointestinais graves, na VCU, ao contrário, os animais apresentam aumento de ingesta alimentar e ganho de massa a níveis normais pouco tempo após o procedimento. Embora os efeitos colaterais da cirurgia não sejam totalmente controláveis, uma vez que o vago está envolvido em diversos processos fisiológicos, os animais foram acompanhados no período pós-cirúrgico e avaliados de forma geral, tomando-se cuidados para que estes efeitos colaterais pouco interferissem nos parâmetros imunológicos.

De forma a avaliar a resposta imune *in vivo* de camundongos parcialmente vagotomizados frente a imunização, nós realizamos o ensaio da DTH. A DTH é uma reação inflamatória mediada principalmente por linfócitos T de memória e macrófagos infiltrantes no local desafiado com o mesmo antígeno previamente utilizado para a imunização (em nosso caso o KLH com adjuvante de *Freund*). Para que a DTH seja eficientemente estabelecida, a imunização é um processo fundamental. Na imunização, o agente antigênico é inoculado na presença de um adjuvante, que gera uma reação inflamatória local mediada por células da imunidade inata. Uma das populações de células inatas presentes no local desta inflamação são as DCs, que uma vez que entram em contato com o antígeno inoculado, migram para os órgãos linfóides e iniciam as respostas celulares adaptativas antígeno-específicas. Como um de nossos objetivos era avaliar a apresentação antigênica de DCs de animais Vgx, pareceu-nos relevante utilizar a DTH como um modelo de apresentação antigênica *in vivo*.

Embora algumas alterações no perfil das curvas tenham sido observadas, mas sem significância estatística, a conclusão deste experimento foi de que a ausência da inervação vagal íntegra não foi capaz de alterar a resposta da DTH nos camundongos, pois os animais Vgx desenvolveram uma resposta inflamatória semelhante ao do grupo controle. Estes dados vão ao encontro do que foi descrito por (PINHEIRO, 2012), no qual o tratamento com anabasina foi capaz de diminuir o edema nas patas dos camundognos, e também o trabalho de (BOROVIKOVA et al., 2000), no qual o uso do CNI-1493 também foi capaz de reduzir esta resposta inflamatória nas patas, em um mecanismo dependente do nervo vago intacto. De qualquer forma, os antígenos utilizados nestes experimentos foram diferentes do nossos (OVA e carragenina, respectivamente), e os estímulos

colinérgicos também (anabasina e CNI-1943, respectivamente), o que pode explicar parcialmente a diferença nos resultados. Além disso, a DTH é uma medida indireta da atividade de DCs, uma vez que os linfócitos e macrófagos presentes nos sítios inflamatórios também estavam sobre influência da VCU. Desta forma, experimentos posteriores deste trabalho buscaram verificar a apresentação antigênica a partir de outras metodologias.

Recentemente, diversos trabalhos vêm documentando os efeitos biológicos da fumaça de cigarro (VASSALLO e CHEN, 2004; VASSALLO et al., 2005; KROENING et al., 2008; VASSALLO et al., 2008) ou da nicotina sobre as DCs (AICHER et al., 2003; NOURI-SHIRAZI; GUINET 2003; GUINET; YOSHIDA; NOURI-SHIRAZI, 2004; GAO; WAN; GU, 2007; NOURI-SHIRAZI; TINAJERO; GUINET, 2007; GAO et al., 2011;). A nicotina é um dos principais componentes do fumaça do cigarro. Semelhante ao neurotransmissor do nervo vago – a ACh –, a nicotina é capaz de se ligar e ativar receptores do tipo nicotínicos. Estes receptores estão distribuídos ao longo do sistema nervoso central e periférico, e estão envolvidos na transmissão de sinais nas junções neuromusculares e nos gânglios autonômicos. Em adição, estes receptores também são encontrados em algumas células endoteliais (MACKLIN et al., 1998), epiteliais (WANG, Y et al., 2001) e células do sistema imune (DAVIES et al., 1982; KAWASHIMA et al., 2007), incluindo as DCs.

Aicher et al. (2003) demonstraram que a nicotina é capaz de elevar a expressão de moléculas co-estimuladoras em DCs, aumentar a liberação de IL-12 e IL-10 e aumentar a capacidade destas células de ativar linfócitos T. (GAO; WAN; GU, 2007; GAO et al., 2011) também reportaram um papel estimulador da nicotina em DCs, sendo que as DCs tratadas com este agonista colinérgico exibiram efeitos anti-tumorais. Em contrapartida, (NOURI-SHIRAZI; GUINET, 2003) demonstraram que na presença de nicotina, DCs derivadas de monócitos manifestaram capacidades diminuídas de endocitose e fagocitose, produzirem níveis menores de citocinas inflamatórias e uma menor capacidade de estimular células T através de apresentação antigênica. Estudos adicionais demonstraram que a nicotina foi capaz de alterar o desenvolvimento de DCs-dMO, gerando células com fenótipo de DCs semi-maduras que levavam ao desenvolvimento de uma resposta do tipo T_H2 (NOURI-SHIRAZI; TINAJERO; GUINET, 2007). Vassallo et al. (2005) demonstrou

que o extrato da fumaça de cigarro, mas não a nicotina, foi capaz de suprimir a ativação de células T por DCs em uma reação mista de linfócitos.

Em nossos estudos, não encontramos nenhuma alteração nos marcadores de membrana das DCs-dMO de animais Vgx, além disso, as células geradas responderam ao LPS aumentando a expressão de marcadores de maturação, como o MHC-II e o CD80, como pôde ser observado pelo aumento da fluorescência destes marcadores. Podemos concluir com estes resultados que nem a modulação tônica do nervo vago, ou a ativação do sistema imune com um agente antigênico (KLH) em animais parcialmente vagotomizados foram capazes de influir de maneira significativa com a geração das células na medula óssea e a sua subsequente maturação *ex vivo* com LPS.

Contudo, as diferenças de marcadores fenotípicos nem sempre refletem o lado funcional das DCs, sendo que mesmo com os marcadores de membrana inalterados, estas células podem apresentar atributos funcionais alterados, como aumento ou diminuição da endocitose e fagocitose; migração e ativação de células T, como pode ser observado em alguns outros trabalhos (MAESTRONI, 2002; MACIA et al., 2006;).

Neste âmbito, nossa investigação continuou avaliando estas células em abordagens funcionais. Um dos achados inesperados do nosso trabalho foi que a ausência parcial da modulação constitutiva do nervo vago sobre as DCs-dMO foi capaz de diminuir a capacidade de fagocitose destas células no que diz respeito ao número de bactérias fagocitadas nos animais não desafiados indicando um possível efeito de controle do nervo sobre a captura de antígenos pelas DCs geradas na medula óssea em condições sem desafios. No entanto, frente ao estímulo antigênico proporcionado pela imunização com KLH, esta diferença não foi evidenciada talvez porque os animais do grupo *sham* quando desafiados apresentou uma diminuição na quantidade de bactérias fagocitadas e não necessariamente devido à uma mudança na capacidade dos animais vagotomizados onde a intensidade de fagocitose foi semelhante independente se desafiados ou não. Por outro lado, enquanto o desafio foi capaz de modular a fagocitose nos animais *sham*, nos animais vagotomizados este efeito não foi observado, e a possível explicação para tais achados nos parece nebulosa.

Em relação à estimulação da proliferação de células T, que em nosso trabalho foi demonstrada a partir da apresentação de OVA pelas DCs-dMO à linfócitos transgênicos com TCRs específicos para peptídeos derivados desta proteína, não foram encontradas diferenças entre o grupo experimental e o controle, pois em ambos os cultivos os linfócitos proliferaram de acordo com a quantidade de DCs presentes. No entanto, de forma interessante, a produção de citocinas presente neste co-cultivo indicou que houve um aumento significativo de IL-6 e IFN- γ nos co-cultivos de DCs-dMO derivadas de animais Vgx quando comparadas ao do grupo *sham*.

A IL-6 é produzida por células do sistema imune inato, como os macrófagos e DCs, células B, e em menor quantidade, por algumas células T helper CD4⁺ efetoras. Um dos fatores em comum ao conjunto de estímulos que ativam a produção de IL-6 é que eles representam danos teciduais ou estresse (por ex. produtos microbianos, vírus, espécies reativas de oxigênio e outras citocinas inflamatórias). Níveis elevados de IL-6 estão geralmente associados com diversas doenças inflamatórias, no qual esta citocina é um produto secundário das reações inflamatórias e um marcador de inflamação (RINCON, 2012). Nossos resultados não permitiram determinar a implicância exata do aumento da IL-6, uma vez que a proliferação dos linfócitos não foi alterada. No entanto, por si só, a IL-6 não é um fator de crescimento para linfócitos T, mas parece ter outra ação, que é a de promover a sobrevivência de células T ativadas. De fato, a IL-6 pode fornecer sinais antiapoptóticos para células T virgens durante a ativação *in vivo* e *in vitro*, muito provavelmente pela retenção da expressão de *Bcl-2* e da diminuição do receptor Fas (TEAGUE et al., 1997). Além disso, Pasare e Medzhitov (2003) demonstraram que a IL-6 é uma citocina importante no bloqueio da atividade de T_{regs} e da imunossupressão *in vitro*. Os nossos resultados, portanto, indicam que o nervo vago possa estar envolvido na inibição da sustentação de respostas linfoproliferativas, e na manutenção de T_{regs} funcionais, através do controle de citocinas secretadas por DCs, como a IL-6. Todavia, experimentos subsequentes devem ser realizados no sentido de compreender melhor este fenômeno.

O IFN- γ , ao contrário da IL-6, é uma citocina cuja produção está associada mais fortemente aos linfócitos, do que às células mielóides. De fato, os

linfócitos são células altamente secretoras desta citocina, que por sua vez, é conhecida como uma potente ativadora de macrófagos em respostas inflamatórias (BILLIAU; MATTHYS, 2009). Pela capacidade de ativação destas células, o IFN- γ é uma citocina importante no combate a infecções, mas parece estar envolvido também em reações de hipersensibilidade (TOKURIKI et al., 2002; VOCANSON et al., 2006) e respostas auto-imunes, nas quais o IFN- γ parece controlar a tolerância periférica induzindo a expressão de indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) em DCs. A quebra dos substratos desta enzima, por sua vez gera quinureninas, algumas das quais promovem a apoptose de células T. Similarmente, como no caso do aumento da IL-6, é difícil indicar com precisão a relevância biológica da produção do IFN- γ em nosso sistema, uma vez que esta citocina possui diversos alvos em distintas situações. Não obstante, o aumento da produção desta citocina na ausência da inervação colinérgica íntegra pode levar a alterações significativas nas células imunes presentes no microambiente da inflamação. Novamente, experimentos na sequência devem ser realizados para se compreender o papel do vago na regulação destas citocinas no contexto de interação entre as DCs e os linfócitos.

Ainda, é relevante comentar que as dosagens de IL-12 e IL-10, que são citocinas importantes na ativação ou de inibição, respectivamente, de células T, foram realizadas no co-cultivo entre as DCs-dMO com os linfócitos OT-II, que durou 96 horas. No entanto não foram encontrados níveis significantes destas citocinas. Este fato muito provavelmente ocorreu pois, como demonstrado por Langenkamp et al. (2000) e Maestroni (2002), o pico de produção destas citocinas em culturas *ex vivo* acontece aproximadamente 10 horas após a estimulação antigênica e cessa após 24 horas. Experimentos futuros deverão levar este fator em conta em suas realizações.

Como pôde ser visto em nosso trabalho e nos trabalhos citados envolvendo o efeito de agentes colinérgicos sobre as DCs, a relação entre estes agentes colinérgicos e/ou o vago com as DCs ainda não é muito claro e com diversas controvérsias. Visto que os efeitos biológicos da nicotina ou de neurotransmissores é dependente da dose e duração da exposição, estes efeitos controversos podem ser atribuídos a diferenças nos planejamentos experimentais, espécies, duração da exposição e particularmente aos níveis de nicotina e/ou

neurotransmissores em contato com as DCs, uma vez que estas células são finamente controladas no ambiente local por estes fatores, como foi demonstrado neste trabalho de Hu et al. (2012), no qual foram usadas diversas dosagens de nicotina seguidas de LPS ou não, e que acabaram fornecendo desfechos variados nas DCs. A modulação gênica dos receptores colinérgicos contribui ainda mais na explicação destas discrepâncias. Kawashima et al., 2007 mostrou que a exposição curta à nicotina foi capaz de aumentar a expressão do gene *c-fos*, mas a exposição prolongada foi capaz de diminuir a expressão do mRNA para o receptor de acetilcolina nicotínico. Ainda, (PINHEIRO, 2012) demonstrou que o LPS sozinho é capaz de levar a uma diminuição dos níveis de expressão do nAChR α 7 em DCs, no entanto, quando em conjunto com a anabasina, um agonista de receptores nicotínicos, a expressão destes receptores era quase totalmente reestabelecida. Complementar a estes dados Kondo et al. (2010) também mostrou em uma linhagem de DCs estabelecidas – a JawsII –, que o uso de LPS é capaz de diminuir os níveis de expressão de receptores nicotínicos, enquanto aumenta a expressão de moléculas co-estimuladoras.

Enquanto a maioria dos estudos citados foram realizados com DCs-dMO tratadas com agonistas *in vitro* enquanto nosso trabalho foi realizado com DCs-dMO que foram influenciadas pela falta de inervação *in vivo*, tornando difícil as comparações diretas. Ainda, outros mecanismos podem estar envolvidos, como por exemplo, o tempo de recuperação dos animais pós-cirurgia, que pode ser relevante para o reflexo anti-inflamatório, pois foi demonstrado por Ghia, Blennerhassett e Collins (2007) que os efeitos da vagotomia subdiafragmática diminuem ao longo do tempo e acabam sendo compensados por outros mecanismos anti-inflamatórios, como a indução de T_{regs} e a secreção de IL-10. Embora nosso modelo de vagotomia tenha sido diferente, nossos experimentos foram realizados a partir de 1 semana após a vagotomia, portanto é possível que estes mecanismos compensadores já estivessem ativados em nossos camundongos. Além disso, como na VCU um dos ramos cervicais do nervo vago é preservado, não é possível descartar que este ramo ao longo do tempo passe a exercer algumas das funções do ramo transeccionado.

Poder-se-ia inferir que apenas a ativação aguda dos receptores colinérgicos leva a alterações mais evidentes nas DCs, e que a modulação tônica do

vago sobre estas células não provoca efeitos biológicos perceptíveis e sim discretos, só sendo evidenciados em casos de ativação vagal frente a uma potente ativação do sistema imune. No entanto, Karimi et al. (2010) demonstrou que a vagotomia subdiafragmática foi capaz de aumentar a proliferação e produção de citocinas inflamatórias por linfócitos T esplênicos em condições de modulação constitutiva do vago.

A ausência parcial do nervo vago parece favorecer a geração de respostas imunes do tipo T_H1 através das DCs. No entanto, estudos subsequentes devem ser realizados para comprovar se a modulação do nervo vago sobre as DCs é direta ou mediada por outras células imunes intermediárias, como os linfócitos. De qualquer forma, o presente trabalho foi capaz de evidenciar que as DCs também estão sujeitas ao controle do sistema nervoso parassimpático, e que, uma vez moduladas, estas células são capazes de exercer influências sobre outras células do sistema imunológico.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

Serão apresentadas em dois itens, específicas e geral

7.1 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

No presente trabalho, foram realizadas as seguintes observações:

A VCU:

- não alterou a resposta de hipersensibilidade tardia.
- Não foi capaz de influenciar no número de DCs geradas a partir de células precursoras da medula óssea.
- Não alterou a expressão dos marcadores de membrana das DCs-dMO, na presença e ausência de um agente antigênico.
- Diminuiu a fagocitose de *Staphylococcus aureus* por DCs-dMO em condições sem estimulação antigênica.
- Não alterou a proliferação de linfócitos OT-II frente a apresentação antigênica de DCs-dMO incubadas com ovalbumina.
- Aumentou a liberação de IL-6 e IFN- γ no sobrenadante do co-cultivo entre DCs-dMO e linfócitos OT-II.

7.2 CONCLUSÃO GERAL

Os dados obtidos neste trabalho sugerem que a inervação vagal, através da liberação de seu neurotransmissor é capaz de modular certas atividades das células dendríticas, como a fagocitose, a expressão de marcadores de membrana e a produção de citocinas durante a apresentação antigênica aos linfócitos. Visto a sua importância na indução das respostas imunes adaptativas e manutenção da tolerância, seria interessante caracterizar melhor as ações das DCs derivadas de estimulação ou inibição vagais em condições de interações mais isoladas com outras células imunes, trabalho que pretendemos realizar futuramente.

Referências

REFERÊNCIAS

- AGELAKI, S.; TSATSANIS, C.; GRAVANIS, A.; MARGIORIS, A. N. Corticotropin-releasing hormone augments proinflammatory cytokine production from macrophages in vitro and in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 11, p. 6068-74, 2002.
- AICHER, A.; HEESCHEN, C.; MOHAUPT, M.; COOKE, J. P.; ZEIHNER, A. M.; DIMMELER, S. Nicotine strongly activates dendritic cell-mediated adaptive immunity: potential role for progression of atherosclerotic lesions. **Circulation**, v. 107, n. 4, p. 604-11, 2003.
- ALLAN, R. S.; WAITHMAN, J.; BEDOUI, S.; JONES, C. M.; VILLADANGOS, J. A.; ZHAN, Y.; LEW, A. M.; SHORTMAN, K.; HEATH, W. R.; CARBONE, F. R. Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. **Immunity**, v. 25, n. 1, p. 153-62, 2006.
- ANDERSSON, U.; TRACEY, K. J. Neural reflexes in inflammation and immunity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 6, p. 1057-1068, 2012.
- AUFFRAY, C.; FOGG, D. K.; NARNI-MANCINELLI, E.; SENECHAL, B.; TROUILLET, C.; SAEDERUP, N.; LEEMPUT, J.; BIGOT, K.; CAMPISI, L.; ABITBOL, M.; MOLINA, T.; CHARO, I.; HUME, D. A.; CUMANO, A.; LAUVAU, G.; GEISSMANN, F. CX3CR1⁺ CD115⁺ CD135⁺ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 3, p. 595-606, 2009.
- BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y. J.; PULENDRAN, B.; PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v. 18, n. 1, p. 767-811, 2000.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-52, 1998.
- BANKS, W. A. The blood-brain barrier in psychoneuroimmunology. **Neurologic Clinics**, v. 24, n. 3, p. 413-9, 2006.
- BARBUTO, J. A.; ENSINA, L. F.; NEVES, A. R.; BERGAMI-SANTOS, P.; LEITE, K. R.; MARQUES, R.; COSTA, F.; MARTINS, S. C.; CAMARA-LOPES, L. H.; BUZAID, A. C. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy : CII**, v. 53, n. 12, p. 1111-8, 2004.
- BARNDEN, M. J.; ALLISON, J.; HEATH, W. R.; CARBONE, F. R. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. **Immunology and Cell Biology**, v. 76, n. 1, p. 34-40, 1998.

BELLINGER, D. L.; LORTON, D.; HAMILL, R. W.; FELTEN, S. Y.; FELTEN, D. L. Acetylcholinesterase staining and choline acetyltransferase activity in the young adult rat spleen: lack of evidence for cholinergic innervation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 7, n. 3, p. 191-204, 1993.

BERNIK, T. R.; FRIEDMAN, S. G.; OCHANI, M.; DIRAIMO, R.; SUSARLA, S.; CZURA, C. J.; TRACEY, K. J. Cholinergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion. **Journal of Vascular Surgery**, v. 36, n. 6, p. 1231-6, 2002.

BERTHOUD, H. R.; NEUHUBER, W. L. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. **Autonomic Neuroscience : Basic & Clinical**, v. 85, n. 1-3, p. 1-17, 2000.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 1, p. 64-102, 1996.

BIANCHI, M.; BLOOM, O.; RAABE, T.; COHEN, P. S.; CHESNEY, J.; SHERRY, B.; SCHMIDTMAYEROVA, H.; CALANDRA, T.; ZHANG, X.; BUKRINSKY, M.; ULRICH, P.; CERAMI, A.; TRACEY, K. J. Suppression of proinflammatory cytokines in monocytes by a tetravalent guanylylhydrazone. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 3, p. 927-36, 1996.

BILATE, A. M.; LAFAILLE, J. J. Induced CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in immune tolerance. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 733-58, 2012.

BLUTHÉ, R. M.; WALTER, V.; PARNET, P.; LAYÉ, S.; LESTAGE, J.; VERRIER, D.; POOLE, S.; STENNING, B. E.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences. Série III, Sciences de la Vie**, v. 317, n. 6, p. 499-503, 1994.

BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Interferon-gamma: a historical perspective. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 20, n. 2, p. 97-113, 2009.

BLASIUS, A. L.; GIURISATO, E.; CELLA, M.; SCHREIBER, R. D.; SHAW, A. S.; COLONNA, M. Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 5, p. 3260-5, 2006.

BOROVIKOVA, L. V.; IVANOVA, S.; ZHANG, M.; YANG, H.; BOTCHKINA, G. I.; WATKINS, L. R.; WANG, H.; ABUMRAD, N.; EATON, J. W.; TRACEY, K. J. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, p. 458-462, 2000b.

BOROVIKOVA, L. V.; IVANOVA, S.; NARDI, D.; ZHANG, M.; YANG, H.; OMBRELLINO, M.; TRACEY, K. J. Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-

mediated suppression of acute inflammation. **Autonomic Neuroscience : Basic & Clinical**, v. 85, n. 1-3, p. 141-7, 2000a.

BRATTON, B. O.; MARTELLI, D.; MCKINLEY, M. J.; TREVAKS, D.; ANDERSON, C. R.; MCALLEN, R. M. Neural regulation of inflammation: no neural connection from the vagus to splenic sympathetic neurons. **Experimental Physiology**, v. 97, n. 11, p. 1180-5, 2012.

BUIJS, R. M.; VAN DER VLIET, J.; GARIDOU, M. L.; HUITINGA, I.; ESCOBAR, C. Spleen vagal denervation inhibits the production of antibodies to circulating antigens. **PloS One**, v. 3, n. 9, p. e3152, 2008.

BURNSTOCK, G. Autonomic neurotransmission: 60 years since sir Henry Dale. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 49, p. 1-30, 2009.

CANO, G.; SVED, A. F.; RINAMAN, L.; RABIN, B. S.; CARD, J. P. Characterization of the central nervous system innervation of the rat spleen using viral transneuronal tracing. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 439, n. 1, p. 1-18, 2001.

CHEN, X. H.; ITOH, M.; SUN, W.; MIKI, T.; TAKEUCHI, Y. Localization of sympathetic and parasympathetic neurons innervating pancreas and spleen in the cat. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 59, n. 1-2, p. 12-6, 1996.

COHEN, P. S.; NAKSHATRI, H.; DENNIS, J.; CARAGINE, T.; BIANCHI, M.; CERAMI, A.; TRACEY, K. J. CNI-1493 inhibits monocyte/macrophage tumor necrosis factor by suppression of translation efficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 9, p. 3967-71, 1996.

CUESTA, M. C.; QUINTERO, L.; PONS, H.; SUAREZ-ROCA, H. Substance P and calcitonin gene-related peptide increase IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha secretion from human peripheral blood mononuclear cells. **Neurochemistry International**, v. 40, n. 4, p. 301-6, 2002.

CUNNINGHAM, A. J.; LAFFERTY, K. J. A Simple, Conservative Explanation of the H-2 Restriction of Interactions Between Lymphocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 6, n. 1-2, p. 1-6, 1977.

DALE, H. H.; DUDLEY, H. W. The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse. **The Journal of Physiology**, v. 68, n. 2, p. 97-123, 1929.

DANTZER, R.; WOLLMAN, E. E.; VITKOVIC, L.; YIRMIYA, R. Cytokines, stress, and depression. Conclusions and perspectives. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 461, p. 317-29, 1999.

DAVIES, B. D.; HOSS, W.; LIN, J. P.; LIONETTI, F. Evidence for a noncholinergic nicotine receptor on human phagocytic leukocytes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 23-31, 1982.

DE JONGE, W. J.; ULLOA, L. The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, n. 7, p. 915-29, 2007.

DE JONGE, W. J.; VAN DER ZANDEN, E. P.; THE, F. O.; BIJLSMA, M. F.; VAN WESTERLOO, D. J.; BENNINK, R. J.; BERTHOUD, H. R.; UEMATSU, S.; AKIRA, S.; VAN DEN WIJNGAARD, R. M.; BOECKXSTAENS, G. E. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. **Nature Immunology**, v. 6, n. 8, p. 844-51, 2005.

DEN HAAN, J. M.; LEHAR, S. M.; BEVAN, M. J. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 12, p. 1685-96, 2000.

DUDZIAK, D.; KAMPHORST, A. O.; HEIDKAMP, G. F.; BUCHHOLZ, V. R.; TRUMPFHELLER, C.; YAMAZAKI, S.; CHEONG, C.; LIU, K.; LEE, H. W.; PARK, C. G.; STEINMAN, R. M.; NUSSENZWEIG, M. C. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. **Science**, v. 315, n. 5808, p. 107-11, 2007.

EDELSON, B. T.; KC, W.; JUANG, R.; KOHYAMA, M.; BENOIT, L. A.; KLEKOTKA, P. A.; MOON, C.; ALBRING, J. C.; ISE, W.; MICHAEL, D. G.; BHATTACHARYA, D.; STAPPENBECK, T. S.; HOLTZMAN, M. J.; SUNG, S. S.; MURPHY, T. L.; HILDNER, K.; MURPHY, K. M. Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8 α + conventional dendritic cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 4, p. 823-36, 2010.

ELFTMAN, M. D.; NORBURY, C. C.; BONNEAU, R. H.; TRUCKENMILLER, M. E. Corticosterone impairs dendritic cell maturation and function. **Immunology**, v. 122, n. 2, p. 279-90, 2007.

EZZELARAB, M.; THOMSON, A. W. Tolerogenic dendritic cells and their role in transplantation. **Seminars in Immunology**, v. 23, n. 4, p. 252-63, 2011.

FAMM, K.; LITT, B.; TRACEY, K. J.; BOYDEN, E. S.; SLAOUI, M. Drug discovery: A jump-start for electroceuticals. **Nature**, v. 496, n. 7444, p. 159-161, 2013.

FINKELMAN, F. D.; LEES, A.; BIRNBAUM, R.; GAUSE, W. C.; MORRIS, S. C. Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. **Journal of Immunology**, v. 157, p. 1406-1414, 1996.

FOGG, D. K.; SIBON, C.; MILED, C.; JUNG, S.; AUCOUTURIER, P.; LITTMAN, D. R.; CUMANO, A.; GEISSMANN, F. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. **Science**, v. 311, n. 5757, p. 83-7, 2006.

GALEA, I.; BECHMANN, I.; PERRY, V. H. What is immune privilege (not)? **Trends in Immunology**, v. 28, n. 1, p. 12-8, 2007.

GAO, F. G.; LI, H. T.; LI, Z. J.; GU, J. R. Nicotine stimulated dendritic cells could achieve anti-tumor effects in mouse lung and liver cancer. **Journal of Clinical Immunology**, v. 31, n. 1, p. 80-8, 2011.

GAO, F. G.; WAN DA, F.; GU, J. R. Ex vivo nicotine stimulation augments the efficacy of therapeutic bone marrow-derived dendritic cell vaccination. **Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 13, n. 12, p. 3706-12, 2007.

GHIA, J. E.; BLENNERHASSETT, P.; KUMAR-ONDIVEERAN, H.; VERDU, E. F.; COLLINS, S. M. The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model. **Gastroenterology**, v. 131, n. 4, p. 1122-30, 2006.

GHIA, J. E.; BLENNERHASSETT, P.; COLLINS, S. M. Vagus nerve integrity and experimental colitis. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 293, n. 3, p. G560-7, 2007.

GINHOUX, F.; LIU, K.; HELFT, J.; BOGUNOVIC, M.; GRETER, M.; HASHIMOTO, D.; PRICE, J.; YIN, N.; BROMBERG, J.; LIRA, S. A.; STANLEY, E. R.; NUSSENZWEIG, M.; MERAD, M. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 13, p. 3115-30, 2009.

GOEHLER, L. E.; RELTON, J. K.; DRIPPS, D.; KIECHLE, R.; TARTAGLIA, N.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Vagal paraganglia bind biotinylated interleukin-1 receptor antagonist: a possible mechanism for immune-to-brain communication. **Brain Research Bulletin**, v. 43, n. 3, p. 357-64, 1997.

GOEHLER, L. E.; GAYKEMA, R. P.; NGUYEN, K. T.; LEE, J. E.; TILDERS, F. J.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Interleukin-1beta in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? **The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, n. 7, p. 2799-806, 1999.

GOEHLER, L. E.; LYTE, M.; GAYKEMA, R. P. Infection-induced viscerosensory signals from the gut enhance anxiety: implications for psychoneuroimmunology. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 6, p. 721-6, 2007.

GROUARD, G.; RISSOAN, M. C.; FILGUEIRA, L.; DURAND, I.; BANCHEREAU, J.; LIU, Y. J. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 6, p. 1101-11, 1997.

GROUX, H.; BIGLER, M.; DE VRIES, J. E.; RONCAROLO, M. G. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 1, p. 19-29, 1996.

GROVES, D. A.; BROWN, V. J. Vagal nerve stimulation: a review of its applications and potential mechanisms that mediate its clinical effects. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 493-500, 2005.

GRUNDY, D. Sensory signals from the gastrointestinal tract. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 41 Suppl 1, p. S7-9, 2005.

GUARINI, S.; ALTAVILLA, D.; CAINAZZO, M. M.; GIULIANI, D.; BIGIANI, A.; MARINI, H.; SQUADRITO, G.; MINUTOLI, L.; BERTOLINI, A.; MARINI, R.; ADAMO, E. B.; VENUTI, F. S.; SQUADRITO, F. Efferent vagal fibre stimulation blunts nuclear factor-kappaB activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock. **Circulation**, v. 107, n. 8, p. 1189-94, 2003.

GUARINI, S.; CAINAZZO, M. M.; GIULIANI, D.; MIONI, C.; ALTAVILLA, D.; MARINI, H.; BIGIANI, A.; GHIARONI, V.; PASSANITI, M.; LEONE, S.; BAZZANI, C.; CAPUTI, A. P.; SQUADRITO, F.; BERTOLINI, A. Adrenocorticotropin reverses hemorrhagic shock in anesthetized rats through the rapid activation of a vagal anti-inflammatory pathway. **Cardiovascular Research**, v. 63, n. 2, p. 357-65, 2004.

GUINET, E.; YOSHIDA, K.; NOURI-SHIRAZI, M. Nicotinic environment affects the differentiation and functional maturation of monocytes derived dendritic cells (DCs). **Immunology Letters**, v. 95, n. 1, p. 45-55, 2004.

HEATH, W. R.; CARBONE, R. Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. **Nature Immunology**, v. 10, n. 12, p. 1237-44, 2009.

HENCH, P. S.; KENDALL, E. C.; SLOCUMB, C. H.; POLLEY, H. F. Effects of cortisone acetate and pituitary ACTH on rheumatoid arthritis, rheumatic fever and certain other conditions. **Archives of Internal Medicine**, v. 85, n. 4, p. 545-666, 1950.

HILKENS, C. M. U.; ISAACS, J. D. Tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: where are we now? **Clinical and Experimental Immunology**, v. 172, n. 2, p. 148-57, 2013.

HORN, C. C.; FRIEDMAN, M. I. Thoracic cross-over pathways of the rat vagal trunks. **Brain Research**, v. 1060, n. 1-2, p. 153-161, 2005.

HU, S. X.; SUI, H. X.; JIN, H. J.; NI, X. Y.; LIU, X. X.; XUE, M. Q.; ZHANG, Y.; GAO, F. G. Lipopolysaccharide and dose of nicotine determine the effects of nicotine on murine bone marrow-derived dendritic cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 5, n. 4, p. 1005-10, 2012.

HUME, D. A. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. **Journal of Immunology**, v. 181, n. 9, p. 5829-35, 2008.

HUNZEKER, J. T.; ELFTMAN, M. D.; MELLINGER, J. C.; PRINCIOTTA, M. F.; BONNEAU, R. H.; TRUCKENMILLER, M. E.; NORBURY, C. C. A marked reduction in priming of cytotoxic CD8+ T cells mediated by stress-induced glucocorticoids involves multiple deficiencies in cross-presentation by dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 186, n. 1, p. 183-94, 2011.

HUSTON, J. M.; OCHANI, M.; ROSAS-BALLINA, M.; LIAO, H.; OCHANI, K.; PAVLOV, V. A.; GALLOWITSCH-PUERTA, M.; ASHOK, M.; CZURA, C. J.; FOXWELL, B.; TRACEY, K. J.; ULLOA, L. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 7, p. 1623-8, 2006.

JOHNSON, J. D.; CAMPISI, J.; SHARKEY, C. M.; KENNEDY, S. L.; NICKERSON, M.; FLESHNER, M. Adrenergic receptors mediate stress-induced elevations in extracellular Hsp72. **Journal of Applied Physiology**, v. 99, n. 5, p. 1789-95, 2005.

JOSEFOWICZ, S. Z.; LU, L. F.; RUDENSKY, A. Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 531-64, 2012.

KADOWAKI, N.; ANTONENKO, S.; LAU, J. Y.; LIU, Y. J. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 2, p. 219-26, 2000.

KAMPHORST, A. O.; GUERMONPREZ, P.; DUDZIAK, D.; NUSSENZWEIG, M. C. Route of antigen uptake differentially impacts presentation by dendritic cells and activated monocytes. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 6, p. 3426-35, 2010.

KAPSENBERG, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. **Nature Reviews. Immunology**, v. 3, n. 12, p. 984-93, 2003.

KARIMI, K.; BIENENSTOCK, J.; WANG, L.; FORSYTHE, P. The vagus nerve modulates CD4+ T cell activity. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 2, p. 316-23, 2010.

KAWASHIMA, K.; YOSHIKAWA, K.; FUJII, Y. X.; MORIWAKI, Y.; MISAWA, H. Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells. **Life Sciences**, v. 80, p. 2314-2319, 2007.

KENNEDY, S. L.; NICKERSON, M.; CAMPISI, J.; JOHNSON, J. D.; SMITH, T. P.; SHARKEY, C.; FLESHNER, M. Splenic norepinephrine depletion following acute stress suppresses in vivo antibody response. **Journal of Neuroimmunology**, v. 165, n. 1-2, p. 150-60, 2005.

KINGSTON, D.; SCHMID, M. A.; ONAI, N.; OBATA-ONAI, A.; BAUMJOHANN, D.; MANZ, M. G. The concerted action of GM-CSF and Flt3-ligand on in vivo dendritic cell homeostasis. **Blood**, v. 114, n. 4, p. 835-43, 2009.

KONDO, Y.; TACHIKAWA, E.; OHTAKE, S.; KUDO, K.; MIZUMA, K.; KASHIMOTO, T.; IRIE, Y.; TAIRA, E. Inflammatory cytokines decrease the expression of nicotinic acetylcholine receptor during the cell maturation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 333, n. 1-2, p. 57-64, 2010.

KONSMAN, J. P.; VIGUES, S.; MACKERLOVA, L.; BRISTOW, A.; BLOMQVIST, A. Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 472, n. 1, p. 113-29, 2004.

KROENING, P. R.; BARNES, T. W.; PEASE, L.; LIMPER, A.; KITA, H.; VASSALLO, R. Cigarette smoke-induced oxidative stress suppresses generation of dendritic cell IL-12 and IL-23 through ERK-dependent pathways. **Journal of Immunology**, v. 181, n. 2, p. 1536-47, 2008.

LANGENKAMP, A.; MESSI, M.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. **Nature Immunology**, v. 1, n. 4, p. 311-6, 2000.

LI, T.; ZUO, X.; ZHOU, Y.; WANG, Y.; ZHUANG, H.; ZHANG, L.; ZHANG, H.; XIAO, X. The vagus nerve and nicotinic receptors involve inhibition of HMGB1 release and early pro-inflammatory cytokines function in collagen-induced arthritis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 30, n. 2, p. 213-20, 2010.

LIU, K.; VICTORA, G. D.; SCHWICKERT, T. A.; GUERMONPREZ, P.; MEREDITH, M. M.; YAO, K.; CHU, F. F.; RANDOLPH, G. J.; RUDENSKY, A. Y.; NUSSENZWEIG, M. in vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. **Science**, v. 324, n. 5925, p. 392-7, 2009.

LUTZ, M. B.; KUKUTSCH, N.; OGILVIE, A. L.; RÖSSNER, S.; KOCH, F.; ROMANI, N.; SCHULER, G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. **Journal of Immunological Methods**, v. 223, n. 1, p. 77-92, 1999.

LUYER, M. D.; GREVE, J. W.; HADFOUNE, M.; JACOBS, J. A.; DEJONG, C. H.; BUURMAN, W. A. Nutritional stimulation of cholecystokinin receptors inhibits inflammation via the vagus nerve. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 8, p. 1023-9, 2005.

MACIA, L.; DELACRE, M.; ABBOUD, G.; OUK, T. S.; DELANOYE, A.; VERWAERDE, C.; SAULE, P.; WOLOWCZUK, I. Impairment of dendritic cell functionality and steady-state number in obese mice. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 9, p. 5997-6006, 2006.

MACKLIN, K. D.; MAUS, A. D.; PEREIRA, E. F.; ALBUQUERQUE, E. X.; CONTI-FINE, B. M. Human vascular endothelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 287, n. 1, p. 435-9, 1998.

MADDEN, K. S.; SANDERS, V. M.; FELTEN, D. L. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 35, p. 417-48, 1995.

MAESTRONI, G. J. Dendritic cell migration controlled by alpha 1b-adrenergic receptors. **Journal of Immunology**, v. 165, n. 12, p. 6743-7, 2000.

MAESTRONI, G. J. Short exposure of maturing, bone marrow-derived dendritic cells to norepinephrine: impact on kinetics of cytokine production and Th development. **Journal of Neuroimmunology**, v. 129, n. 1-2, p. 106-14, 2002.

MAESTRONI, G. J.; MAZZOLA, P. Langerhans cells beta 2-adrenoceptors: role in migration, cytokine production, Th priming and contact hypersensitivity. **Journal of Neuroimmunology**, v. 144, n. 1-2, p. 91-9, 2003.

MAHNKE, K.; SCHMITT, E.; BONIFAZ, L.; ENK, A. H.; JONULEIT, H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. **Immunology & Cell Biology**, v. 80, p. 477-483, 2002.

MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Cytokines for psychologists: implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. **Psychological Review**, v. 105, p. 83-107, 1998.

MCGREAL, E. P.; MARTINEZ-POMARES, L.; GORDON, S. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. **Molecular Immunology**, v. 41, n. 11, p. 1109-21, 2004.

MELLMAN, I.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. **Cell**, v. 106, n. 3, p. 255-8, 2001.

MEREDITH, M. M.; LIU, K.; DARRASSE-JEZE, G.; KAMPHORST, A. O.; SCHREIBER, H. A.; GUERMONPREZ, P.; IDOYAGA, J.; CHEONG, C.; YAO, K. H.; NIEC, R. E.; NUSSENZWEIG, M. C. Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 6, p. 1153-65, 2012.

MIONI, C.; BAZZANI, C.; GIULIANI, D.; ALTAVILLA, D.; LEONE, S.; FERRARI, A.; MINUTOLI, L.; BITTO, A.; MARINI, H.; ZAFFE, D.; BOTTICELLI, A. R.; IANNONE, A.; TOMASI, A.; BIGIANI, A.; BERTOLINI, A.; SQUADRITO, F.; GUARINI, S. Activation of an efferent cholinergic pathway produces strong protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. **Critical Care Medicine**, v. 33, n. 11, p. 2621-8, 2005.

MUCCIOLI, M.; PATE, M.; OMOSEBI, O.; BENENCIA, F. Generation and labeling of murine bone marrow-derived dendritic cells with Qdot nanocrystals for tracking studies. **Journal of Visualized Experiments JoVE**. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3197051&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>, 2011.

MURRAY, P. J. The primary mechanism of the IL-10-regulated antiinflammatory response is to selectively inhibit transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 24, p. 8686-91, 2005.

NAIK, S. H.; SATHE, P.; PARK, H. Y.; METCALF, D.; PROIETTO, A. I.; DAKIC, A.; CAROTTA, S.; O'KEEFFE, M.; BAHLO, M.; PAPENFUSS, A.; KWAK, J. Y.; WU, L.; SHORTMAN, K. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. **Nature Immunology**, v. 8, n. 11, p. 1217-26, 2007.

NANCE, D. M.; BURNS, J. Innervation of the spleen in the rat: evidence for absence of afferent innervation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 3, n. 4, p. 281-90, 1989.

NANCE, D. M.; SANDERS, V. M. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 6, p. 736-45, 2007.

NOURI-SHIRAZI, M.; GUINET, E. Evidence for the immunosuppressive role of nicotine on human dendritic cell functions. **Immunology**, v. 109, p. 365-373, 2003.

NOURI-SHIRAZI, M.; TINAJERO, R.; GUINET, E. Nicotine alters the biological activities of developing mouse bone marrow-derived dendritic cells (DCs). **Immunology Letters**, v. 109, n. 2, p. 155-64, 2007.

O'SULLIVAN, B. J.; THOMAS, R. CD40 ligation conditions dendritic cell antigen-presenting function through sustained activation of NF-kappaB. **Journal of Immunology**, v. 168, n. 11, p. 5491-8, 2002.

OHL, L.; MOHAUPT, M.; CZELOTH, N.; HINTZEN, G.; KIAFARD, Z.; ZWIRNER, J.; BLANKENSTEIN, T.; HENNING, G.; FÖRSTER, R. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. **Immunity**, v. 21, n. 2, p. 279-288, 2004.

OHSHIMA, Y.; YANG, L. P.; UCHIYAMA, T.; TANAKA, Y.; BAUM, P.; SERGERIE, M.; HERMANN, P.; DELESPESE, G. OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4(+) T cells into high IL-4-producing effectors. **Blood**, v. 92, n. 9, p. 3338-45, 1998.

ONAI, N.; OBATA-ONAI, A.; SCHMID, M. A.; OHTEKI, T.; JARROSSAY, D.; MANZ, M. G. Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and

conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. **Nature Immunology**, v. 8, n. 11, p. 1207-16, 2007.

PALUCKA, A. K.; UENO, H.; FAY, J.; BANCHEREAU, J. Dendritic cells: a critical player in cancer therapy? **Journal of Immunotherapy**, v. 31, n. 9, p. 793-805, 1997.

PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, n. 4, p. 420-31, 2002.

PASARE, C.; MEDZHITOV, R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. **Science**, v. 299, n. 5609, p. 1033-6, 2003.

PAVLOV, V. A.; OCHANI, M.; YANG, L. H.; GALLOWITSCH-PUERTA, M.; OCHANI, K.; LIN, X.; LEVI, J.; PARRISH, W. R.; ROSAS-BALLINA, M.; CZURA, C. J.; LAROSA, G. J.; MILLER, E. J.; TRACEY, K. J.; AL-ABED, Y. Selective alpha7-nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia an severe sepsis. **Critical Care Medicine**. v. 35, n. 4, p. 1139-44, 2007.

PAVLOV, V. A.; PARRISH, W. R.; ROSAS-BALLINA, M.; OCHANI, M.; PUERTA, M.; OCHANI, K.; CHAVAN, S.; AL-ABED, Y.; TRACEY, K. J. Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, n. 1, p. 41-5, 2009.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. The cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain, Behavior, and Immunity**. v. 19, n. 6, p. 493-9, 2005

PIASSA-FILHO, G. M. **Avaliação da proliferação de linfócitos T CD8+ por células dendríticas desafiadas com pró-oxidantes**. 2010. 91f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto Butantan, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

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

POOLEY, J. L.; HEATH, W. R.; SHORTMAN, K. Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 9, p. 5327-30, 2001.

PULLAN, R. D.; RHODES, J.; GANESH, S.; MANI, V.; MORRIS, J. S.; WILLIAMS, G. T.; NEWCOMBE, R. G.; RUSSELL, M.; FEYERABEND, C.; THOMAS, F.; SAWE, U. Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 12, p. 811-5, 1994.

QIN, Z.; NOFFZ, G.; MOHAUPT, M.; BLANKENSTEIN, T. Interleukin-10 Prevents Dendritic Cell Accumulation and Vaccination with Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Gene-Modified Tumor Cells. **The Journal of Immunology**, v. 159, n. 2, p. 770-6, 1997.

QUAH, B. J. C.; PARISH, C. R. The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. **Journal of Visualized Experiments JoVE**. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3185625&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>, 2010.

QUAN, N.; WHITESIDE, M.; HERKENHAM, M. Time course and localization patterns of interleukin-1beta messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. **Neuroscience**, v. 83, n. 1, p. 281-93, 1998.

QURESHI, O. S.; ZHENG, Y.; NAKAMURA, K.; ATTRIDGE, K.; MANZOTTI, C.; SCHMIDT, E. M.; BAKER, J.; JEFFERY, L. E.; KAUR, S.; BRIGGS, Z.; HOU, T. Z.; FUTTER, C. E.; ANDERSON, G.; WALKER, L. S.; SANSOM, D. M. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. **Science**, v. 332, n. 6029, p. 600-3, 2011.

REIZIS, B.; COLONNA, M.; TRINCHIERI, G.; BARRAT, F.; GILLIET, M. Plasmacytoid dendritic cells: one-trick ponies or workhorses of the immune system? **Nature Reviews. Immunology**, v. 11, n. 8, p. 558-65, 2011.

RINCON, M. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. **Trends in Immunology**, v. 33, n. 11, p. 571-7, 2012.

ROMEO, H. E.; TIO, D. L.; RAHMAN, S. U.; CHIAPPELLI, F.; TAYLOR, A. N. The glossopharyngeal nerve as a novel pathway in immune-to-brain communication: relevance to neuroimmune surveillance of the oral cavity. **Journal of Neuroimmunology**, v. 115, n. 1-2, p. 91-100, 2001.

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

ROSAS-BALLINA, M.; GOLDSTEIN, R. S.; GALLOWITSCH-PUERTA, M.; YANG, L.; VALDÉS-FERRER, S. I.; PATEL, N. B.; CHAVAN, S.; AL-ABED, Y.; YANG, H.; TRACEY, K. J. The selective alpha7 agonist GTS-21 attenuates cytokine production in human whole blood and human monocytes activated by ligands for TLR2, TLR3, TLR4, TLR9, and RAGE. **Molecular Medicine**, v. 15, n. 7-8, p. 195-202, 2009.

ROZKOWSKA, E.; FONBERG, E. The effects of ventromedial hypothalamic lesions on food intake and alimentary instrumental conditioned reflexes in dogs. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 31, n. 4, p. 35 1-64, 1971.

SADIS, C.; TESKE, G.; STOKMAN, G.; KUBJAK, C.; CLAESSEN, N.; MOORE, F.; LOI, P.; DIALLO, B.; BARVAIS, L.; GOLDMAN, M.; FLORQUIN, S.; LE MOINE, A. Nicotine protects kidney from renal ischemia/reperfusion injury through the cholinergic anti-inflammatory pathway. **PloS One**, v. 2, n. 5, p. e469, 2007.

SAINT-MEZARD, P.; CHAVAGNAC, C.; BOSSET, S.; IONESCU, M.; PEYRON, E.; KAISERLIAN, D.; NICOLAS, J. F.; BÉRARD, F. Psychological stress exerts an adjuvant effect on skin dendritic cell functions in vivo. **Journal of Immunology**, v. 171, n. 8, p. 4073-80, 2003.

SALOMON, B.; BLUESTONE, J. A. LFA-1 interaction with ICAM-1 and ICAM-2 regulates Th2 cytokine production. **Journal of Immunology**, v. 161, n. 10, p. 5138-42, 1998.

SATPATHY, A. T.; KC, W.; ALBRING, J. C.; EDELSON, B. T.; KRETZER, N. M.; BHATTACHARYA, D.; MURPHY, T.L.; MURPHY, K. M. Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 6, p. 1135-52, 2012.

SCHILTZ, J. C.; SAWCHENKO, P. E. Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 13, p. 5606-5618, 2002.

SCHLENNER, S. M.; MADAN, V.; BUSCH, K.; TIETZ, A.; LÄUFLE, C.; COSTA, C.; BLUM, C.; FEHLING, H. J.; RODEWALD, H. R. Fate mapping reveals separate origins of T cells and myeloid lineages in the thymus. **Immunity**, v. 32, n. 3, p. 426-36, 2010.

SCHMID, M.A.; KINGSTON, D.; BODDUPALLI, S.; MANZ, M. G. Instructive cytokine signals in dendritic cell lineage commitment. **Immunological Reviews**, v. 234, n. 1, p. 32-44, 2010.

SCHULER, G.; ROMANI, N.; STEINMAN, R M. A comparison of murine epidermal Langerhans cells with spleen dendritic cells. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 85, n. 1 Suppl, p. 99s-106s, 1985.

SCHÜLER, T.; BLANKENSTEIN, T. Naive CD8(+) but not CD4(+) T cells induce maturation of dendritic cells. **Journal of Molecular Medicine**, v. 80, n. 8, p. 533-541, 2002.

SEIFFERT, K.; HOSOI, J.; TORII, H.; OZAWA, H.; DING, W.; CAMPTON, K.; WAGNER, J. A.; GRANSTEIN, R. D. Catecholamines inhibit the antigen-presenting capability of epidermal Langerhans cells. **Journal of Immunology**, v. 168, n. 12, p. 6128-35, 2002.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 10, n. 2, p. 230-1, 1998.

STEINMAN, R. M.; GUTCHINOV, B.; WITMER, M. D.; NUSSENZWEIG, M. C. Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 157, n. 2, p. 613-27, 1983.

STEINMAN, R. M.; ADAMS, J. C.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 141, n. 4, p. 804-20, 1975.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 137, n. 5, p. 1142-62, 1973.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 139, n. 2, p. 380-97, 1974.

STEINMAN, R. M.; LUSTIG, D. S.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 139, n. 6, p. 1431-45, 1974.

STEINMAN, R. M.; HAWIGER, D.; NUSSENZWEIG, M. C. Tolerogenic dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 685-711, 2003.

STERNBERG, E. M. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. **Nature Reviews. Immunology**, v. 6, n. 4, p. 318-28, 2006.

TEAGUE, T. K.; MARRACK, P.; KAPPLER, J. W.; VELLA, A. T. IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis. **Journal of Immunology**, v. 158, n. 12, p. 5791-6, 1997.

THAYER, J. F.; STERNBERG, E. M. Neural aspects of immunomodulation: focus on the vagus nerve. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 8, p. 1223-8, 2010.

TODMAN, D. "Autonomic" nervous system. **European Neurology**, v. 60, n. 4, p. 215-6, 2008.

TOKURIKI, A.; SEO, N.; ITO, T.; KUMAKIRI, M.; TAKIGAWA, M.; TOKURA, Y. Dominant expression of CXCR3 is associated with induced expression of IP-10 at hapten-challenged sites of murine contact hypersensitivity: a possible role for interferon-gamma-producing CD8(+) T cells in IP-10 expression. **Journal of Dermatological Science**, v. 28, n. 3, p. 234-41, 2002.

TRACEY, K. J. Suppression of TNF and other proinflammatory cytokines by the tetravalent guanlylhydrazone CNI-1493. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 397, p. 335-43, 1998.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, p. 853-859, 2002.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews. Immunology**, v. 3, n. 2, p. 133-46, 2003.

TRUCKENMILLER, M. E.; PRINCIOTTA, M. F.; NORBURY, C. C.; BONNEAU, R. H. Corticosterone impairs MHC class I antigen presentation by dendritic cells via reduction of peptide generation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 160, n. 1-2, p. 48-60, 2005.

VAN MAANEN, M. A.; LEBRE, M. C.; VAN DER POLL, T.; LAROSA, G. J.; ELBAUM, D.; VERVOORDELDONK, M. J.; TAK, P. P. Stimulation of nicotinic acetylcholine receptors attenuates collagen-induced arthritis in mice. **Arthritis and Rheumatism**, v. 60, n. 1, p. 114-22, 2009a.

VAN MAANEN, M. A.; STOOF, S. P.; VAN DER ZANDEN, E. P.; DE JONGE, W. J.; JANSSEN, R. A.; FISCHER, D. F.; VANDEGHINSTE, N.; BRYN, R.; VERVOORDELDONK, M. J.; TAK, P. P. The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor on fibroblast-like synoviocytes and in synovial tissue from rheumatoid arthritis patients: a possible role for a key neurotransmitter in synovial inflammation. **Arthritis and Rheumatism**, v. 60, n. 5, p. 1272-81, 2009b.

VAN MAANEN, M. A.; STOOF, S. P.; LAROSA, G. J.; VERVOORDELDONK, M. J.; TAK, P. P. Role of the cholinergic nervous system in rheumatoid arthritis: aggravation of arthritis in nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit gene knockout mice. **Annals of The Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 9, p. 1717-23, 2010.

VAN MAANEN, M. A.; VERVOORDELDONK, M. J.; TAK, P. P. The cholinergic anti-inflammatory pathway: towards innovative treatment of rheumatoid arthritis. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 5, n. 4, p. 229-32, 2009c.

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. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 12, p. 2138-2148, 2005.

VAN WESTERLOO, D. J.; GIEBELEN, I. A.; FLORQUIN, S.; BRUNO, M. J.; LAROSA, G. J.; ULLOA, L.; TRACEY, K. J.; VAN DER POLL, T. The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice. **Gastroenterology**, v. 130, n. 6, p. 1822-30, 2006.

VASSALLO, R.; TAMADA, K.; LAU, J. S.; KROENING, P. R.; CHEN, L. Cigarette smoke extract suppresses human dendritic cell function leading to preferential induction of Th-2 priming. **Journal of Immunology**, v. 175, p. 2684-2691, 2005.

VASSALLO, R.; KROENING, P. R.; PARAMBIL, J.; KITA, H. Nicotine and oxidative cigarette smoke constituents induce immune-modulatory and pro-inflammatory dendritic cell responses. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 12, p. 3321-9, 2008.

VASSALLO, R.; CHEN, L. Selective suppression of dendritic cell functions by cigarette smoke extract. **Chest**, v. 125, n. 5 Suppl, p. 107S, 2004.

VIDA, G.; PEÑA, G.; DEITCH, E. A.; ULLOA, L. $\alpha 7$ -cholinergic receptor mediates vagal induction of splenic norepinephrine. **Journal of Immunology**, v. 186, n. 7, p. 4340-6, 2011a.

VIDA, G.; PEÑA, G.; KANASHIRO, A.; THOMPSON-BONILLA MDEL, R.; PALANGE, D.; DEITCH, E. A.; ULLOA, L. $\beta 2$ -Adrenoreceptors of regulatory lymphocytes are essential for vagal neuromodulation of the innate immune system. **FASEB Journal : Official Publication of The Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 25, n. 12, p. 4476-85, 2011b.

VILLA, P.; MEAZZA, C.; SIRONI, M.; BIANCHI, M.; ULRICH, P.; BOTCHKINA, G.; TRACEY, K. J.; GHEZZI, P. Protection against lethal polymicrobial sepsis by CNI-1493, an inhibitor of pro-inflammatory cytokine synthesis. **Innate Immunity**, v. 4, n. 3, p. 197-204, 1997.

VITKOVIC, L.; KONSMAN, J. P.; BOCKAERT, J.; DANTZER, R.; HOMBURGER, V.; JACQUE, C. Cytokine signals propagate through the brain. **Molecular Psychiatry**, v. 5, n. 6, p. 604-15, 2000.

VOCANSON, M.; HENNINO, A.; CLUZEL-TAILHARDAT, M.; SAINT-MEZARD, P.; BENETIERE, J.; CHAVAGNAC, C.; BERARD, F.; KAISERLIAN, D.; NICOLAS, J. F. CD8+ T cells are effector cells of contact dermatitis to common skin allergens in mice. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 4, p. 815-20, 2006.

VREMEC, D.; ZORBAS, M.; SCOLLAY, R.; SAUNDERS, D. J.; ARDAVIN, C. F.; WU, L.; SHORTMAN, K. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 176, n. 1, p. 47-58, 1992.

VREMEC, D.; POOLEY, J.; HOCHREIN, H.; WU, L.; SHORTMAN, K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. **Journal of Immunology**, v. 164, n. 6, p. 2978-86, 2000.

WALDBURGER, J. M.; BOYLE, D. L.; PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J.; FIRESTEIN, G. S. Acetylcholine regulation of synoviocyte cytokine expression by the $\alpha 7$ nicotinic receptor. **Arthritis and Rheumatism**, v. 58, n. 11, p. 3439-49, 2008.

WANG, H.; YU, M.; OCHANI, M.; AMELLA, C. A.; TANOVIC, M.; SUSARLA, S.; LI, J. H.; WANG, H.; YANG, H.; ULLOA, L.; AL-ABED, Y.; CZURA, C. J.; TRACEY, K. J. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 384-8, 2003.

WANG, Y.; PEREIRA, E. F.; MAUS, A. D.; OSTLIE, N. S.; NAVANEETHAM, D.; LEI, S.; ALBUQUERQUE, E. X.; CONTI-FINE, B. M. Human bronchial epithelial and

endothelial cells express $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 60, n. 6, p. 1201-9, 2001.

WASKOW, C.; LIU, K.; DARRASSE-JÈZE, G.; GUERMONPREZ, P.; GINHOUX, F.; MERAD, M.; SHENGELIA, T.; YAO, K.; NUSSENZWEIG, M. The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. **Nature Immunology**, v. 9, n. 6, p. 676-83, 2008.

WATKINS, L.R.; WIERTELAK, E. P.; GOEHLER, L. E.; SMITH, K. P.; MARTIN, D.; MAIER, S. F. Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. **Brain Research**, v. 654, n. 1, p. 15-26, 1994.

WATKINS, L. R.; GOEHLER, L. E.; RELTON, J. K.; TARTAGLIA, N.; SILBERT, L.; MARTIN, D.; MAIER, S. F. Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication. **Neuroscience Letters**, v. 183, p. 27-31, 1995.

YEBOAH, M. M.; XUE, X.; DUAN, B.; OCHANI, M.; TRACEY, K. J.; SUSIN, M.; METZ, C. N. Cholinergic agonists attenuate renal ischemia-reperfusion injury in rats. **Kidney International**, v. 74, n. 1, p. 62-9, 2008.

YONG, X.; XIAO, Y. F.; LUO, G.; HE, B.; LÜ, M. H.; HU, C. J.; GUO, H.; YANG, S. M. Strategies for enhancing vaccine-induced CTL antitumor immune responses. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2012, p. 605045, 2012.

YOSHIDA, Y.; KUMAR, A.; KOYAMA, Y.; PENG, H.; ARMAN, A.; BOCH, J. A.; AURON, P. E. Interleukin 1 activates STAT3/nuclear factor-kappaB cross-talk via a unique TRAF6- and p65-dependent mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 3, p. 1768-76, 2004.

ZELLER, J. C.; PANOSKALTSIS-MORTARI, A.; MURPHY, W. J.; RUSCETTI, F. W.; NARULA, S.; RONCAROLO, M. G.; BLAZAR, B. R. Induction of CD4⁺ T cell alloantigen-specific hyporesponsiveness by IL-10 and TGF-beta. **Journal of Immunology**, v. 163, n. 7, p. 3684-91, 1999.

ZHANG, J.; RAPER, A.; SUGITA, N.; HINGORANI, R.; SALIO, M.; PALMOWSKI, M. J.; CERUNDOLO, V.; CROCKER, P. R. Characterization of Siglec-H as a novel endocytic receptor expressed on murine plasmacytoid dendritic cell precursors. **Blood**, v. 107, n. 9, p. 3600-3608, 2006.