UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE IMUNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

**Estimulação vagal aferente e transcraniana reduzem a inflamação articular
por meio de um arco neural central similar dependente do aumento da
atividade simpática: o papel fundamental do locus cerúleos**

Gabriel Shimizu Bassi

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto/USP, como parte das exigências para a obtenção
do Título de Doutor em Ciências. Área: Imunologia

Ribeirão Preto - SP

- 2016 -

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE IMUNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

**Estimulação vagal aferente e transcraniana reduzem a inflamação articular
por meio de um arco neural central similar dependente do aumento da
atividade simpática: o papel fundamental do locus cerúleos**

Gabriel Shimizu Bassi

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto/USP, como parte das exigências para a obtenção
do Título de Doutor em Ciências. Área: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

Co-Orientador: Dr. Alexandre Kanashiro

Ribeirão Preto - SP

- 2016 -

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Bassi, Gabriel Shimizu

Estimulação vagal aferente e transcraniana reduzem a inflamação articular por meio de um arco neural central similar dependente do aumento da atividade simpática: o papel fundamental do locus cerúleos/ Gabriel Shimizu Bassi; orientador Thiago Mattar Cunha.

--Ribeirão Preto, 2016

321p: il. ; 30cm

Tese de doutorado, apresentado à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP –
Área de concentração: Imunologia

Orientador: Thiago Mattar Cunha

Co-Orientador: Alexandre Kanashiro

1. Nervo vago; 2. Artrite Reumatóide; 3. Simpático; 4. PVN. 5. LC; 6. Córtex Parietal; 7. Noradrenalina; 8. Inflamação; 9. Neutrófilo; Estimulação Cortical

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: BASSI, Gabriel Shimizu

Título: Estimulação vagal aferente e transcraniana reduzem a inflamação articular por meio de um arco neural central similar dependente do aumento da atividade simpática: o papel fundamental do locus cerúleos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP,
como parte das exigências para a obtenção do Título de Doutor em
Ciências. Área: Imunologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha família, em especial à minha esposa Ana Carla Medeiros Morato de Aquino

Agradeço aos professores e técnicos que propiciaram a execução desse trabalho:

(Prof.) Dr. Alexandre Kanashiro

Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha (Depto Farmacologia – FMRP/USP)

Prof. Dr. Gustavo Batista Menezes (Depto Morfologia – ICB/UFMG)

Prof. Dr. Hélio Cesar Salgado (Depto Fisiologia – FMRP/USP)

Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes (Depto Farmacologia – FMRP/USP)

Prof. Dr. Luis Ulloa (Depto Cirurgia – Universidade Rutgers, Nova Jérsei, EUA)

Prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco (Depto. Fisiologia – FMRP/USP)

Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha (Depto. Farmacologia – FMRP/USP)

Ana Cristina Silva Ferreira (Depto Imunologia)

Ana Kátia dos Santos (Depto Farmacologia)

Eleni Luiza Tamburus Gomes (Depto Farmacologia)

Flávio Del Vecchio (Depto Fisiologia)

Giuliana Bertozi Francisco (Depto. Farmacologia)

Ieda Regina Santos (Depto Farmacologia)

Jaci Airton Castania (Depto Fisiologia)

José Waldik Ramon (Depto Farmacologia)

Marco Antônio Ribeiro da Silva (Depto Farmacologia)

Sérgio Roberto Rosa (Depto Farmacologia)

Tadeu Franco Vieira (Depto Farmacologia)

Aos antigos mestres que me iniciaram e me incentivaram para o mundo científico

Prof. Dr. Luciano Serafim Neder (Depto Patologia – FMRP/USP)

Prof. Dr. Manoel Jorge Nobre do Espírito Santo (Depto Psicologia e Educação – FFCLRP/USP)

Prof. Dr. Marcus Lira Brandão (Depto Psicologia e Educação – FFCLRP/USP)

Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra (Depto. Farmacologia – FMRP/USP)

Aos colegas de laboratório que não irei citar para evitar um injusto ostracismo dos não citados

Abstract

There is no cure for rheumatoid arthritis affecting over 1% of the world population between 35 e 65 years old suffering chronic inflammation causing pain, swelling, stiffness, degeneration e joint deformities. Disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) are expensive e immunosuppressive, increasing the risk of severe infections e malignancies. Here, we analyzed the potential of the vagus nerve to control experimental arthritic inflammation. Our results indicate that the afferent vagus nerve controls arthritic joint inflammation by activating specific sympatho-excitatory brain areas, such as the paraventricular hypothalamic nucleus (PVN) e the locus coeruleus (LC). PVN or LC stimulation decreased articular inflammation, but only LC integrity was necessary for vagal control of arthritic inflammation. Cortical electrical stimulation above the parietal cortex activated LC e PVN, mimicked vagal activation but induced a better control of arthritic joint inflammation. These results suggest a neuroimmune brain map to control side-specific lateral arthritic joint inflammation without noticeable side effects.

Key words: 1. Vagus nerve; 2. Rheumatoid arthritis; 3. Sympathetic; 4. PVN; 5. LC; 6; Parietal cortex; 7. Norepinephrine; 8. Inflammation; 9. Neutrophil; 10. Cortical stimulation

Resumo

A artrite reumatóide é uma doença inflamatória crônica, sem cura, que afeta cerca de 1% da população mundial entre 35 e 65 anos, cujos sinais e sintomas incluem dor, edema, rigidez, degeneração e deformidades articulares. O atual tratamento da artrite reumatóide consiste no uso de drogas anti-reumáticas modificadores de doença (DMARDs), porém são compostos caros e imunossupressivos que podem elevar o risco de infecções graves e malignidades. No presente estudo, analisamos o nervo vago como potencial imunomodulador da inflamação que ocorre na artrite reumatóide experimental. Nossos resultados indicam que a estimulação vagal aferente controla a inflamação articular por meio da ativação de áreas encefálicas simpatoexcitatórias, tais como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e o locus coeruleus (LC). A estimulação do PVN ou do LC diminui a inflamação na articulação, mas somente a integridade do LC foi obrigatória para o controle vagal da inflamação na artrite. A estimulação elétrica cortical direcionada para o córtex parietal ativou o LC e o PVN, mimetizando a ativação vagal, porém induziu um melhor controle da inflamação. Esses resultados sugerem a existência de um mapa encefálico neuroimune capaz de controlar a artrite sem causar efeitos colaterais observáveis.

Palavras-Chave: 1. Nervo vago; 2. Artrite Reumatóide; 3. Simpático; 4. PVN. 5. LC; 6. Córtex Parietal; 7. Noradrenalina; 8. Inflamação; 9. Neutrófilo; Estimulação Cortical

Lista de Abreviações Principais

ADX	adrenalectomia
CCMS	complexo ganglionar celíaco-mesentérico superior
Cg	córtex cingulado
Contra	contralateral
cVNX	vagotomia cervical
sVNX	vagotomia subdiafragmática
dB	decibéis
DMN	núcleo motor dorsal do vago
EEC	estimulação elétrica cortical
EEG	eletroencefalograma
EFBA	exploração do final do braço aberto
ENV	estimulação do nervo vago
ENVH	estimulação do nervo vago de alta intensidade (20 Hz, 0.1 ms, 3 V)
ENVL	estimulação do nervo vago de baixa intensidade (5 Hz, 0.1 ms, 1 V)
HPA	hipotálamo-hipófise-adrenal
Hz	hertz
ICAM	molécula de adesão intercelular
IL	interleucina
LC	locus coeruleus
LCE	labirinto em cruz elevado
NA	noradrenalina
NTS	núcleo do trato solitário
PAG	matéria cinzenta periaqueductal
Ipsi	ipsilateral
Pir	córtex piriforme
PVN	núcleo paraventricular do hipotálamo
SIMPX	simpatectomia
SPX	esplenectomia
TNF	fator de necrose tumoral

Lista de Figuras

<i>Figura 1. Análise comparativa ilustrativa entre joelho normal e artrítico</i>	23
<i>Figura 2. Citocinas e sua influência na inflamação.....</i>	31
<i>Figura 3. Compostos produzidos e atividades exercidas pelo neutrófilo na mediação da inflamação.</i>	33
<i>Figura 4. Cascata de adesão leucocitária.....</i>	35
<i>Figura 5. Efeito dos neutrófilos na artrite reumatóide.....</i>	38
<i>Figura 6. Terminações simpáticas e os componentes do eixo HPA.....</i>	42
<i>Figura 7. Organização básica da parte periférica do sistema nervoso autônomo.....</i>	46
<i>Figura 8. Localização da origem dos neurônios pré-ganglionares na medula espinal.....</i>	48
<i>Figura 9. Origem real dos pares cranianos.....</i>	49
<i>Figura 10. Localização dos sistemas parassimpático e simpático.....</i>	51
<i>Figura 11. Origem da inervação dos gânglios paravertebrais e medula adrenal.....</i>	53
<i>Figura 12. Características neuroanatômicas do CCMS.....</i>	55
<i>Figura 13. Anatomia macroscópica do nervo vago.....</i>	57
<i>Figura 14. Anatomia do nervo vago subdiafragmático.....</i>	59
<i>Figura 15. Localização dos órgãos circunventriculares.....</i>	62
<i>Figura 16. Localização do sistema linfático cerebral.....</i>	64
<i>Figura 17. Inervação do timo pelo nervo vago.....</i>	66
<i>Figura 18. O Reflexo Inflamatório.....</i>	70
<i>Figura 19. A ENV aferente influencia a atividade simpática.....</i>	77
<i>Figura 20. A ENV aumenta os níveis séricos de catecolaminas.....</i>	80

<i>Figura 21. Efeito da imunização na resposta da atividade neuronal.....</i>	<i>93</i>
<i>Figura 22. Indução de c-Fos no encéfalo em relação à intensidade inflamatória.....</i>	<i>94</i>
<i>Figura 23. Localização do NTS</i>	<i>98</i>
<i>Figura 24. Principais projeções ascendentes originais no NTS</i>	<i>99</i>
<i>Figura 25. Localização do PVN.....</i>	<i>101</i>
<i>Figura 26. Projeções do NTS para o PVN ativadas por um estímulo inflamatório .</i>	<i>103</i>
<i>Figura 27. Localização do LC.....</i>	<i>106</i>
<i>Figura 28. O LC e a atividade simpática periférica</i>	<i>108</i>
<i>Figura 29. Interação das estruturas supramedulares a partir de um estímulo inflamatório periférico</i>	<i>110</i>
<i>Figura 30. Hipótese dos mecanismos centrais de controle da inflamação</i>	<i>113</i>
<i>Figura 31. Procedimento de exposição e dissecação do nervo vago direito em ratos Wistar</i>	<i>118</i>
<i>Figura 32. Bloqueio farmacológico do nervo vago</i>	<i>120</i>
<i>Figura 33. Procedimento de esplenectomia em ratos Wistar.....</i>	<i>122</i>
<i>Figura 34. Procedimento de corte do ramo celíaco do nervo vago em ratos Wistar</i>	<i>124</i>
<i>Figura 35. Eletrodo de estimulação e sua aplicação no nervo vago</i>	<i>127</i>
<i>Figura 36. Modelo de equipamento de estimulação AVS T-1MIC.....</i>	<i>133</i>
<i>Figura 37. Modelo da câmera térmica Multi- Purpose Thermal Imager NV 4010..</i>	<i>133</i>
<i>Figura 38. Localização e estética de implantação dos eletrodos corticais em ratos</i>	<i>135</i>
<i>Figura 39. Esquema de montagem e utilização do capilar de sílica</i>	<i>137</i>
<i>Figura 40. Procedimento de coleta do líquido sinovial.....</i>	<i>141</i>
<i>Figura 41. Labirinto em Cruz Elevado.....</i>	<i>144</i>

<i>Figura 42. Exemplos de categorias comportamentais analisadas no labirinto em cruz elevado.....</i>	<i>147</i>
<i>Figura 43. Obtenção de neutrófilos a partir da medula óssea de ratos.....</i>	<i>151</i>
<i>Figura 44. Montagem e funcionamento da câmara de Boyden.</i>	<i>153</i>
<i>Figura 45. A vagotomia cervical agrava o processo inflamatório articular</i>	<i>163</i>
<i>Figura 46. A ENV melhora o padrão inflamatório articular</i>	<i>164</i>
<i>Figura 47. A ENV reduz a adesão e rolamento de leucócitos no endotélio sinovial.</i>	<i>165</i>
<i>Figura 48. A ENV diminui os níveis de citocinas inflamatórias articulares</i>	<i>166</i>
<i>Figura 49. A ENV reduz os níveis de ICAM-1 sinovial.</i>	<i>166</i>
<i>Figura 50. A intensidade de estimulação do nervo vago interfere no processo inflamatório</i>	<i>168</i>
<i>Figura 51. O efeito anti-inflamatório da ENV é de amplo espectro.....</i>	<i>170</i>
<i>Figura 52. O efeito anti-inflamatório da ENV não depende de estruturas neuroimunes clássica</i>	<i>171</i>
<i>Figura 53. O efeito anti-inflamatório da ENV depende do sistema nervoso simpático</i>	<i>172</i>
<i>Figura 54. A ENV aferente reduz a inflamação articular</i>	<i>173</i>
<i>Figura 57. O efeito anti-inflamatório da ENV aferente não depende de estruturas neuroimunes clássicas</i>	<i>174</i>
<i>Figura 56. A ENV aumenta a expressão de c-Fos em áreas encefálicas envolvidas no controle simpático.....</i>	<i>175</i>
<i>Figura 57. A estimulação elétrica do LC ou do PVN reduz a inflamação articular</i>	<i>177</i>
<i>Figura 58. A estimulação elétrica do LC ou d PVN não altera o comportamento dos animais</i>	<i>178</i>

<i>Figura 59. O bloqueio do LC, mas não do PVN, inibe o efeito anti-inflamatório da ENV</i>	179
<i>Figura 60. A ENV reduz a temperatura cutânea</i>	180
<i>Figura 61. A ENV aumenta a quantidade de noradrenalina articular</i>	181
<i>Figura 62. A ENV reduz a inflamação via ativação simpática local</i>	182
<i>Figura 63. A estimulação da cadeia simpática (Simp ES) reduz a inflamação articular.</i>	183
<i>Figura 64. A ENV reduz a inflamação articular por meio da liberação local de noradrenalina</i>	184
<i>Figura 65. A ENV reduz a inflamação articular via ativação de receptores β-adrenérgicos locais</i>	185
<i>Figura 66. A ENV induz o aumento de c-Fos em áreas corticais</i>	186
<i>Figura 67. A EEC aumenta a expressão de c-Fos no PVN e no LC</i>	188
<i>Figura 68. Co-localização digital da imunomarcacão de c-Fos na ENV e EEC</i>	190
<i>Figura 69. Co-localização da imunomarcacão de c-Fos na ENV e EEC em cortes coronais do encéfalo</i>	191
<i>Figura 70. Co-localização da imunomarcacão de c-Fos na ENV e EEC em cortes sagitais do encéfalo</i>	192
<i>Figura 71. A EEC melhora os parâmetros articulares inflamatórios</i>	193
<i>Figura 72. A EEC reduz a inflamação articular via modulação simpática local</i>	194
<i>Figura 73. A EEC não altera o comportamento de ratos</i>	195
<i>Figura 74. A EEC não induz alterações no EEG</i>	196
<i>Figura 75. A EEC não induz lesões macroscópicas locais</i>	197
<i>Figura 76. A EEC não aumenta a expressão de GFAP no local de estimulação</i>	198
<i>Figura 77. A EEC não induz a expressão de FluoroJade no tecido neuronal</i>	199

<i>Figura 78. A EEC não induz a expressão de ATF3 no tecido neuronal.....</i>	<i>201</i>
<i>Figura 79. Alterações cardíacas induzidas pela ENV de diferentes intensidades</i>	<i>207</i>
<i>Figura 80. Gráfico da modulação da atividade simpática pela ENV.....</i>	<i>209</i>
<i>Figura 81. O Reflexo Inflamatório Central</i>	<i>216</i>

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1. Papel do TNF na AR.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabela 2. Hipóteses da comunicação entre os sistema imune e neuronal</i>	<i>64</i>
<i>Tabela 3. Estudos neuroanatômicos sobre a conexão entre o nervo vago e o gânglio celíaco.....</i>	<i>73</i>
<i>Tabela 4. Estudos de neurotraçamento sobre a conexão entre o nervo vago e o gânglio celíaco.....</i>	<i>75</i>
<i>Tabela 5. Relação dos estudos da esplenectomia na modulação da resposta imune..</i>	<i>83</i>
<i>Tabela 6. Relação dos estudos da vagotomia sobre a modulação da resposta febril. .</i>	<i>86</i>
<i>Tabela 7. O Efeito da vagotomia sobre a resposta imune</i>	<i>88</i>
<i>Tabela 8. A ENV e o aumento da expressão de c-Fos no encéfalo</i>	<i>91</i>
<i>Tabela 9. Expressão da proteína c-Fos no encéfalo após uma resposta imune periférica</i>	<i>95</i>
<i>Tabela 10. Coordenadas estereotáxicas do PVN e do LC</i>	<i>130</i>
<i>Tabela 11. Escores experimentais da articulação fêmur-tibial.</i>	<i>140</i>

Sumário

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Aspectos clínicos da artrite reumatóide	22
1.2. Fatores genéticos envolvidos na artrite reumatóide	24
1.3. Fatores hormonais envolvidos na artrite reumatóide	25
1.4. Fatores ambientais envolvidos na artrite reumatóide	25
1.5.1 Fator de Necrose Tumoral (TNF)	26
1.5.2 Interleucina 1 (IL-1)	27
1.5.3 Interleucina-6 (IL-6)	28
1.6. Neutrófilos e o processo inflamatório	32
1.6.1 Papel dos neutrófilos na artrite reumatóide	36
1.7. A História das Interações Mente-Corpo	39
1.7.1 A fisiologia como ciência natural	39
1.7.2 O surgimento da Psiconeuroimunologia	41
1.8. O sistema nervoso autônomo	44
1.8.1 Organização anatômica do sistema nervoso autônomo	44
1.8.2 Divisão anatômica do sistema nervoso autônomo	45
1.8.3. Organização anatômica do gânglio simpático	52
1.9. Anatomia do nervo vago	56
1.8.4. Porções cervical e torácica do nervo vago	58
1.8.5. Porção abdominal do nervo vago	58
1.10. Neuroanatomia e neurofisiologia da resposta imune	60
1.10.1 Respostas fisiológicas durante a resposta imune	60
1.10.2 Mecanismos neurais da resposta imune periférica	60
1.10.3 O papel do nervo vago na ativação do eixo neuro-imune	65
1.10.4 A Via Colinérgica Anti-inflamatória (VCA)	68
1.11. A VCA Revista: críticas ao atual modelo	71
1.11.2 Estudos de neurotraçamento	74
1.11.3 Estudos Neurofisiológicos	76

1.11.5.	A atividade simpática na inflamação	84
1.12.	Limitações dos Modelos de Inflamação Sistêmica na VCA.....	84
1.12.1.	Processos inflamatórios de alta intensidade não dependem do NV para ativar o reflexo inflamatório.....	84
1.12.2.	Via neuroimune simpática	89
1.13.	Uma Nova Possível Via Neural Para o Reflexo Inflamatório	90
1.13.1.	Estruturas neurais centrais ativadas durante a ENV	90
1.13.2.	Estruturas neurais centrais ativadas durante o processo inflamatório	92
1.13.3.	A Influência do Sistema Nervoso Central (SNC) na Resposta Imune Periférica	96
1.13.4.	O Núcleo do Trato Solitário	96
1.13.5.	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo	100
1.13.6.	Locus Coeruleus	104
2.	HIPÓTESE EXPERIMENTAL	112
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	115
3.1.	Animais	115
3.2.	Compostos Utilizados	115
3.3.	Compostos utilizadas para marcação imunofluorescente e imunohistoquímica.....	116
3.4.	Procedimentos Cirúrgicos	116
3.4.1.	Canulação da artéria femoral	116
3.4.2.	Exposição e dissecação do nervo vago.....	117
3.4.3.	Vagotomia cervical (VNXCerv) – cirúrgica	119
3.4.4.	Vagotomia cervical (VNXCerv) – farmacológica.....	119
3.4.5.	Esplenectomia (SPX).....	121
3.4.6.	Remoção do ramo celíaco do nervo vago (sVNX).....	123
3.4.7.	Adrenalectomia (ADX)	125
3.4.8.	Simpatectomia (SIMPX)	125

3.4.9.	Cirurgia de estimulação do nervo vago (ENV) em animais anestesiados	125
3.4.10.	Cirurgia de estimulação da cadeia simpática lombar	128
3.4.11.	Cirurgia de estimulação do nervo vago (ENV)	128
3.4.12.	Cirurgia esterotáxica.....	128
3.5.	Equipamentos para Estimulação e Análise dos Registros	131
3.5.1.	Eletrodos externos para estimulação	131
3.5.2.	Eletrodos internos para estimulação neuronal.....	131
3.5.3.	Equipamentos de análise cardiovascular	131
3.5.4.	Equipamento de estimulação	131
3.5.5.	Equipamento para análise de temperatura da cauda.....	132
3.5.6.	Equipamento de captura e análise do eletroencefalograma (EEG)	134
3.6.	Injeção de compostos	136
3.7.	Modelo de Inflamação induzido por Zimosan	138
3.8.	Análise dos parâmetros inflamatórios	138
3.8.1.	Edema articular.....	138
3.8.2.	Escore experimental da articulação	139
3.8.3.	Migração de neutrófilos para a articulação.....	139
3.8.4.	Adesão e rolamento de leucócitos no endotélio sinovial.....	142
3.9.	Teste Comportamental - Labirinto em Cruz Elevado.....	142
3.10.	Procedimentos de Análise de Proteínas Articulares	148
3.10.1.	Quantificação de citocinas inflamatórias articulares por ELISA	148
3.10.2.	Quantificação de noradrenalina articular por ELISA	149
3.10.3.	Quantificação de ICAM-1 sinovial por Western-Blott.....	149
3.11.	Procedimentos <i>in vitro</i>	150
3.11.1.	Isolamento de neutrófilos da medula óssea	150
3.11.2.	Quimiotaxia de neutrófilos	152
3.12.	Procedimentos de Análise Histológica.....	154
3.12.1.	Coloração por Nissl: locais de microinjeção e eletroestimulação:	154

3.12.2.	Imunohistoquímica: análise da expressão de c-Fos encefálica	154
3.12.3.	Imunofluorescência: análise da expressão de GFAP.....	156
3.12.4.	Imunofluorescência: análise da expressão de ATF3	157
3.12.5.	Histofluorescência: análise da expressão de FluoroJade.....	158
3.13.	Microscopia e Análise dos Cortes	160
3.14.	Análise Estatística	160
4.	RESULTADOS.....	163
4.1.	A vagotomia cervical aumenta a migração de neutrófilos para a articulação fêmur-tibial.	163
4.2.	A estimulação do nervo vago reduz o padrão inflamatório articular.....	164
4.3.	A ativação neuronal central é essencial para o controle vagal da inflamação articular	173
4.4.	O efeito anti-inflamatório da ENV depende da ativação simpática local	180
4.6.	A estimulação elétrica cortical mimetiza os efeitos da expressão de c-Fos encefálica induzida pela ENV.....	186
4.7.	A EEC controlou a inflamação articular no modelo de artrite.....	193
5.	DISCUSSÃO	204
6.	CONCLUSÃO	215
7.	REFERÊNCIAS	218
8.	ANEXOS	Erro! Indicador não definido.

INTRODUÇÃO

**KEEP
CALM
AND
DO
SCIENCE**

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos clínicos da artrite reumatóide

A artrite reumatóide (AR) é uma poliartropatia autoimune e de caráter inflamatório. Estudos epidemiológicos mostram que a AR afeta 0,5 a 1% da população mundial e principalmente indivíduos entre 35 e 65 anos (Lawrence et al. 1998, Alamanos e Drosos 2005). No Brasil, a AR acomete 0.2% a 1% da população adulta (30 e 60 anos) (Marques-Neto et al. 1993), afetando 3 vezes mais mulheres que homens (Symmons et al. 1994, ACR-Guidelines 1996, Laurindo et al. 2002). Além disso, a constante inflamação causada pela AR pode aumentar significativamente os índices de morbidade, principalmente em indivíduo adultos-jovens, incapacitando-os de realizar atividades de vida diária e profissionais, gerando impactos significativos na vida do paciente e altos custos econômicos e sociais para o Estado (ACR-Guidelines 1996, Feldmann et al. 1996).

De um ponto de vista clínico, a AR é caracterizada por uma artropatia periférica e simétrica derivada de intenso processo inflamatório mediado principalmente pelo influxo de células do sistema imune para o espaço sinovial levando à deposição de fibrina, formação de *pannus* e consequentes deformidades estruturais (Fleming et al. 1976, Dularay et al. 1988, Kitsis e Weissmann 1991, Koopman 2001) (Figura 1). Apesar da etiologia da AR ser ainda desconhecida, vários estudos mostram o envolvimento de fatores genéticos, ambientais, infecciosos e hormonais.

Figura 1. Análise comparativa ilustrativa entre joelho normal e artrítico. Figura esquemática da representação de um corte longitudinal comparando um joelho normal (esquerda) e um acometido pela artrite reumatóide (direita). Adaptado de Feldmann, 1995.

1.2. Fatores genéticos envolvidos na artrite reumatóide

Desde a década de 1970 a associação entre fatores genéticos e a susceptibilidade à AR já era observada e estudada em diversas populações. Em 1976, Stastny mostrou que linfócitos de diferentes pacientes com AR não reagiam entre si, sugerindo que ambos expressavam antígenos de histocompatibilidade (HLA) semelhantes. Posteriormente, em 1978, Stastny mostrou que 70% dos pacientes acometidos pela AR de origem caucasiana expressavam um marcador comum em seus linfócitos, o HLA-DR1 (na época conhecido como antígeno Ia4 associado ao HLA-Dw4), encontrado no cromossomo humano 6p21 (Stastny 1978). Porém, essa associação foi infrutífera quando estudada em outras populações, tais como indianos, coreanos e judeus ashkenazis (Ollier e Thomson 1992, Lee et al. 2009), propondo que outros antígenos HLA poderiam estar envolvidos.

Em 1987, estudos mostraram que o locus HLA-DRB1 (o qual codifica a cadeia β do MHC II) poderia estar associado à susceptibilidade à AR, visto codificar uma sequência comum de aminoácidos da fenda de ligação ao antígeno (epitopo compartilhado) na cadeia DRB1, a qual poderia estar envolvida na apresentação de auto-peptídeos antigênicos (Gregersen et al. 1987). De fato, outros estudos imunogenéticos utilizando diferentes populações humanas mostraram que cinco alelos HLA estão fortemente associados à incidência da AR: DRB1*0401, DRB*0404, DRB*0101, DRB*0405 e DRB1*1402, sendo que os três primeiros estão mais associados à susceptibilidade à AR em pacientes de origem caucasóide, o DRB1*0405 em pacientes de origem asiática, e o último em pacientes oriundos dos índios da América do Norte (Nichol e Woodrow 1981, Schiff et al. 1982, Ohta et al. 1982, Sanchez et al. 1990, Willkens et al. 1991, Pile et al. 1992). Em outro estudo utilizando gêmeos finlandeses e britânicos, estimou-se que fatores genéticos contribuem somente em 50% para a

incidência de AR (MacGregor et al. 2000), e os outros 50% restantes estariam associados a outros fatores, tais como ambientais, imunológicos e hormonais.

1.3. Fatores hormonais envolvidos na artrite reumatoide

De fato, mulheres acometidas por doenças autoimunes apresentam uma maior imunorreatividade antigênica, maior produção de imunoglobulinas e anticorpos específicos quando comparadas às suas contrapartes, sugerindo o possível envolvimento de hormônios esteróides na incidência da AR (Zandman-Goddard et al. 2007, Fairweather et al. 2008). Além disso, estudos mostraram associação entre menarca precoce e irregularidades menstruais ao risco de desenvolvimento de doenças autoimunes, tais como lúpus e AR (Karlson et al. 2004, Costenbader et al. 2007). Corroborando esse fato, homens artríticos possuem níveis significativamente mais baixos de testosterona que seus correlatos não afetados (Spector et al. 1988). Porém, numa revisão escrita por Lockshin, o autor mostrou que é incorreto combinar todas as doenças autoimunes em uma construção mecanística simples, visto que o tempo de indução, intervenção, prevenção e tratamento difere entre as doenças, e que outras variáveis, além da genética e hormonal, são indispensáveis (Lockshin 2007).

1.4. Fatores ambientais envolvidos na artrite reumatóide

Há uma forte correlação entre fatores ambientais e a incidência de AR. Tabagismo (Stolt 2003), sobrepeso e obesidade (Wesley et al. 2012), exposição à sílica (Stolt et al. 2005), poluição do ar (Hart et al. 2009) e/ou sobrepeso no nascimento (Jacobsson 2003) podem estar envolvidos na suscetibilidade à AR. Além disso, mecanismos gênicos podem interagir com fatores ambientais para iniciar uma resposta autoimune que pode levar à AR (Padyukov et al. 2004, Klareskog et al. 2006). Porém, o estudo dessas variáveis na população ainda é árdua, custosa e não livre de contaminações estatísticas, visto muitos

fatores ambientais serem dificilmente dissociados para uma determinada população (ex: poluição do ar e inalação passiva de fumaça de cigarro e exposição à sílica).

1.5. Fatores imunológicos envolvidos na artrite reumatóide

Um dos principais fatores responsáveis pela manutenção do processo inflamatório e pela destruição e deformidade da cartilagem articular e do osso é a produção exacerbada de citocinas e mediadores inflamatórios, tais como o fator de necrose tumoral (TNF) e as interleucinas (IL), IL-1 β e IL-6 (Feldman et al. 1996, Kotzin e Kappler 1998, Arend 2001).

1.5.1 Fator de Necrose Tumoral (TNF)

O TNF se refere um grupo de aproximadamente dezenove citocinas que são responsáveis, em princípio, na indução de apoptose. Dentre elas, podemos destacar, para o presente estudo, o TNF- α . O TNF (caquetina ou simplesmente TNF- α) é conhecido por ser liberado e produzido após a ocorrência de dano celular e/ou processos inflamatórios (Beutler e Cerami 1988, Vilcek e Lee 1991). Em especial, o TNF- α tem papel crucial para a defesa do organismo contra invasões virais, bacterianas e fúngicas (Camussi et al. 1991), pois tem a função de primar, ativar e direcionar a migração leucocitária para o local de infecção. Além disso, o TNF- α ativa o endotélio local, levando à angiogênese, expressão de quimiocinas, e à ativação de células estromais, condrócitos e osteoclastos (McInnes e Schett 2011). O TNF é um indutor central autócrino e parácrino de outras citocinas inflamatórias, incluindo a IL-1, IL-6, IL-18 e GM-CSF, sendo considerado como crucial para a patofisiologia da AR (Feldman et al. 1996, McInnes e Schett 2011) (Tabela 1):

Tabela 1. Papel do TNF na AR.

1. Altos níveis de TNF- α ou de seu RNAm estão presente em locais de destruição ativa da cartilagem
2. Há uma alta correlação entre dano à cartilagem articular e altos níveis de TNF- α no líquido sinovial na AR
3. A inibição do TNF α por antagonistas do seu receptor ou anticorpos específicos reduzem significativamente as lesões articulares observadas na AR
4. O uso de anticorpos recombinantes de TNF- α mimetiza os danos articulares observados nas articulações acometidas pela AR em modelos *in vivo* e *in vitro*

Em estudos clínicos, a utilização de agentes bloqueadores de TNF possui alta eficácia para a melhoria do quadro clínico de pacientes com AR, porém os seus efeitos colaterais limita seu uso clínico e prolongado, entre eles o aumento do risco de infecções. (Inanc e Direskeneli 2006, Curtis et al. 2007, Carmona et al. 2007, Favalli et al. 2009, Galloway et al. 2010), neutropenia (Rajakulendran et al. 2006, Hastings et al. 2010), infecção e malignidade (Bongartz et al. 2006, Burmester et al. 2012).

1.5.2. Interleucina 1 (IL-1)

Outras citocinas cujos estudos mostraram associação com a patofisiologia da AR pertencem à família da IL-1, incluindo a IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-33 e IL-36 (McInnes e Schett 2011, Garlanda et al. 2013). Em especial, a IL-1 α e a IL-1 β são citocinas pró-inflamatórias centrais para a indução de inflamação sinovial em vários modelos animais. A IL-1 α é encontrada geralmente constitutivamente dentro ou na

superfície celular de células saudáveis, normalmente em queratinócitos, células do epiteliais de mucosas, hepatócitos, pneumócitos e plaquetas (Beyer e Pisetsky 2009, Berda-Haddad et al. 2011). Por outro lado, a IL-1 β não é encontrada em células saudáveis, mas como um subproduto de monócitos sanguíneos, macrófagos teciduais e células dendríticas ativados pelo processo inflamatório. A produção de IL-1 β requer sinais adicionais para sintetizar seu RNAm, tais como produtos microbianos e citocinas inflamatórias, entre eles TNF- α , IL-18, IL-1 α e a própria IL-1 β (Dinarello 2002, Kay e Calabrese 2004). Na ocorrência de um processo inflamatório crônico, a IL-1 β é responsável pela reabsorção óssea e destruição da cartilagem articular por meio da indução de prostaglandina PGE2 (produzida durante processos inflamatórios), óxido nítrico, enzimas proteolíticas, expressão de moléculas de adesão celular, citocinas, quimiocinas e fatores angiogênicos (Dayer et al. 1986, Dinarello 2002, Dayer 2003, Barksby et al. 2007). Logo, a IL-1 faz parte de um mecanismo da retroalimentação positiva, podendo ser encontrada logo após o pico dos níveis de TNF- α , justificando a utilização de terapias anti-IL-1 para o tratamento da AR (Fleischmann 2006).

Pacientes com AR possuem altos níveis plasmáticos e articulares de IL-1 β , os quais podem ser correlacionados com a progressão da doença (Pascual et al. 2005, Shrivastava e Pandey 2012). De fato, a administração do antagonista do receptor de IL-1, anankira, mostrou-se mais eficaz em reduzir o processo inflamatório articular que a utilização de bloqueadores do TNF (Cohen et al. 2002, Schiff 2004, Bresnihan et al. 2004, Fleischmann 2006), inclusive com menor incidência de infecção por patógenos oportunistas (Bresnihan et al. 1998, Chiu et al. 2011), em pacientes com AR. Porém, cronicamente, a terapia anti-IL-1 levou a quadros de neutrofilia (Dinarello 2002) e o seu alto custo ainda limita seu uso (Clark et al. 2004).

1.5.3. Interleucina-6 (IL-6)

A IL-6 é uma citocina com funções pleiotrópicas sobre a inflamação, a resposta imune e a hematopoese. A importância da IL-6 para a AR advém de seu papel em direcionar as respostas de fase aguda, tais como o aumento nos níveis plasmáticos de proteína C-reativa, proteína amiloide sérica (PAS), fibrinogênio e haptoglobina (Heinrich et al. 1990). Se a resposta de fase aguda for mantida por muito tempo, com especial manutenção nos níveis de IL-6 e PAS, complicações mais graves relacionadas à inflamação crônica podem surgir, resultando em hiperzincemia, anemias e deterioração de vários órgãos (Gillmore et al. 2001, Nemeth et al. 2004, Liuzzi et al. 2005). Cronicamente, a IL-6 pode infiltrar a medula óssea, promovendo a maturação de megacariócitos e consequente produção e liberação de plaquetas, aumentando a suscetibilidade da formação de trombos e coágulos (Ishibashi et al. 1989).

Em nível celular, a IL-6 induz a proliferação de queratinócitos (Grossman et al. 1989) e a geração de colágeno por fibroblastos (Duncan e Berman 1991), podendo levar à deformidade articular observada na AR. Além disso, em combinação com o TGF- β , a IL-6 leva à diferenciação de células Th-17 (principais produtoras de IL-17, uma citocina altamente inflamatória) em detrimento das Tregs (principais células reguladoras da resposta imune) (Bettelli et al. 2006, Korn et al. 2009). Esse desbalanço Th17/Treg é um fator significativo para a quebra da tolerância imunológica, e está patologicamente ligado ao desenvolvimento de doenças inflamatórias autoimunes (Kimura e Kishimoto 2010).

Corroborando esses dados, estudos clínicos demonstraram altos níveis de IL-6 no tecido sinovial de pacientes com AR (Kishimoto 2005). De fato, a administração de antagonistas do receptor para IL-6 em pacientes com AR melhora o quadro clínico articular e reduz a progressão da doença (Nishimoto et al. 2008, Koike et al. 2013). No entanto, Nishimoto e colaboradores analisaram 143 indivíduos portadores de AR por um período de 5 anos. Desses, 112 desenvolveram alterações nos níveis de colesterol total e 28 desenvolveram neutropenia moderada a grave, e outros estudos mostram outros efeitos

colaterais, como elevação das transaminases hepáticas e do perfil lipídico (Koike et al. 2013, Genovese et al. 2015), o que ainda impõe restrições ao seu uso.

Resumidamente, pode-se afirmar que o TNF- α , a IL-1 e a IL-6 tem papel importante na inflamação e na destruição cartilaginosa e óssea (Figura 2). A adição de anticorpos bloqueadores de TNF- α , IL-1 ou IL-6 provou-se ser eficaz, porém os efeitos colaterais produzidos por essas terapias muitas vezes não superam seus benefícios no longo prazo.

Figura 2. Citocinas e sua influência na inflamação. Efeito esquemático mostrando a tendência de produzir efeito pró ou anti-inflamatório por diferentes compostos biológicos produzidos durante um processo inflamação. IFN γ : interferon- γ ; GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos; TGF β : fator de crescimento tumoral- β ; IL-1RA: antagonista do receptor da IL-1; sTNF-R: receptor solúvel do TNF.

1.6. Neutrófilos e o processo inflamatório

Neutrófilos (também conhecidos como leucócitos polimorfonucleares ou PMNs) representam 60% de todos os leucócitos circulantes. São constantemente produzidos pela medula óssea, porém possuem curto tempo de vida entrando em apoptose 24 horas após sua completa diferenciação. Os neutrófilos são caracterizados por sua habilidade de agirem como células fagocíticas, liberar enzimas proteolíticas de grânulos citoplasmáticos e produzir espécies de reativos do oxigênio na presença de dano tecidual ou patógenos invasores (Nemeth e Mocsai 2012) (Figura 3).

Figura 3. Compostos produzidos e atividades exercidas pelo neutrófilo na mediação da inflamação.

A resposta inflamatória mediada por neutrófilos é um processo de várias etapas, inicialmente caracterizada por sua adesão ao endotélio (ativado pelo processo inflamatório local) seguido de sua extravasamento e migração para os tecidos inflamados (Huber et al. 1991, Borregaard et al. 2007, Borregaard 2010) (Figuras 4 e 5). Ao alcançar o tecido inflamado, os neutrófilos interagem com células imunes locais, para modular, influenciar e potencializar as respostas imunes inatas e auxiliar as respostas adaptativas através da síntese e liberação de mediadores solúveis (tais como citocinas) (Kasten et al. 2010, Jaeger et al. 2012, Schuster et al. 2012, Micheletti et al. 2013). A modulação da resposta imune pelos neutrófilos é mediada por quatro funções principais: 1) secreção de uma ampla variedade de citocinas que podem regular a função de quase todas as células imunes; 2) aumento da expressão de receptores de membrana para essas e outras citocinas/quimiocinas; 3) potencialização das interações célula-célula; e 4) liberação de proteases que pode ativar ou inativar citocinas e quimiocinas (Pindjakova e Griffin 2011, Wright et al. 2014) (Figura 4).

Figura 4. Cascata de adesão leucocitária. A cascata de adesão leucocitária consiste de ao menos 5 etapas: 1) captura + rolamento; 2) Frenagem; 3) Parada; 4) Adesão; e 5) Transmigração. Os passos iniciais são mediados pela interação de selectinas na superfície pelo endotélio com ligantes glicosilados expressos na superfície dos neutrófilos (representado pela ligação P-selectina/PSGL-1). Os passos intermediários e finais são mediados pela ligação de ligantes de integrinas nos neutrófilos com proteínas de adesão no endotélio (LFA-1/ICAM-1). Sinais adicionais para aumentar a frenagem e adesão dos neutrófilos são fornecidos pela ligação de quimiocinas locais a receptores acoplados à proteína G nos neutrófilos (CXCL1 e CXCL2). Adaptado de Pindjakova e Griffin, 2011.

Morfologicamente os neutrófilos possuem duas características distintas: o formato de seu núcleo (polimorfo) e o formato de seus grânulos,. Seus grânulos podem ser classificados em quatro grupos: 1) primários ou azurofílicos; 2) secundários ou específicos; 3) terciários (gelatinases); e 4) vesículas secretórias. Uma ampla variedade de estímulos induz a liberação desses grânulos, tais como componentes do complemento, componentes encontrados na superfície de fungos (zimosan) e bactérias (fMLP e LPS – ligantes de receptores do tipo Toll) e o próprio TNF. Além disso, os neutrófilos expressam praticamente todos os receptores do tipo toll (TLR), exceto o TLR-3, permitindo o reconhecimento de uma ampla variedade de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e ao dano tecidual (DAMPs) (Borregaard et al. 2007, Borregaard 2010, Prince et al. 2011).

Porém, à medida que a resposta imune perpetuada pelos neutrófilos leva à resolução do patógeno ou da lesão, o constante recrutamento e consequente ativação de neutrófilos para o local de inflamação pode se tornar aberrante e causar o desenvolvimento de patologias associadas ao dano tecidual e/ou levar a um processo inflamatório disseminado.

1.6.1. Papel dos neutrófilos na artrite reumatóide

Estudos clínicos mostram que neutrófilos ativados são comumente encontrados no líquido sinovial e no panus na AR (Barnhart et al. 1967, Belcher 2002, Wittkowski et al. 2007), principalmente nos estágios iniciais da doença (Dularay et al. 1988, 1990, Kitsis e Weissmann 1991). Além disso, grande parte dos neutrófilos encontrados na circulação sistêmica de pacientes com AR se encontra primado (menor limiar para serem ativados), expressando altos níveis de uma forma do TNF ancorado à membrana celular (Wright et al. 2014) e são mais propensos à produção de compostos reativos do oxigênio (ROS) (Eggleton et al. 1995). Adicionalmente, neutrófilos também podem expressar o complexo

MHC II+peptídeo e apresentar potenciais auto-antígenos às células T, contribuindo para o deslocamento da resposta imune inata para adaptativa (Cross et al. 2003). Concomitantemente a esses fatos, a vida útil dos neutrófilos pode ser prolongada de poucas horas para vários dias devido ao ambiente articular na AR, como na ocorrência de hipóxia e na presença de citocinas anti-apoptóticas, tais como TNF, GM-CSF e IL-18 (Lally et al. 2005, Raza et al. 2006, Parsonage et al. 2008, Kebir e Filep 2013), levando a uma retroalimentação positiva do processo inflamatório local (Figura 5).

Em sintonia com os fatos acima descritos, neutrófilos poderiam se tornar importantes alvos terapêuticos para o tratamento da AR (Cascão et al. 2010, Schmutz et al. 2010). De fato, fármacos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) podem retardar a desgranulação e atividade dos neutrófilos (Neal et al. 1987, Pillinger et al. 1998). Efeito similar é observado com o uso de corticóides (Youssef et al. 1996), drogas antirreumáticas de modificação da doença (DMARDs) (Kraan et al. 2000) e inibidores do TNF (Broeder et al. 2003). Porém, essas terapias se mostraram incompletas para a resolução da doença ou possuem efeitos colaterais que se sobrepõem aos efeitos terapêuticos (vide tópicos anteriores).

Uma potencial alternativa ao uso de terapias medicamentosas seria a manipulação do sistema imune por meios endógenos.

Figura 5. Efeito dos neutrófilos na artrite reumatóide. Esquema mostrando o papel dos neutrófilos na inflamação articular destacando a interação entre os tipos de leucócitos infiltrados na articulação. A contribuição dos neutrófilos para o desenvolvimento da doença através da produção de mediadores imunes e enzimas pode ser visualizado no quadro verde. GM-CSF: fator estimulante de colônias de macrófagos/granulócitos; G-CSF: fator estimulante de colônia de macrófagos; *Ifng*: Interferon γ ; *BLyS*: estimulador de linfócitos B. Adaptado de Cascão et al., 2010.

1.7. A História das Interações Mente-Corpo

Para os gregos do período clássico (séculos V e IV AEC) até meados do século XIX, o ser humano poderia ser classificado em 4 tipos de acordo com seus humores: sanguíneo (extrovertido e aventureiro), colérico (ambicioso e enérgico), melancólico (criativos e introvertidos) e fleumático (tímido e afetuoso). Em 1495, Johannes de Ketham publica o “*Manual de Medicina*”, descrevendo mais “detalhadamente” o indivíduo psicológica e fisicamente de acordo com os humores (Lutz 2002). Essas crenças hipocráticas influenciaram fortemente a medicina ocidental até meados do século XVII, quando do surgimento do Iluminismo, o qual criou uma nova mentalidade científica que se afastava cada vez mais do sobrenatural em busca de métodos mais racionais e empíricos para a explicação das doenças.

1.7.1. A fisiologia como ciência natural

Em 1747, Albrecht von Haller (1707-1777) publica o “*Elementa Physiologiae Corporis Humani*” (Elementos de Fisiologia Humana), definindo o organismo como uma máquina cujos processos internos são mantidos em movimento por um conjunto de forças que poderiam ser conhecidas por seus efeitos, mas não por suas origens. A partir de 1854, Claude Bernard, fisiologista Francês, formula o conceito de “*Milieu Intérieur*” (ambiente ou meio interno), descrevendo-o da seguinte maneira:

“O ‘milieu’ supõe a perfeição do organismo em compensar e equilibrar instantaneamente as variações externas que ocorrem a todo o momento (...). Todos os mecanismos vitais, por mais variados que sejam, possuem sempre o único objetivo de manter a uniformidade das condições de vida no ambiente interno (...). A estabilidade do ambiente interno é a condição para a vida livre e independente”. (Bernard 1878).

Posteriormente, William James e Karl Lange propõem que a percepção de um estado mental (emoções - especialmente o medo) desencadearia uma resposta fisiológica reflexa no organismo, produzindo uma resposta autonômica simpática (taquicardia, midríase, piloereção, etc) (James 1884, Lange 1887). Nessa mesma linha de raciocínio, Philip Bard e Walter Cannon, cunham o termo “*homeostasia*” e relacionam os efeitos das emoções e suas consequências às respostas fisiológicas produzidas pelo sistema nervoso autonômico, em que a resposta simpática excitatória deprime a parassimpática inibitória preparando o corpo para enfrentar o estresse que lhe foi aplicado, então criando a teoria de Cannon-Bard e cunhando o termo “*resposta de luta ou fuga*” (Cannon 1927, 1932, Bard 1928)

Em meados do século XX, o imunologista austro-húngaro Hans Selye percebeu que animais submetidos a diversos tipos de estresses, tais como frio, corte cirúrgico, choque espinal e intoxicação, desenvolviam uma síndrome comum e independentemente do estímulo. Essa síndrome tinha como efeito a diminuição do timo, baço e pâncreas, úlceras gastrointestinais e, em casos mais graves, necroses hepáticas. Influenciado por Claude Bernard e seu “*milieu intérieur*” e pela teoria homeostática de Cannon-Bard, Selye conceitualizou a palavra “*estresse*” para designar uma resposta fisiológica adaptativa frente a um estímulo externo aparentemente inócuo. A esse grupo de respostas cunhou-se o termo “*Síndrome da Adaptação Geral*” que levou à dissociação do estresse em duas vertentes: o euestresse (estresse bom) do distresse (estresse ruim e deletério) (Selye 1976).

Ao longo de toda sua vida acadêmica, Hans Selye mostrou a importância crucial das glândulas adrenais nas respostas ao estresse. A descrição dos efeitos dos esteróides sintetizados no córtex adrenal sobre a função fisiológica do indivíduo complementou os trabalhos de Cannon sobre o papel das catecolaminas circulantes derivadas da ativação do sistema nervoso simpático e da medula adrenal como preparativos para uma resposta

de luta ou fuga associadas ao estresse. Esses hormônios esteróides foram subsequentemente denominados de *corticosteróides*, sendo os produtos finais da ativação do que ficou conhecido posteriormente como eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (eixo HPA) (Figura 6).

1.7.2. O surgimento da Psiconeuroimunologia

Em meados da década de 1940-1950, observações clínicas mostraram que pacientes portadores de distúrbios mentais, tais como a esquizofrenia e transtorno bipolar, apresentavam uma menor contagem de linfócitos no sangue, menor produção de anticorpos à vacinação e aumento das respostas alérgicas (Freeman e Elmadjian 1947, Phillips e Elmadjian 1947, Randolph 1950), sugerindo que a predisposição a transtornos mentais também poderiam influenciar a resposta imune. De fato, estudos posteriores sugeriram a associação entre distúrbios mentais, como ansiedade e depressão, com o aumento na incidência de doenças crônicas, como câncer e problemas cardíacos (Fish e Dillon 1953, Verwoerd e Dovenmuehle 1964, Fras et al. 1967).

Figura 6. Terminações simpáticas e os componentes do eixo HPA. A resposta a um estresse (físico ou psicológico) provoca a ativação de sistemas envolvidos com respostas autonômicas e neuroendócrinas no organismo. A ativação do eixo HPA consiste na produção e liberação do hormônio corticotrófico (CRH) na hipófise anterior por neurônios hipotalâmicos. O CRH induz a produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que alcança a glândula adrenal por meio da circulação sistêmica. Nas adrenais, o ACTH induz a liberação de noradrenalina, adrenalina e glicocorticoides que agem conjuntamente para promover e manter as respostas fisiológicas e imunológicas ideais para um determinado tipo de estresse. Adaptado de Irwin e Cole, 2011.

Em 1964, George Solomon cunha o termo “*Psiconeuroimunologia*” para designar o impacto da mente sobre o processo inflamatório após perceber que pacientes com AR apresentavam uma piora do quadro inflamatório quando apresentavam sinais e sintomas de depressão (Solomon 1964). Em 1975, Robert Ader e Nicholas Cohen demonstraram como o estado mental poderia influenciar a resposta imune em ratos. Os autores parearam um estímulo aparentemente prazeroso (solução de sacarose) seguido de um estímulo desagradável, uma injeção intraperitoneal de ciclofosfamida (um agente aversivo), que induz, ao longo do tempo, à imunossupressão. De fato, os animais submetidos ao condicionamento sacarose-ciclofosfamida por 3 dias (isso é, o estímulo prazeroso é seguido obrigatoriamente por um estímulo aversivo) e subsequentemente expostos somente à sacarose ao longo de 2 meses, desenvolveram imunossupressão (Ader e Cohen 1975). Durante a década de 1980, problemas neuropsiquiátricos proporcionados pela imunodeficiência causada pelo HIV ou pelos efeitos colaterais de seu tratamento (na época com quimioterápicos) mostraram que estados mentais poderiam influenciar a resposta imune e vice-versa (Beckett et al. 1987, Beckett e Manschreck 1988).

Ainda na década de 1980, vários estudos começaram a mostrar que diversos órgãos do sistema imune eram inervados pelo sistema nervoso. Entre eles, o timo e o baço eram especialmente inervados pelo sistema nervoso simpático (Williams e Felten 1981, Fuller et al. 1981, Felten et al. 1981), cujos terminais neuronais poderiam ser encontrados em áreas parenquimatosas de íntima proximidade a linfócitos (Felten et al. 1981). A partir dos anos de 1990, houve uma intensa busca sobre como o um evento inflamatório poderia se comunicar com o sistema nervoso. Estudos mostraram que o nervo vago seria o principal condutor neuronal para estruturas supramedulares, pois converte sinais de respostas inflamatórias em sinais neurais que sinalizam o SNC para induzir febre e alterações comportamentais (Bluthe et al. 1994, Watkins et al. 1994, Hansen e Krueger 1997, Simons et al. 1998). A partir da virada do século XX para o XXI, novos estudos

mostraram como, quando e por onde essas informações trafegam para regular a resposta inflamatória. Porém, antes de abordar esses estudos, é preciso caracterizar os componentes atuais das vias neuroimunes.

1.8. O sistema nervoso autonômico

1.8.1. Organização anatômica do sistema nervoso autônomo

No final do século XIX início do século XX, inúmeros estudos já apontavam a existência de um sistema nervoso “involuntário” cuja atividade era independente da vontade do indivíduo. John Newport Langley foi um dos pioneiros no estudo desse novo sistema involuntário, dando luz ao conceito de “*sistema nervoso autonômico*” (SNA). Através dos trabalhos de Gaskell, o qual propunha o sistema nervoso “*não-voluntário*” (visceral) como algo derivado do sistema nervoso central que migrou para a periferia (Gaskell 1916), Langley mostrou que o SNA era formado por sistemas independentes, porém cooperativos, denominados de “*simpático*”, “*parassimpático*” e “*entérico*” (Langley 1893, 1900, 1909). Tal conceito permaneceu praticamente inalterado ao longo dos anos.

Atualmente o SNA é dividido em cinco componentes (Goldstein 1978, Netter 2008, Brodal 2010):

- 1) *Sistema nervoso entérico*: localizado inteiramente na parede das vísceras que compõem o sistema digestório, começando pelo esôfago e terminando no ânus. É composto particularmente de plexos neuroniais ao longo das camadas muscular (plexo de Auerbach) e submucosa (Plexo de Meissner);
- 2) *Medula adrenal*: responsável pela liberação de adrenalina e noradrenalina por células da medula da adrenal;
- 3) *Simpático colinérgico*: localizado nas glândulas sebáceas;
- 4) *Simpático noradrenérgico*: localizado ao longo da cadeia simpática cervical, torácica e lombar;

- 5) *Parassimpático colinérgico*: constituído pelos pares cranianos e pelo plexo sacral.

Para o presente estudo serão abordados os sistemas simpático e parassimpático

1.8.2. Divisão anatômica do sistema nervoso autonômico

Os sistemas simpático e parassimpático consistem de dois neurônios consecutivos que saem do SNC para inervar o órgão alvo. O *neurônio pré-ganglionar* está localizado dentro do SNC cujo axônio termina, perifericamente, em um *gânglio*. O neurônio *pós-ganglionar* (ou simplesmente *ganglionar*) possui seu corpo celular localizado dentro do gânglio e cujos axônios terminam intimamente nas células musculares lisas ou glandulares (Figura 7). A função principal de um gânglio é distribuir os sinais provindos do SNC, integrando a informação provinda dos neurônios pré-ganglionares com os vários corpos celulares que dele saem.

Figura 7. Organização básica da parte periférica do sistema nervoso autônomo. Note que 1) o neurônio pré-ganglionar simpático é menor que o ganglionar e; 2) ambos neurônios pré-ganglionares liberam acetilcolina (ACh) no gânglio, enquanto os neurônios ganglionares simpáticos liberam NA (noradrenalina) e ACh (exclusivamente nas glândulas sudoríparas), e os parassimpáticos ACh. SNC: Sistema Nervoso Central; SNP: Sistema Nervoso Periférico. Adaptado de Brodal, 2008.

O principal neurotransmissor da parte efetora do sistema nervoso simpático é a noradrenalina (NA) (Euler 1946, Falck et al. 1962, Geffen et al. 1969) (Figura 7). Os neurônios pré-ganglionares simpáticos são encontrados na coluna intermédio-lateral da medula espinal entre os níveis torácico e lombar (Figura 8) e suas fibras emergem da medula espinal por meio das raízes ventral de T1 a L2, misturando-se às fibras somáticas motoras (Figura 8).

Em relação ao sistema nervoso parassimpático, a acetilcolina (ACh) foi o neurotransmissor encontrado tanto nas sinapses ganglionares como nas junções neuroefetoras do neurônio ganglionar, embora haja raras exceções nas glândulas sudoríparas, pele e vasculatura coronária (Langley 1900, Dale 1914, Campbell 1970). As fibras pré-ganglionares parassimpáticas têm sua origem no tronco encefálico e na medula espinal sacral (Figura 9). Na região do tronco encefálico, os corpos dos neurônios pré-ganglionares se originam em núcleos especializados (núcleos de Edinger-Westphal, salivatório e dorsal do vago), os quais se projetam para gânglios autonômicos localizados na cabeça. Por outro lado, fibras pré-ganglionares parassimpáticas sacrais se originam de neurônios localizados na coluna intermédio-lateral dos níveis L6-S1 da medula espinal (Mallory et al. 1989, Tanaka et al. 2013), projetando-se para os gânglios localizados na pelve, de forma semelhante à observada para os neurônios pré-ganglionares simpáticos.

Figura 8. Localização da origem dos neurônios pré-gaglionares na medula espinal. Figura esquemática mostrando um corte transversal da medula espinal ao nível torácico mostrando a (A) localização dos corpos neuronais da coluna intermédio-lateral em relação à substância cinzenta e branca. (B) Os feixes axonais da coluna intermédio-lateral (azul) saem da medula espinal juntamente com os feixes axonais dos motoneurônios (vermelho) pelo funículo ventral e se juntam para formar a raiz ventral. Adaptado de Brodal, 2008 (A) e Netter, 2008 (B).

Figura 9. Origem real dos pares cranianos. A: Fotografia da vista ventral do encéfalo humano mostrando os feixes axonais dos nervos cranianos parassimpáticos. I: Nervo olfatório; II: Nervo óptico; III: Nervo oculomotor; IV: Nervo troclear; V: Nervo trigêmeo; VI: Nervo abducente; VII: Nervo facial; VIII: Nervo vestibulo-coclear; IX: Glossofaríngeo; X: Nervo vago; XI: Nervo acessório; XII: Nervo hipoglosso. Fotografia extraída da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Minnesota, (<http://vanat.cvm.umn.edu/CrNAnimQuiz/>).

De um ponto de vista restrito, podemos organizar o sistema nervoso parassimpático (SNP) e simpático (SNS) em duas partes distintas (Figura 10):

- 1) Crâniossacral ou parassimpática
- 2) Tóraco (ou cérvico)-lombar ou simpática

Figura 10. Localização dos sistemas parassimpático e simpático. Figura esquemática de um corte longitudinal do encéfalo e da medula espinal mostrando as principais características anatômicas do sistema nervoso autônomo. Adaptado de Brodal, 2008.

1.8.3. Organização anatômica do gânglio simpático

Em termos anatômicos gerais, podemos considerar 8 principais gânglios paravertebrais simpáticos:

- Gânglios cervicais superior, médio e inferior
- Glândula adrenal
- Gânglio celíaco
- Gânglio aórticorrenal
- Gânglios mesentéricos superior e inferior

Strack et al. (1988) examinaram a distribuição segmentar dos feixes axonais que inervam os diversos gânglios simpáticos e da medula adrenal em ratos, demonstrando que a origem dos neurônios pré-ganglionares simpáticos era encontrada exclusivamente na coluna intermédio-lateral da medula espinal ao longo da sua extensão tóraco-lombar (Figura 11).

Figura 11. Origem da inervação dos gânglios paravertebrais e medula adrenal. Adaptado de Strack et al. (1988).

No presente estudo, daremos atenção especial para o gânglio celíaco, o qual é encontrado muitas vezes fundido ao gânglio mesentérico superior, dando origem ao complexo celíaco/mesentérico superior (CCMS) que recebe aferências de diversas partes do trato gastrointestinal e simpáticas provindas exclusivamente da medula espinal (Elfvin e Dalsgaard 1977, Dalsgaard et al. 1982, Strack et al. 1988, Lindh et al. 1989, Elfvin et al. 1993) (Figura 12).

Figura 12. Características neuroanatômicas do CCMS. Desenho esquemático ilustrando a origem dos feixes neuroniais que se projetam para o complexo ganglionar celíaco/mesentérico superior (CCMS). As fibras nervosas alcançam o CCMS por meio de troncos nervosos específicos: **1:** Os nervos torácicos contêm axônios cujos corpos neuroniais se originam na medula espinal (pré-ganglionares); **2:** Os nervos mesentéricos contêm axônios de neurônios entéricos cujos corpos celulares se encontram no plexo mioentérico do trato gastrointestinal proximal; **3:** Os nervos intermesentéricos contêm axônios originados nos gânglios da medula lombar, nervos pré-ganglionares simpáticos e de processos de neurônios entéricos do cólon distal. Do CCMS, feixes de axônios inervam o pâncreas, fígado, intestino delgado e partes do intestino grosso. Adaptado de Elfvin et al., 1993.

1.9. Anatomia do nervo vago

O nervo vago (VN) é o nervo parassimpático mais longo e mais importante do organismo, originando-se em três núcleos do tronco encefálico: núcleo do trato solitário (NTS), núcleo motor dorsal (DMN) e núcleo ambíguo, innervando praticamente todo o tórax e abdome (Figura 13). Anatomicamente podemos dividi-lo em duas porções principais: 1) cervical e torácica e 2) abdominal (Figura 13).

Figura 13. Anatomia macroscópica do nervo vago. Desenho esquemático da anatomia macroscópica do curso do NV ao longo de sua origem no tronco encefálico até sua porção terminal nas vísceras abdominais. Repare que o NV é um nervo misto composto de fibras aferentes (sensoriais) e eferentes (motoras). CCMS: complexo celíaco-mesentérico superior. Adaptado de Netter, 2008.

1.8.4. Porções cervical e torácica do nervo vago

Ao sair pelo forame jugular, os NVs esquerdo e direito acompanham a artéria carótida ipsilateralmente e formam uma intumescência proeminente, conhecida como gânglio nodoso. Esse gânglio dá origem a dois feixes menores do nervo vago, o faríngeo e o ramo laríngeo superior (Furness 2015). À medida que descende pela artéria carótida rumo ao tórax, outros feixes colaterais sensoriais menores deixam o NV para inervar as vísceras contidas na cabeça, pescoço e tronco. Em rota descendente pelo esôfago, o NV entra na cavidade abdominal pelo hiato esofágico, dando origem a dois troncos, o ramo dorsal (posterior) e o ventral (anterior) (Figura 14).

1.8.5. Porção abdominal do nervo vago

Ao entrar na cavidade abdominal, o ramo ventral ou anterior do NV, contíguo ao NV esquerdo, se ramifica hierarquicamente em três outros feixes: 1) hepático; 2) gástrico; e 3) celíaco (Prechtel e Powley 1985) (Figura 14). O ramo dorsal (ou posterior) do NV, contíguo ao NV direito, dá origem aos nervos 1) gástrico posterior (inervando a parte posterior do estômago) e celíaco posterior (o qual forma axônios que se misturam aos do feixe celíaco da porção ventral) (Prechtel e Powley 1985) (Figura 14). O ramo hepático inerva o fígado e as veias portais, o ramo gástrico ventral inerva a porção anterior da parede do estômago, e o ramo celíaco inerva a porção posterior do estômago e o pâncreas, rins, intestino delgado e a parte proximal e descendente do cólon ao longo da artéria mesentérica superior.

Figura 14. Anatomia do nervo vago subdiafragmático. Desenho esquemático mostrando os três principais ramos vagais que inervam as vísceras abdominais por meio de uma visão anterior. Adaptado de Simons et al. (1998).

1.10. Neuroanatomia e neurofisiologia da resposta imune

1.10.1. Respostas fisiológicas durante a resposta imune

Estudos clínicos e experimentais demonstram, desde meados das décadas de 1950 e 1960, que a presença de um evento imune ativo, como observada após vacinação ou em pacientes sépticos, induz alterações fisiológicas que incluem aumento da atividade simpática, ativação do eixo HPA e alterações comportamentais (Guard 1953, Briggs e Brown 1960, Alican e Hardy 1962, Emerson et al. 1966, Hinshaw et al. 1967, Arora e Sanyal 1968), propondo que, de alguma forma, o sistema nervoso poderia reconhecer e responder a uma resposta imune. De fato, estudos experimentais em animais já mostravam que fatores solúveis liberados por leucócitos ativados ou encontrados no soro de animais doentes poderiam induzir febre e influenciar a atividade neuronal (Menkin 1943, Beeson 1945, Grant e Hirsch 1950, Douglas 1954, Wexler et al. 1957). Desse modo, Blalock propôs, em 1984, que o sistema imune teria um papel sensorial sobre o estado funcional do organismo, como um “sexto sentido” que detectaria a presença de patógenos, tumores e alérgenos para gerar uma informação que pudesse ser detectada pelo SNC (Blalock 1984).

Porém a grande dúvida é de que modo a resposta imune poderia alcançar os neurônios centrais, visto o SNC ser coberto pela barreira-hemato-encefálica, a qual é virtualmente intransponível para células e macromoléculas.

1.10.2. Mecanismos neurais da resposta imune periférica

A barreira hemato-encefálica (BHE) permite a passagem somente de íons e moléculas lipídicas com menos de 400 Da, mas não de citocinas devido ao seu alto peso molecular (ex. TNF: 25kDa; IL-1; 31kDa; IL-6: 21kDa). Em meados da década de 1980 e 1990, estudos sugeriam que citocinas periféricas cruzariam para o SNC em que possuem fenestrações na BHE, tais como nos órgãos circunventriculares (Figura 15) (Gutierrez et

al. 1993, Banks et al. 1994), para produzir febre e a ativação do eixo HPA (Stitt 1985, Katsuura et al. 1990, Niiijima et al. 1991).

Uma outra hipótese propõe que a BHE possuía receptores específicos para citocinas em sua superfície externa, permitindo a entrada da citocina íntegra no SNC por meio de endocitose, mas este mecanismo ainda não foi elucidado (Banks et al. 1991, 1994).

Figura 15. Localização dos órgãos circunventriculares. Fotomicrografia esquemática do corte sagital-medial de um encéfalo humano mostrando a localização dos órgãos circunventriculares. Adaptado de <http://www.learnneurosurgery.com/blood-brain-barrier.html>.

Outra possibilidade, mais recente, é a liberação de mediadores inflamatórios por células imunes que já se encontram no SNC, dentro do sistema linfático cerebral (Figura 16) (Louveau et al. 2015).

A quarta e última possibilidade é ligação de moléculas inflamatórias em receptores expressos em neurônios periféricos que, por sua vez, sinalizariam ao SNC. De fato, estudos mostram que neurônios periféricos podem expressar receptores para o TNF (Wagner e Myers 1996), IL-1 β (Schultzberg et al. 1987) e IL-6 (März et al. 1996), interagindo com leucócitos (Griffin et al. 1993, Phillips e Powley 2012). Essa sinalização neuronal, se comparado ao sistema de sinalização humoral proposto pelos órgãos circunventriculares, é mais rápida e específica para diferentes órgãos, e envolve concentrações mínimas de citocinas para ativação neuronal. Atualmente existem várias vias neurais que podem responder a um evento inflamatório periférico, porém a principal via estudada envolve a participação do *nervo vago* (NV).

Essas hipóteses da sinalização neuro-imune se encontram resumidas na Tabela 2.

Figura 16. Localização do sistema linfático cerebral. Desenho esquemático do encéfalo humano mostrando a localização dos vasos linfáticos cerebrais (verde) que acompanham lateralmente o seio sagital superior (azul) e sua relação com a dura mater, aracnóide mater e pia mater (amarelo). Adaptado de Louveau et al. (2015).

Tabela 2. Hipóteses da comunicação entre os sistema imune e neuronal

1. As citocinas podem ser transportadas integralmente para dentro do encéfalo por meio de um sistema de transportadores seletivos localizados na barreira hemato-encefálica;
2. Citocinas podem agir em neurônios localizados onde a BHE é frouxa ou inexistente (ex: órgãos circunventriculares);
3. Citocinas podem ser sintetizadas por células imunes residentes no SNC;
4. Citocinas podem agir diretamente ou indiretamente sobre nervos periféricos que enviam sinais para o encéfalo.

1.10.3. O papel do nervo vago na ativação do eixo neuro-imune

Até o final da década de 1980 ainda havia muita especulação sobre a real influência do sistema nervoso sobre a resposta imune e vice-versa. De fato, estudos experimentais mostravam que a atividade simpática possuía efeitos inibitórios sobre a respostas imune (Singh 1985a, 1985b, Weihe et al. 1989), enquanto o sistema parassimpático possuía efeitos aparentemente excitatórios (Moore e Owen 1967, Moore 1984, Bulloch et al. 1987). No entanto, essa visão antagônica do sistema autonômico sobre a imunidade era muito discutível (Singh et al. 1987, Antonica et al. 1994). Num estudo pioneiro, Antonica e colaboradores, em vista que o timo era ricamente innervado pelo NV, efetuaram vagotomias seriadas para verificar a influência dos vários ramos do NV sobre a contagem de linfócitos na corrente sanguínea (Figura 17).

Figura 17. Inervação do timo pelo nervo vago. Desenho esquemático da inervação do timo de ratos mostrando os locais de secção do nervo vago cervical (flexa aberta 1), do nervo vago torácico (flecha fechada 2) e do ramo laríngeo recorrente (flexa aberta 3). Adaptado de Antonica et al., 1994.

Os autores mostraram que dos três tipos de vagotomias efetuadas (cervical, laríngea ou torácica), somente a vagotomia cervical e laríngea diminuiu a contagem de linfócitos no sangue. Esses dados mostram que o NV pode influenciar a funcionalidade do timo e no desenvolvimento de linfócitos. Em outra parte do experimento, os autores estimularam eletricamente o NV (ENV) em animais vagotomizados. A ENV aumentou a contagem de linfócitos sanguíneos e reverteu os efeitos imunodepressores da vagotomia cervical e torácica. Curiosamente, quando utilizado atropina (bloqueador muscarínico) ou um α -bungarotoxina + curare (bloqueador nicotínico) houve uma potencialização e uma inibição, respectivamente, sobre a contagem de linfócitos sanguíneos após a ENV. Os autores concluíram que as fibras recorrentes do NV exercem um efeito tônico e facilitatório sobre a liberação de linfócitos tímicos mediado especificamente por receptores nicotínicos. Apesar de ser um trabalho pioneiro mostrando o papel do sistema nervoso controlando o sistema imune, a ENV foi efetuada em animais naïve, dificultando a interpretação desses dados em uma condição inflamatória.

Em relação aos experimentos que abordaram os efeitos imunomodulatórios dos feixes abdominais do NV, a vagotomia subdiafragmática total impediu a expressão de c-Fos (uma proteína que indica ativação neuronal) em neurônios do hipotálamo e tronco encefálico em resposta à injeção intraperitoneal de LPS, propondo que a sinalização imune-neural não é exclusividade dos órgãos circunventriculares (Wan et al. 1994). Na sequência, outros estudos mostraram que esse procedimento cirúrgico também atenua (mas não elimina completamente) outras respostas associadas à inflamação sistêmica, tais como febre, anorexia e aumento de noradrenalina hipotalâmica (Fleshner et al. 1995, Watkins et al. 1995, Bret Dibat et al. 1995, Blatteis e Sehic 1997, Goehler et al. 2000). Posteriormente, o ramo hepático do NV foi considerado o responsável pela de resposta febril (Romanovsky et al. 1997a, 1997b, Simons et al. 1998), sugerindo sua função (até o momento pouco conhecida) de conduíte neural entre o sistema imune e o SNC.

No ano de 2000, o grupo de Kevin Tracey mostrou que vagotomia cervical exacerba o processo inflamatório no modelo de endotoxemia, aumentando os níveis séricos e hepático de TNF- α , e que. Por outro lado, no mesmo estudo, a ENV cervical eferente reduziu o TNF sérico em mais de 70% (Borovikova et al. 2000). Além disso, a acetilcolina (ACh), neurotransmissor efetor da via parassimpática, inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-18) em macrófagos humanos estimulados com LPS (Borovikova et al. 2000). A partir desse estudo, Tracey e colaboradores cunharam o termo “*Via Colinérgica Anti-Inflamatória*”.

1.10.4. A Via Colinérgica Anti-inflamatória (VCA)

Em 2003, Wang e colaboradores mostraram que a subunidade $\alpha 7$ do receptor nicotínico ($\alpha 7$ nACh) é um componente essencial para o funcionamento da VCA. Nesse estudo, a ENV não suprimiu os níveis de TNF sérico em animais deficientes (KO) para o receptor $\alpha 7$ nACh em modelos de endotoxemia. Em 2006, o mesmo grupo mostrou que a remoção do baço (esplenectomia) inibia os efeitos anti-inflamatório da ENV, sugerindo o baço como órgão efetor da VCA (Huston et al. 2006). Em 2008, a remoção da inervação esplênica inibiu os efeitos da ativação da VCA, sugerindo uma conexão neural entre o NV e o nervo esplênico, provavelmente no CCGM (Rosas-Ballina et al. 2008).

Após a ENV, os níveis de ACh no baço aumentam exponencialmente por 20 minutos (Rosas-Ballina et al. 2011), porém outros estudos mostraram que a meia vida da ACh é baixa no organismo, por volta de 2 minutos, devido à ação da acetilcolinesterase (Chang e Huang 1975, Fertuck 1975, Berg e Hall 1975). Além disso, mesmo se a fonte de ACh no baço fosse derivada de terminais neurais, seria improvável que um sistema neural se mantivesse ativo tonicamente por tanto tempo sem causar efeitos colaterais, tais como bradicardia e hipotensão. De fato, Rosas-Ballina e colaboradores (2011) demonstraram que o efeito da ENV não era observado em camundongos NUDE

(deficientes em linfócitos), mas poderia ser restabelecido nos animais que recebiam a transferência adotiva de células T de animais controle. Desse modo, os autores mostraram que uma subpopulação de células T CD4 de memória ($CD44^{\text{high}} CD62L^{\text{low}}$) esplênicas respondiam à NA liberada pelos terminais neurais do nervo esplênico produzindo ACh, a qual se ligariam nos receptores $\alpha 7$ nACh expressos em macrófagos do baço. A partir desses estudos, o grupo de Kevin Tracey conseguiu, ao longo de uma década, descrever toda a VCA, formulando a via neuroimune do então denominado *Reflexo Inflamatório (VCA)* (*Figura 18*).

Figura 18. O Reflexo Inflamatório. (1) Fibras eferentes pré-ganglionares do ramo celíaco do nervo vago (parassimpático) fazem sinapse com neurônios ganglionares do gânglio celíaco; (2) o gânglio celíaco dá origem ao nervo esplênico (neurônio ganglionar) que inerva o baço; (3) no baço, o nervo esplênico (simpático), quando ativado, libera NA na polpa branca; (4) a noradrenalina se liga inicialmente em receptores β_2 adrenérgicos em linfócitos TCD4 CD44^{high} CD62L^{low} de memória; (5) os linfócitos de memória liberam ACh em resposta à NA; (6) a ACh se liga em receptores α_7 nACh em macrófagos esplênicos; (7) a ativação de receptores α_7 nACh em macrófagos inibe a produção de TNF- α e reduz a inflamação. AR: adrenorreceptor; ChAT: Colina acetiltransferase (sintetiza acetilcolina); ACh: acetilcolina; α_7 : α_7 nACh; M ϕ : macrófago esplênico. Adaptado de Olofsson et al., 2012.

1.11. A VCA Revista: críticas ao atual modelo

Apesar de amplamente aceito que a ENV de fato possui efeitos anti-inflamatórios, há muita discussão sobre a neuroanatomia e neurofisiologia do modelo proposto pelo grupo de Kevin Tracey.

1.11.1. Estudos macroanatômicos

Talvez um dos primeiros estudos sobre a descrição da inervação parassimpática nas vísceras abdominais vem de dissecações humanas de Swan (1834), o qual descreveu terminações do ramo vagal posterior (dorsal) no plexo celíaco, sendo confirmado em estudos macroscópicos posteriores ao longo do século XIX.

Com o avanço das técnicas de histoquímica, Hammar (1935), utilizando-se da técnica de Golgi, mostrou a presença de uma conexão nervo vago-gânglio celíaco em embriões humanos. Porém, o autor não detalhou sua técnica, e seus achados não puderam ser satisfatoriamente reproduzidos (para comentários, ver Mosimann, 1954). Em 1937, Colouma mostrou as variações anatômicas existentes do nervo vago em um total de 48 dissecações humanas e 131 dissecações de diversas ordens de animais, mostrando a existência da conexão nervo vago-gânglio celíaco em todos eles. Por outro lado, Kuntz (1938) mostrou que o corte do nervo vago em gatos não altera o número de feixes terminais ou as conexões sinápticas encontradas dentro do gânglio celíaco (pelo mecanismo de degeneração Walleriana), sugerindo a ausência da conexão vago-celíaca. Mosiman (1954) estudou as ramificações subdiafragmáticas do nervo vago demonstrando a presença de poucas ou mesmo ausência de fibras vagais inervando o plexo celíaco. Alguns estudos demonstraram ainda uma conexão nervo vago-gânglio celíaco (McCrea 1924, Glaser 1928, Dale e Dudley 1929, Colouma 1937, Mitchell 1938, Clara 1942, Greene 1963, Baljet e Drukker 1979, Boekelaar 1985), e outros não encontraram qualquer

tipo de conexão (Utterback 1944, Jackson 1949, Mosimann 1954, Niederhausern 1954, Hamer e Santer 1981) (Tabela 3).

Apesar desses estudos apresentarem dados inconclusivos em relação à inervação do nervo vago para o gânglio celíaco, os estudos sobre a conexão gânglio celíaco-baço são menos controversos devido aos vários estudos neuroanatômicos em diferentes espécies de animais, incluindo gatos (Gillespie e Kirpekar 1966, Fillenz 1970), roedores (Reilly et al. 1979) e humanos (Kudoh et al. 1979). Coletivamente estes estudos demonstram que fonte da inervação do baço provém dos troncos simpáticos torácicos que originam nervos esplâncnicos (maior e menor), os quais inervam o complexo CCMS, cujos corpos celulares formam o nervo esplênico (Bellinger et al. 1989, Nance e Burns 1989).

Tabela 3. Estudos neuroanatômicos da conexão nervo vago - gânglio celíaco.

Autor	Modelo animal	Técnica	Conexão vago-celíaco?
(Swan 1834)	humano	Dissecação	Sim
(Bourgery 1844)	humano	Dissecação	Sim
(Kollman 1860)	Coelho, gato, cão, humano	Dissecação	Sim
(Ellenberger e Baum 1891)	Cão	Dissecação	Sim
(Luschka 1867)	Humano	Dissecação	Sim
(Krause 1884)	Cão	Dissecação	Sim
(Mivart 1881)	Gato	Dissecação	Sim
(Jonnesco 1889)	Humano	Dissecação	Sim
(Sobotta 1911)	Humano	Dissecação	Sim
(Spalteholz 1910)	Humano	Dissecação	Sim
(Perman 1916)	Humano	Dissecação	Não
(Latarjet 1922)	Humano	Dissecação	Sim
(McCrea 1924)	Coelho, gato, cão, humano	Dissecação	Não
(Glaser 1928)	Coelho, porco, vaca, humano, cobaia	Impregnação por Ag ⁺	Sim
(Hammar 1935)	Fetos humanos	Impregnação por Ag ⁺	Não
(Colouma 1937)	Mamíferos em geral	Dissecação	Sim
(Kuntz 1938)	Humano, gato	Vagotomia subdiafragmática (degeneração Walleriana)	Não
(Mitchell 1938)	Humano	Dissecação	Sim
(Clara 1942)	Humano	Dissecação	Sim
(Utterback 1944)	Gato	Vagotomia subdiafragmática (degeneração Walleriana)	Não
(Jackson 1949)	Humano	Dissecação	Não
(Niederhausern 1954)	Humano	Dissecação	Não
(Mosimann 1954)	Rato	Impregnação por Ag ⁺	Não
(Mizeres 1955)	Cão	Dissecação	Sim
(Greene 1963)	Rato	Dissecação	Sim
(Baljet e Drukker 1979)	Rato	Acetilcolinesterase	Sim
(Hamer e Santer 1981)	Rato	Dissecação	Não
(Boekelaar 1985)	Humano e rato	Acetilcolinesterase	Sim

1.11.2. Estudos de neurotraçamento

Com o advento de neurotraçadores (e não somente a anatomia macroscópica estática), novos estudos puderam ser feitos em relação à inervação do baço. Nance e Burns (1989) utilizaram Fluorogold (FGo) ou o neurotraçador fluorescente *Fast Blue* injetados no baço de ratas, e identificaram células marcadas no CCMS, mas não no gânglio nodoso (o qual contém os corpos dos neurônios aferentes do NV em rota para o encéfalo). Berthoud e Powley (1993), injetando o neurotraçador DiL (um neurotraçador bidirecional) no gânglio nodoso esquerdo ou no núcleo motor dorsal do vago (DMN - o qual contém os corpos celulares dos neurônios pré-ganglionares parassimpáticos em rota para as vísceras periféricas), mostrou que somente as injeções de DiL no DMN marcavam as células dos gânglios pré-vertebrais abdominais. Porém nenhuma marcação periférica foi observada após a injeção de DiL no gânglio nodoso.

Chen e colaboradores (1996), injetando o neurotraçador WGA-HRP (*wheat germ agglutinin-conjugated horseradish peroxidase*) no baço de gatos, mostrou uma intensa marcação do traçador no gânglio celíaco e no DMN. Porém, os autores não analisaram a presença de corpos neuroniais marcados no gânglio nodoso. Cano e colaboradores (2001), por meio da técnica de traçamento com vírus da raiva atenuado (PRV – *pseudorabies virus*) injetado no baço de ratos, mostrou a inexistência de qualquer tipo de marcação no nervo vago, incluindo o gânglio nodoso, propondo a inexistência da conexão vago-baço. Buijs e colaboradores (2008) e Cailotto e colaboradores (2012), utilizando-se da técnica de traçamento por toxina colérica B (CTB – *cholera toxin B* – um marcador neuronal retrógrado), mostraram a presença de uma inervação vagal-esplênica localizada nas pontas do baço. Por fim, Bratton e colaboradores (2012), injetando *Fast Blue* no baço e DiL na divisão dorsal do bulbo (o qual contém neurônios vagais pré-ganglionares) não encontraram qualquer evidência de uma conexão nervo vago-gânglio celíaco-baço. A Tabela 4 mostra uma visão geral desses estudos.

Tabela 4. Estudos de neurotraçamento da conexão nervo vago - gânglio celíaco. CTB: toxina colérica B; DMN: núcleo motor dorsal do vago; FGo: FluoroGold; Gl: gânglio; IML: coluna intermédio-lateral da medula espinal PRV: vírus da raiva atenuado.

Autor	Modelo Animal	Técnica	Local de injeção	Local de observação	Conexão vago-celíaco?
(Nance e Burns 1989)	Rato	FGo Fast-blue	Baço	Gls. mesentéricos e nodoso	Não
(Berthoud e Powley 1993)	Rato	DiL FGo	DMN	Gls. pré-vertebrais	Sim
(Chen et al. 1996)	Gato	WGA-HRP	Baço	DMN	Não
(Cano et al. 2001)	Rato	PRV	Baço	Gls. Nodoso	Não
(Buijs et al. 2008)	Rato	PRV	Baço	IML DMN	Sim
(Cailotto et al. 2012)	Camundongo	CTB	Baço Int. delgado	NTS DMN	Sim
(Bratton et al. 2012)	Rato	DiL Fast-blue	Baço DMN	Gls. celíaco e suprarrenal	Não

1.11.3. Estudos Neurofisiológicos

Apesar dos dados macroanatômicos e de neurotraçamento serem incongruentes entre si, outros estudos utilizaram técnicas mais práticas para provar a existência de uma conexão nervo vago-gânglio celíaco-baço. Entre eles, a avaliação da atividade de um nervo permite a observação da atividade de um determinado nervo após um estímulo distal ou proximal. Desse modo, Bratton e colaboradores efetuaram a ENV e observaram aumento na atividade do nervo esplênico em ratos. Porém quando a informação provinda da ENV foi impedida de alcançar o encéfalo por meio da lesão do NV cranialmente aos eletrodos, a atividade do nervo esplênico não se alterou (Figura 19). Os autores então concluíram que uma conexão neural funcional entre o NV e o baço não existe periféricamente, porém não descartaram a possibilidade da existência de uma conexão central via encéfalo e medula espinal.

Figura 19. A ENV aferente influencia a atividade simpática. Atividade neuronal média a partir de registros do nervo esplênico em resposta a uma estimulação supramáxima do nervo vago cervical esquerdo intacto (traçado superior) e após uma lesão cranial ao eletrodo (traçado inferior). Perceba que a atividade do nervo esplênico após a ENV não aumentou após a lesão cranial do NV. Adaptado de Bratton et al. (2012).

A partir ponto de vista neuroquímico, se admitirmos que uma conexão nervo vago-gânglio celíaco-baço é verdadeira, a ENV deveria aumentar a liberação de NA no baço, pois os nervo esplênico seria influenciado pela atividade vagal. Em 2011, Vida e colaboradores mostraram que a estimulação do NV intacto aumentou os níveis plasmáticos de adrenalina (AD) e NA, e que esse efeito foi abolido após a desnervação do baço (Vida et al. 2011). Além disso, os autores mostraram que a estimulação elétrica do nervo esplênico aumenta os níveis de NA (mas não de AD), propondo que o baço é a principal fonte de NA plasmática. De fato, estudos anteriores relataram que a remoção cirúrgica do CCMS, mas não a vagotomia subdiafragmática, diminui os níveis fisiológicos de NA no baço, indicando que os eferentes vagais não modulam a atividade simpática do baço (Bellinger et al. 1989, 1993, Nance e Burns 1989).

De destaque no estudo de Vida e colaboradores, a ENV eferente não aumentou os níveis plasmáticos de AD (Figura 20), corroborando estudos anteriores (Maycock e Heslop 1939). A principal fonte de AD no organismo são as glândulas adrenais, e vários estudos anatômicos (Teitelbaum 1942), eletrofisiológicos (Nijima 1992) e de neurotraçamento (Coupland et al. 1989) mostram que as adrenais podem ser estimuladas via fibras aferentes vagais. Por outro lado, as glândulas adrenais também recebem densa inervação simpática provinda do gânglio celíaco (Kuo et al. 1982, Kesse et al. 1988, Mohamed et al. 1988, Nijima 1992), e outros estudos mostraram que a estimulação do nervo renal ou dos nervos esplâncnicos (cujos axônios terminam no gânglio celíaco) aumenta a concentração de AD no plasma (Kuo et al. 1982, Bornstein et al. 1990, Diego et al. 2007).

De fato, estudos mostram que a ENV aferente ou no NV intacto aumenta reflexamente a atividade simpática (incluindo as glândulas adrenais) por meio de uma via neural central (Parker et al. 1993, Engeland 1998, Bratton et al. 2012, Martelli et al. 2014a). Portanto, podemos supor que há uma via central ativada após a ENV que pode

estar envolvida na modulação dos níveis plasmáticos de NA e AD, e na modulação da resposta imune .

Figura 20. A ENV aumenta os níveis séricos de catecolaminas. Efeitos de dois tipos de estimulação elétrica vagal (ENV) sobre os níveis plasmáticos de adrenalina (AD) e noradrenalina (NA) em camundongos. A ENV no nervo vago intacto aumento ambos níveis de AD e NA, porém a ENV eferente somente aumenta os níveis plasmáticos de NA. Adaptado de Vida et al. (2001).

1.11.4. O papel do baço na resposta imune

Estudos têm demonstrando que a esplenectomia tem um papel protetor (anti-inflamatório) (Bachman et al. 2005), neutro (Tanaka et al. 1992, Mizukami et al. 1999) ou pró-inflamatório (Ji et al. 2014, Torres-Rosas et al. 2014) em modelos de inflamação sistêmica. De fato, a remoção do baço não altera os níveis plasmáticos basais de TNF- α (Deriy et al. 2002), mas aumenta os níveis de citocinas do tipo Th1, tais como IL-2, IL-12 e IFN- γ , mas não das Th2, tais como IL-4 e IL-10, e de TNF- α no modelo de sepse polimicrobial (CLP – cécum ligated e perfuration) (Huston et al. 2008). Além disso, a contagem de neutrófilos no sangue periférico encontra-se elevada em animais (Sipka et al. 2006, Huston et al. 2008) e em pacientes esplenectomizados (Spiers et al. 1975). Shih-Ching e colaboradores (2004) sugerem que o papel do baço em modular uma resposta inflamatória é dependente do compartimento corporal. Os autores observaram que células de Kupfer e macrófagos peritoniais e alveolares obtidos de animais esplenectomizados produzem mais citocinas após estimulação com LPS, porém esse efeito não era observado em células mononucleares provindas do sangue e de linfonodos mesentéricos desses animais (Shih-Ching et al. 2004). Por outro lado, estudos mostram que animais esplenectomizados submetidos à endotoxemia apresentam redução nos níveis de citocinas circulantes (Erb et al. 1997, Moeniralam et al. 1997, Borovikova et al. 2000, Altamura et al. 2001, Deriy et al. 2002, Shih-Ching et al. 2004).

De fato, estudos demonstraram a importância do baço no *clearance* de antígenos sanguíneos dependente da via de entrada no organismo: quando antígenos são administrados intravenosamente tendem a se acumular no baço e fígado, enquanto que aqueles administrados por outras vias, tais como pele, mucosas, parênquima e cartilagem, tendem a se acumular nos linfonodos (Altamura et al. 2001, Jirillo et al. 2003). Quando o processo inflamatório é confinado e não alcança a circulação sistêmica, o efeito anti-inflamatório da ENV funciona independentemente do baço. Por exemplo, no modelo

experimental de queimadura de pele, a esplenectomia diminuiu os níveis plasmáticos de TNF- α ; mas não alterou a permeabilidade intestinal e os níveis de TNF- α intestinais (Costantini et al. 2010), e no modelo experimental de manipulação intestinal, os efeitos anti-inflamatórios da ENV não dependeram da integridade do baço ou de células T, mas da resposta imune gastrointestinal (Matteoli et al. 2013). Outros estudos que utilizaram a ENV evidenciaram a irrelevância do baço em diversos modelos inflamatórios, tais como queimadura de pele (Ortiz-Pomales et al. 2013), lesão pulmonar (Levy et al. 2013) e inflamação articular (Levy et al. 2013, Bassi et al. 2015), sugerindo que a participação do baço no efeito da ENV depende do local de instalação do processo inflamatório (Tabela 5).

Como somente modelos experimentais de inflamação sistêmica foram utilizados para mostrar uma conexão vagal-celíaca-baço, é improvável que uma conexão nervo vago-gânglio celíaco-baço possa ser suportada somente através de modelos de inflamação sistêmica.

Tabela 5. Estudos da esplenectomia na modulação da resposta imune. ART: articulação; COR: coração; INTES: intestino grosso + delgado; INTG: intestino grosso; PLA: plasma; PUL: pulmão; ↑: aumento dos parâmetros; ↓: diminuição dos parâmetros; i.p.: intraperitoneal; i.v.: intravenoso; i.a.: intra-articular. * ver detalhes no texto; **estimulação do nervo isquiático

Autor	Cirurgia	Estímulo	Parâmetros inflamatórios	Efeito	Inibe efeitos da ENV?
Tanaka et al., 1992	SPX	LPS 2mg/Kg (i.v.)	TNF (PLA)	↓	Não realizado
Kummins et al., 1996	SPX	LPS 10-100µg (i.v.)	TNF (PLA)	Igual ao controle	Não realizado
Kohno et al., 1997	SPX	LPS 10mg/Kg (i.v.)	TNF (PLA)	Igual ao controle	Não realizado
Mizukami et al., 1999	SPX	LPS 2mg/Kg (i.v.)	TNF-α, superóxido, IL-18 (PLA)	↓	Não realizado
Deriy et al., 2002	SPX	LPS (i.v.) 10µg-5mg/Kg	TNF, IFN-γ (PLA)	Igual ao controle	Não realizado
Bachman et al., 2005	SPX	LPS 1mg/Kg (i.v.)	TNF-α, IL-10, IFN-γ (PLA)	↓	Não realizado
Torres et al., 2005	SPX	LPS 15mg/Kg (i.p.)	TNF-α, IL-6, IL-10 (PLA)	Igual ao controle	Não realizado
Huston et al., 2006	SPX	LPS 7-15 mg/Kg (i.p.)	TNF (PLA, BAÇO)	Igual ao controle	SIM
Sipka et al., 2006	SPX	(-)	Linfócitos (SANGUE)	↑ (após 8 meses)	Não realizado
Constantini et al., 2010	SPX	Queimadura	Permeabilidade intestinal	↑	NÃO
			TNF-α (PLA,INTES)	↓ PLA ↑ INTES	
Rosas-Ballina et al., 2008	SNX	LPS 10mg/Kg (i.p.)	TNF-α (PLA, BAÇO)	Igual ao controle	SIM
Huston et al., 2008	SPX	Sepse polimicrobial	HMGB1, IL-12, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-10 (PLA)	↓ HMGB1 ↑, IL-12, IFN-γ, IL-2	Não realizado
Huston et al., 2009	SNX	Sepse polimicrobial bolha de ar	Neutrófilos CD11b+ (PLA)	Igual ao controle	SIM
Constantini et al., 2012	SPX	Queimadura	Permeabilidade intestinal (INTES)	Igual ao controle	Não realizado
Ortiz-Pomales et al., 2012	SPX	Queimadura	Permeabilidade vascular (PELE, PUL)	Não avaliado	NÃO
Levy et al., 2013	SPX	Choque hemorrágico	TNF, MPO, Permeabilidade (LN, PUL, INTEST, PLA)	Igual ao controle	NÃO
Costes et al., 2014	SNX	Manipulação intestinal	Quimiocinas (PLA, INTES)	Manteve nível de CCL9 (↓ no controle)	Não realizado
Costes et al., 2014	SNX	Manipulação intestinal	TNF-α, IL-1β, IL-6, MPO, IL-10, TGF-β (INTES)	Igual ao controle	NÃO
Ji et al., 2014	SPX SNX	Colite (DSS)	TNF-α, IL-1β, IL-6 (INTG, PLA)	SPX: igual ao controle NX: ↑	Não realizado
Matteoli et al., 2014	SNX	Manipulação intestinal	TNF-α (INTES)	Igual ao controle	SIM
Torres-Rosa et al., 2014	SPX	LPS 6mg/Kg (i.p.)	TNF (PLA)	Igual ao controle	NÃO**
Bassi et al., 2015	SPX	Zimosan 100µg (i.a.)	TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, neutrophils (ART)	↑	NÃO

1.11.5. A atividade simpática na inflamação

A administração sistêmica de LPS ou IL-1 β pode aumentar a atividade de nervos simpáticos como o esplênico, esplâncnico e renal (Saigusa et al. 1989, Niijima et al. 1991, MacNeil et al. 1996, Ohashi e Saigusa 1997, Saindon et al. 2001, Bratton et al. 2012, Martelli et al. 2014a). De fato, a injeção i.c.v de PGE₂ ou de citocinas pró-inflamatórias aumenta a atividade neuronal simpática (Saigusa et al. 1989, Katafuchi et al. 1991, 1993, Ichijo et al. 1994, Lu et al. 2003, Helwig et al. 2008), sugerindo que mecanismos inflamatórios centrais podem também estar envolvidos na modulação da atividade simpática durante eventos inflamatórios sistêmicos (MacNeil et al. 1997).

1.12. Limitações dos Modelos de Inflamação Sistêmica na VCA

1.12.1. Processos inflamatórios de alta intensidade não dependem do NV para ativar o reflexo inflamatório

A avaliação da resposta febril é uma ferramenta muito sensível para avaliar a ativação do reflexo inflamatório e o papel do nervo vago na comunicação neuroimune. A administração de doses muito baixas de endotoxina em roedores (<1 μ g/Kg) e humanos (>2ng/Kg) induz febre (Tabela 6). Além disso baixas doses de endotoxinas leva à ativação de áreas encefálicas relacionadas à atividade vagal, como o núcleo do trato solitário (NTS) e o núcleo motor dorsal do vago (DMN), enquanto doses mais altas (mg/Kg) passam a ativar também estruturas mais prosencefálicas (tais como o hipotálamo e córtex cerebral) (Sehic e Blatteis 1996, Bluthe et al. 1996, Opp e Toth 1998, Caldwell et al. 1999, Bernik 2002, Romanovsky et al. 2005, Fuentes et al. 2005, Mihaylova et al. 2012, Martelli et al. 2014b), sugerindo um mecanismo hierárquico que detecção da inflamação periférica dependendo da intensidade do estímulo (ver tópico 1.12.). De fato, os primeiros estudos que relataram o efeito anti-inflamatório da ENV utilizaram doses altas de LPS (mg/Kg), nos quais a estimulação vagal reduziu os níveis sistêmicos de TNF em ratos

endotoxêmicos (15mg/Kg de LPS, i.v.) por um mecanismo que depende da presença do baço e de sua inervação simpática (Borovikova et al. 2000, Huston et al. 2006, 2008, Rosas-Ballina et al. 2008, Ji et al. 2014) (Tabela 6).

Tabela 6. Estudos da vagotomia na resposta febril. TRU: vagotomia truncal; HEP: corte do ramo vagal hepático; GAST: corte do ramo vagal gástrico; CEL: corte do ramo vagal celíaco. i.p.: intraperitoneal; i.v.: intravenoso; i.a.: intra-articular.

Autor	Tipo de vagotomia	Pirógeno	Via	Efeito na febre
Bluthe et al., 1994	TRU	LPS 1.25mg/Kg	i.p.	Bloqueio
Watkins et al., 1994	HEP	LPS 0.2 – 2mg/Kg	i.p.	Bloqueio
	TRU			
Watkins et al., 1995	HEP	IL-1 β 2 μ g/Kg	i.p.	atenuação
	TRU			
Sehic & Blatteis, 1996	TRU	LPS 2 μ g/Kg	i.v.	Bloqueio
Goldbach et al., 1997	TRU	LPS - 30 μ g/Kg MDP - 150 μ g/Kg	i.v. i.m. i.p.	Bloqueio nas doses i.p.
Hansen & Krueger, 1997	TRU	IL-1 β 0.1 - 2.5 μ g/Kg	i.p.	Bloqueio, exceto para a dose de 2.5 μ g/Kg
Romanovsky et al., 1997	TRU	LPS 1 μ g/Kg	i.v.	Bloqueio
Romanovsky et al., 1997	TRU	LPS 1, 10, 100, 1000 μ g/Kg	i.v.	Bloqueio em 1 μ g/Kg
Fleshner et al., 1998	TRU	IL-1 β - 1.4 μ g/Kg TNF- α - 200 – 500 μ g/Kg	i.v.	Bloqueio (doses mais baixas)
Kápas et al., 1998	TRU	LPS 2mg/Kg	i.p.	atenuação
Opp & Toth, 1998	TRU	IL-1 β - 2 μ g/Kg LPS - 0.4 mg/Kg	i.v.	Atenuação
Simons et al., 1998	CEL	LPS 1 μ g/Kg	i.v.	Igual a controle
	GAST			Igual ao controle
	HEP			Bloqueio
Caldwell et al., 1999	TRU	LPS 20, 50 μ g/Kg	i.a. i.v. i.p.	Igual ao controle
Gaykema et al., 2000	TRU	IL-1 β 1 μ g/Kg	i.p.	Bloqueio
Gordon & Rowsey, 2000	TRU	LPS 50 μ g/Kg	i.p.	Bloqueio
Hansen et al., 2000	TRU	LPS 1, 10, 50 μ g/Kg	i.p.	Igual ao controle
Konsman et al., 2000	TRU	IL-1 β - 25 μ g/Kg LPS - 250 μ g/Kg	i.p.	Igual ao controle
Koultchitsky, 2000	TRU	LPS 3 μ g/Kg	i.p.	Bloqueio
Luheshi et al., 2000	TRU	IL-1 β 1, 3, 10, 30 μ g/Kg	i.p.	Igual ao controle
Romanovsky et al., 2000	TRU	LPS 10 μ g/Kg	i.p.	Atenuação
Romanovsky et al., 2000 Székely et al., 2000	Rizotomia	LPS 10 μ g/Kg	i.p. i.v.	Atenuação
	TRU			
Azab & Kaplansky, 2001	TRU	LPS 200 - 1000 μ g/Kg	i.p.	Bloqueio na dose mais baixa
Hansen et al., 2001	TRU	IL-1 β 0.1 – 1 μ g/Kg	i.p.	Bloqueio em 0.1 μ g/Kg Atenuação em 0.5 μ g/Kg
Werner et al., 2003	TRU	LPS 0.02, 0.2, 2, 20, 200 μ g/Kg	i.p.	Bloqueio em doses mais baixas
Turek et al., 2005	TRU	LPS 50 μ g/Kg	i.p.	Bloqueio

Além disso, o tempo de recuperação após a vagotomia (cervical ou do tronco abdominal) pode influenciar a resposta imune periférica: quando realizada < de 24h ou > de 24h antes da endotoxemia ocorre redução e aumento nos níveis de TNF- α séricos, respectivamente, sugerindo que avagotomia por si já leva à despolarização axonal e consequente ativação da VCA (Westerloo e Poll 2005). De fato, estudos que permitiram um período de recuperação cirúrgica < 24 horas em modelos experimentais de inflamação sistêmica mostram dados contraditórios (Tabela 7).

Tabela 7. Efeito da vagotomia sobre a resposta imune. Relação dos estudos da vagotomia (VNX) em vários modelos experimentais de inflamação. CER: cervical; COR: coração; INTES: intestino grosso + delgado; INTG: intestino grosso; PERIT: peritônio; PLA: plasma; PUL: pulmão; TRU: vagotomia do tronco abdominal; VNX: vagotomia; ↑: aumento dos parâmetros; ↓: diminuição dos parâmetros; i.p.: intraperitoneal; i.v.: intravenoso.

Autor	Tipo de VNX	Tempo de recuperação o cirúrgica	Modelo inflamatório	Parâmetros inflamatórios	Efeito
Caldwell et al., 1999	TRU	12 dias	LPS 20 ug/Kg (i.v.) 50 ug/Kg (i.p.)	TNF- α , IL-1 β e IL-6 (PLA)	Sem efeito
Borovikova et al., 2000	CER	10 min	LPS 15mg/Kg (i.v.)	TNF (PLA)	↑
Bernik et al., 2002	CER	10 min	LPS 50-60mg/Kg (i.v.)	TNF (PLA)	Sem efeito
Guarini et al., 2003	CER	Durante o experimento	Choque hemorrágico	TNF- α , NF- κ B e IkB α – (PLA)	Sem efeito
Francis et al., 2004	CER	1 hora	Infarto miocárdico	TNF- α e IL-1 β (PLA, COR, BRAIN)	↓ PLA ↓ COR ↑ CER
Fuentes et al., 2005	CER	24 horas	LPS 8mg/Kg (i.p.)	TNF- α , IL-6, IL-10 (PLA)	↑
Van Westerloo et al. 2005	CER	24 horas	Peritonite séptica	TNF- α , IL-1 β , IL-6 (PLA)	↑
Van Westerloo & van der Pool, 2005	CER	30 min	LPS 10mg/Kg (i.v.)	TNF (PLA)	↓
		3 dias			↑
Ghia et al., 2006	TRU	10 dias	Colite (DSS 5%)	TNF- α , IL-1 β , IL-6 (INTG)	↑
Kessler et al., 2006	TRU	Durante o experimento	Peritonite	TNF- α , MCP-1, IL-10, IL-6 (PLA)	↑
Van Westerloo et al., 2006	CER	3 dias	Pancreatite	Amilase e lipase (PLA)	↑
Huston et al., 2007	TRU	7 dias	CLP	TNF- α (PLA)	Sem efeito
Dos Santos et al., 2011	CER	Durante o experimento	Lesão mecânica pulmonar	Macrófagos, neutrófilos, IL-6 (PUL)	↑
McQueen et al., 2007	CER	10 min	Inflamação pulmonary	Contagem de neutrófilos (PUL)	↓
Kessler et al., 2012	TRU	7 dias	Peritonite	Cortisol (Cort) TNF- α (PLA)	↑ Cort ↓ TNF- α
Kox et al., 2012	CER	3 min	LPS 10mg/Kg (i.v.)	TNF- α , IL-10 (PUL)	↑
Mihaylova et al., 2012	CER	10 min	LPS 5mg/Kg (i.v.)	TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 (PLA)	↑
Martelli et al., 2014	CER	90 min	LPS 60ug (i.v.)	TNF- α e cortisona (PLA)	Sem efeito
Mirakaj et al., 2014	CER	7 dias	Zymosan 1mg/Ml (i.p.)	TNF, IL-6, KC, MIP-1 α , HMGB1 (PERIT)	↑
Mitsui et al., 2014	TRU	14 dias	(-)	IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-6, MCP-1, IL-10 (PLA)	↑ no dia 14
O'Mahony et al., 2009	TRU	2 sem	Colite (DSS 4%)	IL-6, TNF- α , MCP-1 (INTG)	↑
The e tal., 2011	TRU	30 min	Manipulação intestinal	MPO (INTES)	↑
Ji et al., 2014	CER	10 dias	Colite	MPO, TNF- α , IL-1 β , IL-6 (INTG)	↑
Mihaylova et al., 2014	CER	10 min	LPS 5mg/Kg (i.v.)	TNF- α , IFN- γ , IL-10, CCL-5 (PLA, BAÇO)	↑

Em resumo, modelos de sepse ou endotoxemia não são ferramentas experimentais confiáveis de prova de uma via nervo vago-gânglio celíaco-baço (VCA), deixando em aberto a existência de outras possíveis vias neuroimunes ainda não descobertas.

1.12.2. Via neuroimune simpática

Apesar de estudos mostrarem que a estimulação eferente do NV possui efeito anti-inflamatório (Borovikova et al. 2000, Bernik 2002, Guarini et al. 2003), esse efeito pode ser devido a outros mecanismos do que a via eferente proposta pelo grupo do Kevin Tracey (2002). Como o NV inerva diretamente outras vísceras abdominais envolvidas com a atividade simpática em geral, tais como as glândulas adrenais (Teitelbaum 1933, Coupland et al. 1989), outras estruturas podem estar envolvidas na modulação vagal da inflamação.

Recentes estudos evidenciam que a atividade do nervo esplênico aumenta somente durante a ENV aferente (para o encéfalo) (Bratton et al. 2012) (Figura 19) e a vagotomia cervical impede a ativação do NTS após a administração de endotoxina i.p., sem inibir o aumento da atividade no nervo esplênico, sugerindo uma via neuroimune que não depende da ativação da VCA (Martelli et al. 2014a). Além disso, as glândulas adrenais, as quais recebem aferências do NV (Teitelbaum 1933, Coupland et al. 1989), tem um papel importante no controle da resposta imune, o que sugere uma nova via neuroimune dependente das glândulas adrenais (Torres-Rosas et al. 2014).

Todos os dados apresentados até aqui sugerem a presença de um outro mecanismo neuroimune que pode estar envolvido, em maior ou menor grau, na modulação da inflamação periférica. Até o momento, poucos trabalhos abordaram o papel do SNC no controle da inflamação localizada.

1.13. Uma Nova Possível Via Neural Para o Reflexo Inflamatório

1.13.1. Estruturas neurais centrais ativadas durante a ENV

Estudos mostram que a ENV cervical aumenta a expressão de c-Fos em vários núcleos encefálicos que contém os corpos neuroniais do NV, tais como o NTS, AP e DMN (Yousfi-Malki e Puizillout 1994, Naritoku et al. 1995, Cunningham et al. 2008), e também em áreas envolvidas com a modulação da atividade simpática, tais como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e o locus coeruleus (LC) (Naritoku et al. 1995, Cunningham et al. 2008) (Tabela 8). De fato, estudos eletrofisiológicos e de neurotraçamento mostram que a ENV aumenta a atividade de núcleos supramedulares envolvidos com a modulação simpática e de neurônios pré-ganglionares localizados na medula espinal (Hilton e Spyer 1971, Van Bockstaele et al. 1999, Coote 2004). Desse modo, apesar de amplamente aceito que a ENV reduz a inflamação por meio de estruturas e mecanismos periféricos, podemos sugerir que o efeito anti-inflamatório da ENV pode ser devido, total ou parcialmente, à ativação de estruturas supra-medulares.

Tabela 8. ENV e o aumento da expressão de c-Fos no encéfalo. AP: área postrema; BLA: núcleo basolateral da amígdala; BNST: núcleo leito da estria terminal; Cing: córtex cingulado, CortA: núcleo cortical anterior da amígdala; DMN: núcleo motor dorsal do vago, DRN: núcleo dorsal da rafe; Frontal: córtex frontal, Hab: habênula; Hip: hipocampo; LC: locus ceruleus, NA: núcleo ambíguo; NTS: núcleo do trato solitário; Occ: córtex occipital, PbN: núcleo parabraquial; Perirr: córtex perirrinal, PTN: núcleo paratrigeminal; PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo; Thal: tálamo, TSN: núcleo trigeminal espinal; VLM: bulbo rostro-ventro-medial; F: frequência (Hz); i: intensidade (A); a: largura do pulso (ms); T: tempo de estimulação.

Autor	Espécie	Parâmetro da ENV	Tempo de coleta pós-ENV	Áreas marcadas
(Rutherford et al. 1992)	Sprague-Dawley	F: 10-20Hz i: 0.7ms l: 1-2ms T: 1 pulso/min/30min	30 minutos	AP, NTS, VLM, PTN
(Yousfi-Malki e Puizillout 1994)	coelho	F: 10Hz i: 2mA l: 0.1ms T: 15 min	2 horas	AP, NA, NTS, LCMC, TSN
(Naritoku et al., 1995)	Sprague-Dawley	F: 30Hz i: 1.0mA l: 0.5ms T: 30seg/5min/3horas	Imediatamente após	Cing, Coel, CortA, DMN, Hab, LC, NTS, Occ, Perirr, PTN, Thal,
(Osharina et al. 2006)	Sprague-Dawley	F: 1-10Hz i: 0.2mA l: 0.5ms T: 0.5ms/10min/2,5h	2,5 hora	AP, NTS, obex
(Cunningham et al., 2008)	Sprague-Dawley	F: 20Hz i: 0.25mA l: 0.25ms T: 30seg/5min/2h	30 min	BNST, LC, NTS, PbN, PVN,
(Furmaga et al. 2012)	Sprague-Dawley	F: 20Hz i: 0.25mA l: 0.25ms T: 30seg/5min/2semanas	2 semanas	BLA, Cing, DRN, Frontal, Hip, LC, NA, NTS, PbN
(Rijkers et al. 2012)	Sprague-Dawley	F: 30Hz i: 1.0mA l: 0.5ms T: 30seg/12seg/3min	48 horas (Δ fosB)	LC, NTS, PbN

1.13.2. Estruturas neurais centrais ativadas durante o processo inflamatório

Estudos mostram que certas regiões do SNC podem responder a um evento imunológico. A utilização de técnicas de eletrofisiologia permitiram observar o aumento na atividade neuronal em diferentes áreas do encéfalo de ratos, tais como hipotálamo, hipocampo e NTS após imunização (Besedovsky et al. 1977, 1983, Saphier et al. 1987) (Figura 21), sugerindo a presença de uma rede complexa entre os sistemas neuroendócrino e imunológico.

Através da utilização de imunomarcadores neuronais, Elmquist e colaboradores (1993) mostraram que administração periférica de endotoxina aumentou a expressão da proteína c-Fos (proteína expressa em neurônios ativados) em várias áreas encefálicas, tais como NTS, amígdala e órgãos circunventriculares, tais como os núcleos hipotalâmicos paraventricular (PVN) e supraóptico (SON). Em 1994, Ericsson e colaboradores mostraram que processos inflamatórios de baixa intensidade aumentam a expressão de c-Fos em áreas relacionadas principalmente à atividade vagal (NTS e núcleo parabraquial – PbN) (Ericsson et al. 1994). À medida que a inflamação se agrava, as estruturas que pertencem ou estão em proximidade aos órgãos circunventriculares são ativadas, como o PVN, SON e o órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), sugerindo uma ativação neuronal hierárquica à medida que o processo inflamatório se intensifica (Figura 22). De fato, processos inflamatórios de baixa intensidade ativam estruturas encefálicas mais antigas e envolvidas com comportamentos de autopreservação, tais como núcleos do tronco encefálico (NTS e PbN) e da amígdala (Figura 22 e Tabela 9). À medida que o processo inflamatório se intensifica, a expressão de c-Fos é aumentada em outras áreas além daquelas envolvidas com a atividade vagal, como estruturas relacionadas à atividade autonômica e endócrina, sugerindo que algumas dessas estruturas podem modular, em maior ou menor grau, a resposta imune periférica.

Figura 21. Efeito da imunização na resposta da atividade neuronal. A imunização de ratos com eritrócitos de ovelhas aumenta a atividade em neurônios localizados no hipotálamo, tais como (A) o núcleo ventromedial, (B) hipotálamo anterior (linhas pontilhadas) e (B) núcleo paraventricular (PVN - linhas contínuas). A: adaptado de Besedovsky e Sorkin, 1977; B: adaptado de Saphier et al (1987).

Figura 22. Indução de c-Fos no encéfalo em relação à intensidade inflamatória. A indução de c-Fos em várias áreas do encéfalo por meio da injeção i.v. de IL-1 β aumenta conforme o processo inflamatório se intensifica. As barras representam os níveis de dosagem de IL-1 β necessárias para produzir uma expressão significativa de c-Fos em relação ao grupo controle. SON: núcleo supra-óptico do hipotálamo; BNST: núcleo leito da estria terminal; CeA: núcleo central da amígdala; PbN: núcleo parabraquial; NTS: núcleo do trato solitário; OVLT: órgão vascular da lâmina terminal. Adaptado de Ericsson et al., 1994.

Tabela 9. Expressão de c-Fos no encéfalo após uma resposta imune periférica. AcN: núcleo acumbente; AP: área postrema; BNST: núcleo leito da estria terminal; CeA: núcleo central da amígdala; Cg: giro cingulado; DMH: núcleo dorsomedial do hipotálamo; Hippo: hipocampo; LC: locus coeruleus; LH: hipotálamo lateral; LS: septo lateral; MeA: núcleo medual da amígdala; NTS: núcleo do trato solitário; OVLT: órgão vascular da lâmina terminal; PbN: núcleo parabraquial; POA: área pré-óptica; PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo; RVLM: bulbo rostro-ventro-lateral; SFO: órgão subfornical; SON: núcleo supraóptico; Subf: órgão subfornical; i.p.: intraperitoneal; i.v.: intravenoso. * expressão de c-Fos somente nas doses mais altas do composto inflamatório.

Autor	Composto inflamatório	Áreas ativadas
(Elmqvist et al. 1993)	LPS 1 ou 7µg/g	PVN, SON, BNST, LH, CeA, AcN, DMH, LC, NTS, PbN, AP, Subf, OVLT
(Wan et al. 1994)	LPS 100µg (i.p.)	PVN, núcleos A1/A2, AcN, SON,
(Brady et al. 1994)	IL-1β 1,25µg (i.v.)	NTS, AP, LC, Cg, PVN, Hippo, AcN, CeA, SON, BNST, POA, PVT
(Ericsson et al. 1994)	IL-1β 0,21 – 3,58µg/Kg (i.v.)	BNST, CeA, PbN, NTS, DMN, *PVN, *OVLT, *SON
(Hare et al. 1995)	LPS 0,35 – 50µg (i.v.)	OVLT, AP, SFO, A1/A2, NTS, LC, PVN, SON, BNST, CeA, MeA
(Sagar et al. 1995)	LPS 150µg/Kg (i.v.)	NTS, PbN, LC, PVN, SON, DMN, AcN, LH, POA, BNST, LS, CeA, MeA, OVLT, AP, Subf
(Tkacs e Strack 1995)	LPS 0,2 – 1mg/Kg (i.v.)	Coluna intermédio-lateral da medula espinal Funículo lateral (T3-L1)
(Zhang et al. 2000)	LPS 5µg/Kg (i.v.)	PVN, RVLM, A5

1.13.3. A Influência do Sistema Nervoso Central (SNC) na Resposta Imune Periférica

Estudos experimentais envolvendo a lesão de regiões específicas do SNC, tais como estruturas do sistema límbico (Cross et al. 1980, 1982, Brooks et al. 1982, Devi e Namasivayam 1991), núcleos do tronco encefálico (Masek et al. 1983, Kadlecova et al. 1987, Neveu et al. 1992, Neveu 1992, Janković et al. 1993) e áreas do córtex cerebral (Renoux et al. 1983, 1987, Neveu 1992), sugerem que o SNC pode influenciar a resposta imune periférica. De fato, estudos eletrofisiológicos e de neurotraçamento mostram que a ENV aumenta a atividade de áreas supramedulares simpatoexcitatórias e de neurônios pré-ganglionares localizados na medula espinal (Hilton e Spyer 1971, Van Bockstaele et al. 1999, Coote 2004). Desse modo, apesar de amplamente aceito que a ENV reduz a inflamação por meio de estruturas e mecanismos periféricos, podemos sugerir que o efeito anti-inflamatório da ENV pode ser devido à ativação de estruturas centrais. Dessas estruturas, três merecem uma maior atenção inicialmente para o presente estudo: o núcleo do trato solitário (NTS), o locus coeruleus (LC) e o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN).

1.13.4. O Núcleo do Trato Solitário

Estudos que utilizaram marcadores axonais retrógrados mostraram que o NV tem sua origem no núcleo do trato solitário (NTS), área postrema (AP) e núcleo motor dorsal (NMD) (Beckstead e Norgren 1979, Kalia et al. 1984, Scott et al. 1998). O NTS consiste num agrupamento de núcleos que forma uma coluna vertical na parte bulbar do tronco encefálico (Figura 23), cuja função é manter a homeostasia do organismo através do recebimento de informações periféricas derivadas de quimiorreceptores e mecanorreceptores que trafegam pelos nervos vago e glossofaríngeo e enviando essas informações para outras estruturas subcorticais envolvidas no controle autonômico. De

fato, estudos mostram que o NTS envia projeções neuroniais para várias áreas do encéfalo (Figura 24), incluindo projeções para o LC e para os núcleos hipotalâmicos, incluindo o PVN (Guyenet 1991, Van Bockstaele et al. 1999, Ruggiero et al. 2000, Buller 2003, Kenny 2011).

Além disso, a lesão experimental do NTS ou de áreas adjacentes (pois a lesão completa do NTS é letal) diminui a resposta febril induzida por endotoxinas, acarretando na diminuição da atividade do LC e do PVN (Fyda et al. 1991, Ishizuka et al. 1997, Lee et al. 1998, Shan e Krukoff 2000, Gordon 2000, Bienkowski e Rinaman 2008), sugerindo que o NTS influencia a atividade do LC e do PVN durante processos inflamatórios.

Figura 23. Localização do NTS. Diagrama representativo de secções coronais de ratos mostrando 3 cortes em regiões diferentes do tronco encefálico de acordo com a sutura bregmática (-14.3, -13.8 e -13.3 mm) mostrando o núcleo do trato solitário (NTS). 4V: quarto ventrículo; AP: área postrema; B: localização da sutura bregmática; X: núcleo motor dorsal do vago (DMN); XII: núcleo do nervo hipoglosso. Extraído de Scott et al., 1998.

Figura 24. Principais projeções ascendentes originas no NTS. Desenho esquemático da secção sagital medial de rato mostrando as principais trajetórias das fibras ascendentes originadas no NTS. BNST: núcleo leito da estria terminal; Raphe: núcleos da rafe. Adaptado de Kenny, 2001.

1.13.5. Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

Estudos mostram que o hipotálamo é uma região crítica para a modulação da resposta imune. Animais submetidos a lesões experimentais direcionadas para os diversos núcleos que compõem a região do hipotálamo mostram vários efeitos deletérios na resposta imune, entre eles alteração da arquitetura linfóide (Isaković e Janković 1973, Cross et al. 1980), diminuição da resposta imune tumoral (Balitshii et al. 1976) e humoral (Tyrey e Nalbandov 1972, Isaković e Janković 1973, Goldstein 1978, Cross et al. 1980). De nota, grande parte dessas lesões não alteram os níveis de corticosteróides circulantes (Cross et al. 1980, Brooks et al. 1982), sugerindo uma modulação independente do eixo HPA. Dentre esses núcleos, o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) é uma estrutura essencial para a manutenção da homeostasia corporal e se localiza em proximidade a outros núcleos hipotalâmicos (Figura 25).

Figura 25. Localização do PVN. Diagrama representativo de seções coronais de ratos mostrando 3 cortes em regiões diferentes do tronco encefálico de acordo com a sutura bregmática (-14.3, -13.8 e -13.3 mm) mostrando o núcleo paraventricular do hipotálamo (seta). B: localização da sutura bregmática Modificado de Scott et al., 1998 e Paxinos e Watson (2005).

O PVN recebe aferências providas de estruturas relacionadas ao comportamento emocional (estruturas límbicas) e hemodinâmico e estabelece conexões intra-hipotalâmicas com outros núcleos envolvidos na resposta ao estresse e no controle circadiano (Sawchenko et al. 1981, Ferguson e Samson 2003, Mastorakos e Zapanti 2004, Benarroch 2005) (Figura 26). Além, disso, o PVN contém duas populações neuronais distintas: uma magnocelular, a qual sintetiza e libera o hormônio antidiurético (ADH) e ocitocina (Renaud e Bourque 1991, Engelmann et al. 2004), e outra parvocelular, a qual sintetiza e libera principalmente corticotropina (CRH) e somatostatina (Swanson e Sawchenko 1983). De especial interesse no presente estudo, o CRH induz a produção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) na hipófise anterior que, liberado na circulação sistêmica, induz a produção e liberação do hormônio esteróide cortisol pela medula adrenal, efeito comumente conhecido por eixo HPA (Figura 6). De fato, estudos sugerem que o PVN participa ativamente como interface neuroimune para o controle da resposta inflamatória.

Figura 26. Projeções do NTS para o PVN ativadas por um estímulo inflamatório. Desenho esquemático mostrando as aferências para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). O PVN recebe aferências viscerais e nociceptivas por meio do núcleo do trato solitário (NTS) por vias diretas provindas do nervo vago ou indiretamente pelos grupos de neurônios catecolaminérgicos do bulbo ventrolateral ou pelo núcleo parabraquial (PBN). A angiotensina circulante age via receptores no órgão subfornical (SFO), o qual se projeta para o PVN. Outro grupo de aferências surge do núcleo arqueado (ArcN) para o PVN. Citocinas circulantes ativam os neurônios do PVN indiretamente através da liberação de prostaglandina E2 (PgE₂) pelas células endoteliais. Estímulos emocionais alcançam o PVN por meio do núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH). Adaptado de Benarroch et al., 2005.

Citocinas podem aumentar, por meio de sinais neuroniais parácrinos, a atividade do PVN e do sistema simpático (Swanson e Sawchenko 1983, Swanson et al. 1983, Buijs et al. 2008) por meio da modulação da atividade de neurônios pré-ganglionares da coluna intermédio-lateral da medula espinal (Swanson e Sawchenko 1983, Hosoya et al. 1991, Holstege et al. 1996), do bulbo (parassimpáticos) (Swanson e Sawchenko 1983, Cano et al. 2001) e do LC (Luiten et al. 1985, Coote 2004).

1.13.6. Locus Coeruleus

50% de todos os neurônios noradrenérgicos do SNC podem ser localizados no tegumento dorsal na área rostral da ponte, em um agrupamento celular específico denominado locus coeruleus (LC): seu nome advém de sua coloração azulada (cerúlea - derivada da polimerização da noradrenalina) característica na base do quarto ventrículo (Svensson e Thorén 1979, Samuels e Szabadi 2008) (Figura 27).

Fibras originadas no LC dão origem a três vias principais: a ascendente, innervando estruturas do mesencéfalo, tálamo, sistema límbico e neocórtex; a cerebelar, projetando-se para os núcleos e córtex cerebelares; e a descendente, enviando axônios colaterais para o mesencéfalo caudal (NTS e complexo olivar inferior) e medula espinal (via cerúleo-espinal). Desse modo, o LC está intimamente envolvido na modulação de respostas emocionais e viscerais (Abercrombie e Jacobs 1987, Ceccatelli et al. 1989, Jacobs et al. 1991, Cullinan et al. 1995, Palkovits et al. 1997). Além disso, estudos mostram que a estimulação do LC aumenta a secreção de ACTH e glicocorticóides (Ward e Gunn 1976, Ward et al. 1976) e a microinjeção de CRH no LC aumenta os níveis séricos de cortisteróides (Butler et al. 1990, Curtis et al. 1997), sugerindo uma conexão bidirecional com o PVN. De fato, os neurônios parvocelulares do PVN (os quais contém CRH) recebem aferências noradrenérgicas provindas do LC, e o LC mantém conexões

excitatórias recíprocas com o PVN (Samuels e Szabadi 2008, Szabadi 2013), sugerindo que ambos núcleos possam agir em sincronia durante a resposta ao estresse.

Figura 27. Localização do LC. Diagrama representativo de secções coronais de ratos mostrando 3 cortes em regiões diferentes do tronco encefálico de acordo com a sutura bregmática (-14.3, -13.8 e -13.3 mm) mostrando o locus coeruleus (LC) como uma estrutura alongada e vertical na ponta do quarto ventrículo (seta). O quarto ventrículo pode ser visto por uma fina linha preta acima de ambos LC. Adaptado de Scott et al., 1998.

Outros estudos mostram que o LC também pode influenciar a atividade autonômica periférica. O aumento na atividade neuronal do LC está diretamente associada ao aumento na atividade cardiovascular e hemodinâmica periférica (Ward e Gunn 1976, Ogawa et al. 1979, Stock et al. 1981, Elam et al. 1981, Andrade e Aghajanian 1982, Drolet e Gauthier 1985), sugerindo uma neuromodulação sobre o sistema autonômico. Além disso, a estimulação do LC aumenta os níveis plasmáticos e espinais do metabólito da NA, MHPG (Crawley et al. 1978, 1980), propondo uma conexão funcional entre o LC e o sistema nervoso simpático por meio de suas projeções cerúleo-espinais (Figura 28).

Figura 28. O LC e a atividade simpática periférica. (A – à esquerda) Efeitos cardiovasculares observados durante a estimulação do LC (90Hz, 1ms, 100µA, 10seg). (A – à direita) Efeitos do aumento da intensidade de estimulação do LC em relação ao aumento na pressão arterial. (B) Níveis plasmáticos de MHPG após a estimulação do LC em várias intensidades (20Hz, 1ms). (C) Correlação entre a atividade dos neurônios do LC em relação à alteração da atividade simpática periférica durante a estimulação térmica da cauda de ratos. A: extraído de Drohlet et al., 1985; B: extraído de Crawley et al., 1980; C: extraído de Elam et al., 1986.

Em relação à modulação da resposta imune, estudos mostram que a lesão do LC pode suprimir a formação de anticorpos, hemolisinas e hemaglutininas em resposta à imunização, e levar à diminuição no tamanho do timo e na quantidade de células T CD4+ no sangue periférico (Cunnick et al. 1990, Janković et al. 1993, Nikolić et al. 1993). Além disso, esplenócitos provindos de animais cujos LC foram lesados produzem menores quantidades de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em resposta ao LPS (Engler et al. 2010). Por outro lado, a estimulação do LC diminui a atividade mitogênica de linfócitos esplênicos e sanguíneos (Casale e Kaliner 1984, Caroleo et al. 1993, Rassnick et al. 1994, Engler et al. 2010), propondo um papel imunomodulatório do LC, embora ainda pouco conhecido.

Em resumo, os dados aqui apresentados indicam que o processo inflamatório periférico pode ser controlado por meio da ativação de estruturas supramedulares específicas através da modulação da atividade simpática. Aparentemente, o NTS é a via de entrada da informação inflamatória para o SNC, onde o NV aparenta ser o eixo de condução das informações periféricas para o SNC. Do NTS, a informação se espalha para várias áreas do SNC por meio de feixes específicos. Nesse caso, o LC e o PVN aparentam ter um papel fundamental no controle da inflamação periférica através de sua capacidade de modular o tônus autonômico periférico por meio de suas conexões com neurônios pré-ganglionares da medula espinal (Figura 29).

Figura 29. Interação das estruturas supramedulares a partir de um estímulo inflamatório periférico. Desenho esquemático do corte sagital medial do encéfalo e corte transversal da medula espinal de roedor mostrando a posição relativa de estruturas e núcleos relevantes para o presente estudo. Neurônios e vias estão diferenciados por cor para distinguir as áreas integrativas, sensoriais e efetoras. AP: área postrema; GRD: gânglio da raiz dorsal; LC: locus cerúleus; NTS: núcleo do trato solitário; PbN: Núcleo parabraquial; PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo; VLM: bulbo rostro-ventro-medial. Adaptado de Bourque et al., 2009.

HIPÓTESE EXPERIMENTAL

*“Uma das grandes
dores da natureza
humana é a dor
de uma nova idéia”*

*Walter Bagehot
Jornalista britânico*

2. Hipótese Experimental

A partir das evidências apresentadas, formulamos a hipótese na qual os efeitos anti-inflamatórios da ENV podem ser devidos a uma ativação de vias neurais supramedulares (centrais) que modulam a atividade simpática periférica por um mecanismo dependente de neurônios pré-ganglionares simpáticos localizados na medula espinal (Figura 30).

Figura 30. Hipótese dos mecanismos centrais de controle da inflamação. Devido estudos mostrarem ausência de conexão parassimpática no baço, o efeito anti-inflamatório da estimulação vagal se daria por meio de uma conexão não conhecida. Trazemos aqui a proposta de uma via antiinflamatória vago-encéfalo-espinal-simpática. A estimulação periférica do nervo vago ativaria estruturas supramedulares responsáveis pela modulação autonômica. A ativação dessas estruturas poderia estimular (linha verde) neurônios autonômicos simpáticos pré-ganglionares (entre L4-L6), cuja atividade também poderia ser modulada por células gliais ali localizadas. A ativação desses neurônios leva a liberação de ACh no gânglio simpático (L4-L6), ativando neurônios pós-ganglionares que induzem a liberação de NA na articulação fêmuro-tibial. A NA, por sua vez, produziria efeitos anti-inflamatórios locais. ACh: acetilcolina.

MATERIAIS E MÉTODOS

*“A simplicidade
é a glória da
expressão”*

*Walt Whitman
Poeta e jornalista norte-americano*

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Os experimentos foram realizados utilizando-se ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, *Rodentia muridae*) pesando entre 200 e 250 gramas e camundongos das linhagens Suíços (Swiss) e C57BL/6 entre 25 e 30 gramas, todos provenientes do Biotério Central do campus administrativo de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Além disso, foram utilizados camundongos geneticamente deficientes para TRPV1 e NUDE (deficiência na atividade de linfócitos), provenientes do Departamento de Genética e do Departamento de Imunologia da USP, campus de Ribeirão Preto. Imediatamente após seu recebimento, os animais foram alojados no biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto onde foram mantidos em caixas acrílicas sob um regime de ciclo claro/escuro de 12 horas, em temperatura controlada ($20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e acesso livre a água e comida de acordo com as normas do COBEA.

O número de animais utilizados foi o mínimo requerido para certificar a confiabilidade dos resultados. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética para Animais de Experimentação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (protocolo COBEA nº 137/2013 e 198/2015, em anexo na parte de Suplementos)

3.2. Compostos Utilizados

Os compostos utilizados no presente estudo foram preparados 10 minutos antes do experimento e dissolvidos em PBS:

Nome do composto	Fabricante	Nº de catálogo
Antibiótico (Pentabiótico®)	Fort Dodge®	
Atenolol	Sigma-Aldrich®	A7655
Butoxamida	Sigma-Aldrich®	B1385
Cloridrato de Lidocaína (sem ação vasoconstritora)	Cristália®	
Dobutamina	Sigma-Aldrich®	D0676
Flunixin® (Anti-inflamatório)	Schering-Plough®	
fMLP	Sigma-Aldrich®	F3506
Guanetidina	Sigma-Aldrich®	1301801
Ketamina	Agener União®	
LTB-4	Sigma-Aldrich®	L0517
MIP-1 β	Sigma-Aldrich®	SRP3115

Propranolol	Sigma-Aldrich®	P0884
Noradrenalina	Sigma-Aldrich®	N1100000
Procaterol	Sigma-Aldrich®	P9180
TNF- α	Sigma-Aldrich®	SRP3177
Xilasina (Xylestesin®)	Agener União®	
zimosan	Sigma-Aldrich®	Z4250

3.3. Compostos utilizadas para marcação imunofluorescente e imunohistoquímica

Produto	Nome	Marcação	Espécie de origem	Fabricante	Catálogo
Anticorpo	Anti-ATF3	Dano neuronal	coelho	Santa Cruz®	sc188
Anticorpo	Anti-Fos	Fos	coelho	Sigma ®	F137
Anticorpo	Anti-GFAP	astrócitos	coelho	Merck Millipore®	AB5804
Anticorpo	Anti-ICAM1	ICAM-1	humano	Sigma ®	WH003383M1
Anticorpo	Anti-rabbit Alexa Fluor 488	(-)	cabra	Merck Millipore®	AB5804
Reagente	Fluoro-Jade B	necrose	(-)	Merck Millipore®	AG310
Reagente	Elite ABC HRP Kit	(-)	cavalo	Vector®	PK-6200

3.4. Procedimentos Cirúrgicos

Todos os animais foram inicialmente anestesiados com uma mistura de ketamina e xilasina (50mg/kg e 10mg/Kg, respectivamente). Antes da cirurgia, foi aplicada uma solução de álcool iodado (10%) no local da incisão. Após o término do procedimento cirúrgico, os animais foram suturados e os animais receberam uma dose de antibiótico (Pentabiótico® - 0.2mL para ratos e 0.01mL para camundongos, intramuscular) e uma dose de analgésico e anti-inflamatório (Flunixin®, 25mg/Kg, subcutâneo). O período de recuperação de cada animal variou de 7 a 10 dias.

3.4.1. Canulação da artéria femoral

Os animais foram mantidos em posição supina e as patas foram mantidas afastadas da linha média. Os pelos da parte inguinal esquerda foram removidos e um corte no mesmo local foi efetuado para a identificação da artéria e vaso inguinal. Após sua

dissecação e separação, a artéria inguinal foi cateterizada por meio de um tubo de polietileno (PE-50; Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA), o qual foi inserido no tecido subcutâneo para ser exteriorizado na nuca do animal. As suturas foram então fechadas.

3.4.2. Exposição e dissecação do nervo vago

Os animais foram mantidos em posição supina e as patas foram mantidas afastadas da linha média. Os pelos da parte ventral do pescoço dos animais foram removidos, e um corte cervical longitudinal de ± 3 cm (ratos) ou ± 1 cm (camundongos) ao longo da linha média foi feito. Os tecidos subjacentes foram delicadamente afastados para a identificação da artéria carótida direita adjacente ao corpo da traqueia. Após a dissecação da artéria carótida direita, o nervo vago direito foi identificado ao longo e em torno da artéria carótida, de onde foi delicadamente dissecado e separado (Figura 31).

Figura 31. Procedimento de exposição e dissecação do nervo vago direito em ratos Wistar. (A) O animal é anestesiado e mantido em posição supina com os membros afastados da linha média mantendo o (B) foco cirúrgico para a parte anterior do pescoço. (C) Um corte na linha média na parte anterior do pescoço é feita seguida de (D) dissecação do tecido subcutâneo adjacente até a visualização da traquéia. (E) A artéria carótida direita é encontrada logo abaixo da porção lateral da traquéia, (F) de onde pode ser pinçada para a (G) visualização do nervo vago. (H) O nervo vago então pode ser dissecado e observado individualmente (em destaque na ponta da pinça).

3.4.3. Vagotomia cervical (VNXcerv) – cirúrgica

Após a exposição do NV, dois cortes transversais foram feitos para a remoções de aproximadamente 1mm do nervo. Após o procedimento, as vísceras foram realocadas em seus lugares originais e os animais foram suturados. Permitiu-se um período de 48 horas de recuperação para dar seguimento ao experimento.

3.4.4. Vagotomia cervical (VNXcerv) – farmacológica

Seguindo o mesmo procedimento para a exposição do NV no procedimento de VNX cervical - corte, lidocaína em gel (2%) (Cristália®), foi administrada (10µL) dentro do epineuro que envolve o feixe de fibras do NV por meio de uma agulha de 30G ao longo de 5 minutos. Após a aplicação, foi permitido um período de 5 minutos para o espalhamento da lidocaína. A implantação do eletrodo no NV se deu cranial ou caudalmente ao local da injeção (Figura 32).

Figura 32. Bloqueio farmacológico do nervo vago. (A): Após a dissecação do nervo vago, o mesmo pode ser visualizado longitudinalmente (setas); (B,C): A agulha é delicadamente inserida ao longo da extensão do nervo vago (1 mm - setas). (D): Visualização da lidocaína após sua injeção (intumescência azulada – setas).

3.4.5. Esplenectomia (SPX)

Os animais foram mantidos em posição supina e as patas foram mantidas afastadas da linha média. O pelo da parte anterior do abdome foi cortado e um corte estendendo-se do processo xifoide até o meio da linha média foi feito. O estômago foi então identificado para então identificar o baço, o qual se localiza proximalmente à porção dorso-posterior do estômago. O baço então foi dissecado do estômago, exteriorizado e seus vasos foram cuidadosamente separados do tecido pancreático, e suturados com linha cirúrgia. Após a sutura de todos os vasos, o baço foi cirurgicamente removido e os animais, suturados (Figura 33).

Figura 33. Procedimento de esplenectomia em ratos Wistar. (A): O animal é mantido em posição supina com seus membros afastados da linha média com o (B) plano focal localizada na parte abdominal superior. (C) Uma laparotomia medial é feita, (D) as vísceras subjacentes são então afastadas e o (E) baço é facilmente reconhecido no quadrante superior esquerdo do abdomen. (F) O estômago é então gentilmente removido, (E) permitindo que o baço saia de sua posição original. (F) O baço é então exposto para a visualização das artérias esplênicas (setas). Depois de identificadas, (G) todas as artérias esplênicas são suturadas para então efetuar o (J) corte sequencial da parte distal dessas artérias, permitindo que o (K) baço seja removido sem maiores intercorrências.

3.4.6. Remoção do ramo celíaco do nervo vago (sVNX)

Os animais foram mantidos em posição supina e as patas foram mantidas afastadas da linha média. O pelo da parte anterior do abdome foi cortado e um corte estendendo-se do processo xifoide até o meio da linha média foi feito. Inicialmente foram removidas as adesões fibrosas que prendem anatomicamente o fígado ao estômago, impedindo-o de ser rotacionado. Após a remoção das adesões fibrosas, o estômago foi rotacionado para a identificação do ramo vagal posterior (o qual dá origem ao ramo gástrico posterior e celíaco). O ramo foi seguido até o hiato esofágico que, cuidadosamente, foi cortado logo após sua emergência, e um pequeno pedaço de $\pm 1\text{mm}$ foi removido do ramo. Após esse procedimento, o estômago foi colocado em sua posição original e os animais foram suturados (Figura 34).

Figura 34. Procedimento de corte do ramo celíaco do nervo vago em ratos Wistar. (A): O animal é mantido em posição supina com seus membros afastados da linha média com o (B) plano focal localizada na parte abdominal superior. (C) Uma laparotomia medial é feita, (D) as vísceras subjacentes são então afastadas e (E) a parte anterior do estômago é visualizado. (F) Retraindo-se gentilmente o estômago, (G) a primeira adesão entre o fígado e o estômago é encontrada (setas). (H,I) Após sua remoção, o esôfago pode ser melhor visualizado (setas), permitindo que o (J) estômago seja retraído lateralmente para expor a segunda adesão (setas) entre o fígado e a parte posterior do estômago. (K) Após cuidadosa remoção dessa adesão, (L) o feixe de tecido contendo ramo vagal posterior pode ser visualizado. Após delicada dissecação desse tecido, (M) o ramo posterior pode ser visualizado. Seu corte levará à inativação do ramo celíaco do nervo vago.

3.4.7. Adrenalectomia (ADX)

Os animais foram mantidos em decúbito lateral. O pelo das partes laterais ao nível do abdome inferior foi retirado e um corte de ± 3 cm (ratos) ou ± 1 cm foi feito na parte dorso-lateral do abdome superior. Após a remoção do retroperitônio da área subjacente, o rim foi reconhecido para a localização das glândulas em sua parte cranial. A glândula adrenal foi então cuidadosamente removida bilateralmente por puncionamento. Após o procedimento os animais foram suturados, e para evitar perda de eletrólitos corporais, os animais tiveram livre acesso a uma solução de NaCl 0,9% até o início dos experimentos.

3.4.8. Simpatectomia (SIMPX)

Os animais foram mantidos em posição supina e as patas foram mantidas afastadas da linha média. O pelo da parte anterior do abdome foi retirado e um corte estendendo-se do processo xifoide até a porção inferior do abdômen foi feita. Após o afastamento das vísceras adjacentes, o retroperitônio foi dissecado para a identificação da artéria renal direita. Uma nova dissecação nesse local foi feita para o reconhecimento do gânglio simpático fundido de L2/L3 logo dorsalmente. Após a identificação do gânglio, seu trajeto foi seguido caudalmente até o gânglio simpático fundido de L5/L6 perto da bifurcação da artéria aorta. Todo esse trajeto foi dissecado do restante do corpo e removido. Após esse procedimento, todas as vísceras afastadas foram colocadas em suas posições originais e os animais foram suturados. Permitiu-se um período de 7 a 10 dias de recuperação pós-operatória.

3.4.9. Cirurgia de estimulação do nervo vago (ENV) em animais anestesiados

Os animais foram mantidos em posição supina e as patas foram mantidas afastadas da linha média. Os pelos da parte ventral do pescoço dos animais foram removidos, e um corte cervical longitudinal de ± 3 cm ao longo da linha média foi feito. Os tecidos subjacentes foram delicadamente afastados para a identificação da artéria carótida direita

adjacente ao corpo da traqueia. Após a dissecação da artéria carótida direita, o nervo vago direito foi identificado ao longo e em torno da artéria carótida, de onde foi delicadamente dissecado, separado e afastado para a implantação de um eletrodo bipolar de platina (Figura 35) acoplado a um estimulador. Após o procedimento de estimulação, o corte foi suturado e os animais foram submetidos ao desafio imunogênico.

Figura 35. Eletrodo de estimulação e sua aplicação no nervo vago. *Acima: Fotografias representativas mostrando o eletrodo de estimulação do nervo vago no presente estudo e suas dimensões. Abaixo: Fotografia da dissecação da parte anterior do pescoço de um rato Wistar mostrando a inserção do eletrodo de estimulação no nervo vago (setas pretas). Perceba que o nervo vago está separado da artéria carótida (setas brancas).*

3.4.10. Cirurgia de estimulação da cadeia simpática lombar

O procedimento foi o mesmo para a identificação do gânglio simpático de L2/L3 descrito para o procedimento de simpatectomia. Após a identificação do gânglio, implantou-se o eletrodo logo abaixo de L2/L3 de modo idêntico ao efetuado para a implantação de eletrodo no NV para experimentos com animais acordados. Após a implantação, o eletrodo foi cuidadosamente inserido através do músculo psoas e exteriorizado na parte posterior do pescoço do animal. Após isso, os segmentos da cadeia simpática em contato com o eletrodo foram cuidadosamente cobertos com material siliconado não tóxico (elastômero de silicone Kwik-Sil®; World Precision Instruments, Sarasota, FL, EUA). 24 horas após, os animais, acordados, foram submetidos à estimulação elétrica da cadeia lombar.

3.4.11. Cirurgia de estimulação do nervo vago (ENV)

Os ratos foram submetidos à mesma cirurgia de exposição do NV para animais anestesiados. O NV foi implantado com um eletrodo bipolar de aço inoxidável contendo um calço de 2mm entre os eletrodos. Os 2 mm finais das pontas distais tiveram seu isolamento removido e foram torcidas para formar um gancho que foi implantado em torno do NV. Após a implantação, o eletrodo foi cuidadosamente inserido através do músculo esternocleidomastóideo e exteriorizado na parte posterior do pescoço do animal. Após isso, os segmentos do NV em contato com o eletrodo foram cuidadosamente cobertos com material siliconado não tóxico (elastômero de silicone Kwik-Sil®; World Precision Instruments, Sarasota, FL, EUA). 24 horas após, os animais, acordados, foram submetidos à ENV.

3.4.12. Cirurgia esterotáxica

Após a anestesia, o animal foi posicionado no aparelho esterotáxico (David-Kopf, EUA) onde teve sua cabeça fixada pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Após a

remoção dos pelos do escalpo, o mesmo foi removido cirurgicamente para a exposição do crânio, e o periósteo foi removido por raspagem para expor os ossos craniais. Com a superfície craniana ajustada em posição horizontal, entre as suturas bregmática e lambdóide, dois orifícios foram feitos na superfície cranial, por meio de broca elétrica, para a introdução de pequenos parafusos de aço inoxidável, os quais tem a função de ancoramento do capacete (prótese). Em seguida, outro orifício foi feito para a implantação da cânula, confeccionada a partir de agulhas hipodérmicas (25 x 6 mm), medindo um total de 12 mm de comprimento, através da qual a cloreto de cobalto foi injetado. Essa cânula foi direcionada unilateralmente ao PVN ou LC de acordo com as coordenadas do atlas de Paxinos e Watson (2005), tendo-se a linha interaural como referência (Tabela 10). Em seguida, a cânula foi fixada com cimento acrílico polimerizável. Para evitar entupimentos da cânula, um fio de aço (mandril) foi introduzido no interior da cânula.

Tabela 10. Coordenadas estereotáticas do PVN e do LC. À esquerda: desenho esquemático do encéfalo de rato mostrando o local aparente (tracejado em azul) da estrutura indicada por meio de uma aproximação lateral. À direita: fotomicrografias de secções coronais do encéfalo de ratos Wistar ao nível do PVN (superior) e LC (inferior) de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2005), indicando os respectivos locais de microinjeção (áreas hachuradas). Barra de escala: 1,2 mm. AP: ântero-posterior; LL: látero-lateral; DV: dorso-ventral.

Estrutura e localização aparente	Coordenadas	Localização Histológica
<p>Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN)</p>	<p>AP: 7,2 LL: 0,5 DV: 7,6</p>
<p>Locus Ceruleus (LC)</p>	<p>AP: -1,04 LL: 1,5 DV: 7,0</p>

3.5. Equipamentos para Estimulação e Análise dos Registros

3.5.1. Eletrodos externos para estimulação

Os eletrodos foram construídos por meio da junção de dois fios de aço inoxidável, com isolamento em Teflon, de 40 mm de comprimento (A-M Systems, Sequim, WA, EUA) a um pequeno plugue (GF-6; Microtech, Boothwyn, PA, USA). Nos 2 mm finais da ponta distal do eletrodo, o isolamento elétrico foi removido e a ponta foi torcida para formar um gancho em formato de “J” que ficou em contato com o nervo. A ponta proximal do eletrodo foi acoplada ao sistema de estimulação.

3.5.2. Eletrodos internos para estimulação neuronal

Os eletrodos foram construídos a partir de fios de aço inoxidável com isolamento em teflon. 1mm de sua ponta distal foi raspado para eliminar o isolamento. Os fios foram então soldados a um conector macho e torcidos longitudinalmente para aumentar sua rigidez. Após o procedimento, os eletrodos foram implantados, de modo idêntico ao descrito para as cânulas, no PVN ou no LC.

3.5.3. Equipamentos de análise cardiovascular

O cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (MLT844; ADInstruments, Bella Vista, Austrália) e o sinal foi amplificado (ML224; ADInstruments, Bella Vista, Austrália) e analisado por um computador externo equipado com uma interface de conversão analógica/digital (CAD) (2kHz; ML866, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). Os registros da pressão arterial pulsátil (PAP) foram processados pelo programa LabChart 7.0 (ADInstruments, Bella Vista, Austrália), o qual é capaz de detectar os pontos de inflexão para a identificação da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC). Somente os animais que mostraram ausência de sinais de estresse foram utilizados no estudo.

3.5.4. Equipamento de estimulação

Os eletrodos foram conectados a um estimulador externo (T-1M1C, AVS Projetos, São Carlos, SP, Brasil – Figura 36) e os animais foram submetidos a diferentes intensidades de estimulações elétricas por um período de 2 minutos. Somente os animais que mostraram ausência de sinais de estresse foram utilizados no estudo.

3.5.5. Equipamento para análise de temperatura da cauda

Para verificar se a ENV ou estimulação cortical ativam vias simpáticas, foi feita a análise da temperatura da cauda do animal, visto a atividade simpática diminuir a temperatura cutânea.

As variações na temperatura cutânea da cauda foram analisadas por meio de uma câmera térmica (Multi- Purpose Thermal Imager NV 4010, InfraRed Integrated Systems Ltd Park Circle, Tithe Barn Way Swan Valley Northampton, EUA) (Figura 37) numa distância de 50 cm do animal. As fotos foram obtidas em intervalos de 1 minuto. As imagens obtidas foram analisadas por software específico (InAnalyser, Wuhan Guide Infrared Co., Ltd.) que calcula a emissão de radiação infravermelha a partir da medida de um pixel representativo, convertendo-o em uma escala colorimétrica em °C . 3 pontos equidistantes, a partir da base da cauda do animal, foram utilizados como referências térmicas para cada indivíduo.

Figura 36. Modelo de equipamento de estimulação AVS T-1M1C. Extraído de www.avsprojetos.com.br.

Figura 37. Modelo da câmera térmica Multi- Purpose Thermal Imager NV 4010.

3.5.6. Equipamento de captura e análise do eletroencefalograma (EEG)

Para assegurar que durante a estimulação cortical nenhuma atividade neuronal aberrante foi produzida, registros monopolares do eletroencefalograma (EEG) da atividade elétrica do hipocampo ipsilateral (anteroposterior = 2.7 mm, mediolateral = 4.5 mm, dorsoventral = 4.5 mm) e do córtex cerebral (anteroposterior = 2.7 mm, mediolateral = 5.0 mm, dorsoventral = contanto meningeal) foram analisados por meio de eletrodos (hipocampo: fios de aço inoxidável isolados com teflon: Ø 127 µm, A-M Systems, Sequim, WA, USA; córtex cerebral: prafusos de aço inoxidável, Ø 1.5 mm; Fine Science Tools, Heidelberg, Germany) (Figura 38 A, B). Cada animal foi colocado individualmente numa caixa de acrílico (Ø 37 cm; 50 cm) coberta com uma manta metálica (gaiola de Faraday) e conectado ao sistema por meio de plugue (RJ11 cat6) (Figura 38 C-H). Após 5 minutos de habituação, um estímulo elétrico catódico (60 Hz, 0.1 ms, 50 µA) foi aplicado por 2 minutos. O EEG foi capturado por meio de um condicionador de dois canais (CyberAmp 320; Axon Instruments, Union City, CA, USA) acoplado a uma interface analógico-digital (PowerLab 3.80; ADInstruments, Bella Vista, Australia). A aquisição do EEG seguiu os seguintes parâmetros: filtro de bandas entre 0.1 Hz e 1 kHz, ganho total de 1000x, e taxa de amostragem de 2 kHz. Uma câmera de vídeo (Panasonic, Kadoma, Japan) foi utilizada para auxiliar na monitorização em tempo real do comportamento do animal (exploração, autolimpeza e comportamentos anormais e epiléticos) em sincronia com a atividade do EEG. A análise temporal do EEG foi obtida através do *software* LabChart Pro 8.0 (ADInstruments, Bella Vista, Australia). A amplitude, frequência e morfologia da onda, assim como eventuais descargas primárias e secundárias recorrentes (marcadores de atividade epileptiforme) foram analisadas de modo similar a Reis e colaboradores (Reis et al. 2010). Os padrões do EEG foram correlacionados ao comportamento do animal antes e depois da estimulação cortical.

Figura 38. Localização e estética de implantação dos eletrodos corticais em ratos. **A:** Fotografias representativas mostrando a localização dos eletrodos de estimulação e registro e os parafusos de ancoramento no crânio do rato; **B:** fotografia representativa da secção coronal do encéfalo de rato ao nível do hipocampo mostrando a localização dos eletrodos de estimulação e registro em relação ao osso e à dura-máter; **C:** modelo esquemático mostrando a localização do eletrodo de estimulação em relação aos tecido subjacentes ao córtex cerebral e por onde a estimulação elétrica deve passar. **D:** fotografia mostrando o plugue (RJ11cat6) utilizado no presente experimento. Fotografias mostrando, ao término da cirurgia estereotáxica, o capacete e a localização do plugue em relação a à visão **(E)** frontal, **(F)** superior, **(G)** lateral e **(H)** posterior em ratos. Fotografias representativas extraídas de Paxinos e Watson (2006).

3.6. Injeção de compostos

- **Injeções intra-articulares:** As injeções foram feitas por meio de uma agulha de 30G e foram injetados 50µL em ratos e 10µL em camundongos
- **Injeções intravenosas:** As injeções foram feitas através da veia peniana por meio de uma agulha de 30G num total de 100µL
- **Injeções no SNC:** As injeções foram feitas por meio de micropipetas de capilares de sílica ($\emptyset$ externo: 150µm, $\emptyset$ interno: 75µm; Cluzeau Info Lab, França), sendo 3 mm maiores que a cânula guia. Para prevenir quebras de cânulas, o capilar foi fixado num dispositivo feito de agulhas de 0,60 x 0,25 (23G) e 1,00 x 0,25 (19G) mm justapostas de forma a permitir a inserção do capilar dentro dessas. A micropipeta foi então conectada a uma seringa Hamilton de 50 µL através de um tubo de polietileno (PE-10, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) (Figura 39). Um volume constante de 0,2 µL foi injetado por um período de 30 segundos. Uma bolha de ar dentro do tubo de polietileno conectado à micropipeta foi criada para monitorar a injeção da solução. Após o término da administração, a micropipeta foi mantida dentro do encéfalo por 30 segundos adicionais para maximizar a difusão da solução pra longe da micropipeta.

Figura 39. Esquema de montagem e utilização do capilar de sílica. **A:** O capilar de sílica é colado a uma cânula de 30G; **B:** solda-se uma cânula maior (19G) à cânula de 30G fixa ao capilar, acopla-se juntamente a PE-10 ao sistema; **C:** Acopla-se a micropipeta pronta à cânula-guia (23G) do capacete do animal, esse já completamente implantado. Notar que a cânula maior ancora o sistema à cânula-guia, impedindo movimentos laterais e dorso-ventrais exagerados; **D:** aproximação das bordas da cânula-guia e do capilar de infusão seguida de injeção segura da solução (setas).

3.7. Modelo de Inflamação induzido por Zimosan

Contrariamente aos trabalhos que utilizaram modelos experimentais de inflamação sistêmica, optou-se para o presente trabalho a contensão do processo inflamatório dentro da cápsula articular do joelho, proporcionando um melhor controle das variáveis, as quais são impossíveis de serem dissociadas nos modelos de inflamação sistêmica. Desse modo, escolhemos a artilação fêmur tibial devido: 1) o joelho possui única e exclusivamente inervação simpática, removendo-se qualquer influência direta do nervo vago (Langford e Schmidt 1983, Ferreira-Gomes et al. 2010); e 2) o joelho se encontra longe de quaisquer vísceras que sejam inervadas pelo nervo vago, tais como glândulas adrenais e intestinos.

Imediatamente após os procedimentos de estimulação elétrica ou dos procedimentos farmacológicos citados acima, os animais, ainda sob os efeitos da anestesia, foram injetado com zimosan (100 μ g em ratos e 30 μ g em camundongos) na cavidade fêmuro-tibial por meio de uma agulha de 30G (50 μ L em ratos e 10 μ L em camundongos). Nos experimentos em animais acordados, após o término da estimulação, os mesmos foram imediatamente anestesiados para a injeção de zimosan na articulação.

3.8. Análise dos parâmetros inflamatórios

Após 1, 3 ou 6 horas pós estímulo inflamatório, os animais foram decapitados e os seguintes parâmetros inflamatórios foram analisados:

3.8.1. Edema articular

A formação de edema foi analisado através da media do diâmetro articular medido através de um paquímetro (Marberg, Brasil). Os resultados foram mostrados como média $\pm$ EPM da diferença entre o diâmetro inicial (basal) e após a administração do estímulo (Δ mm).

3.8.2. Escore experimental da articulação

Esse parâmetro foi analisado após a remoção da pele em torno do joelho para a exposição da articulação fêmuro-tibial (Tabela 11).

3.8.3. Migração de neutrófilos para a articulação

Após a análise do edema e do escore articular, o tendão patelar do animal foi cortado para expor a bursa sinovial. A cápsula foi então cortada transversalmente para expor a cavidade articular para, em seguida, ser lavada com solução PBS + EDTA (1mM) por meio de uma micropipeta (15µL para ratos e 2µL para camundongos) (Figura 40). As amostras foram então diluídas em solução de Turk para eliminar eritrócitos e o número total de leucócitos foi determinado por meio de uma câmara de Neubauer sob microscópio óptico (400x). A diluição da amostra na solução de Turk seguiu a diluição necessária para que o grupo controle (zimosan) obtivesse uma média de 60-80 neutrófilos por campo analisado. Os resultados são mostrados como neutrófilos/cavidade articular, e os resultados são mostrados como média $\pm$ EPM.

Tabela 11. Escores experimentais da articulação fêmur-tibial.

Escore experimental	Aspecto físico	Imagem representativa
0	Nenhuma evidência de inflamação
1	Edema leve da articulação
2	Edema envolvendo toda a cápsula articular em volta do joelho
3	Idem 2 + pontos hemorrágicos ao longo da cápsula
4	Idem 3 + grandes pontos de hemorragia ou vazamento de sangue ou pus

Figura 40. Procedimento de coleta do líquido sinovial. (A) Após a decapitação, a pele em torno do joelho dos animais é removida para expor (B) a articulação fêmuro-tibial, a qual é mantida levemente fletida. (C) O tendão patelar e (D) os ligamentos colaterais são cortados para (D) expor a cápsula articular. A cápsula é então cortada (E) transversalmente e (F) longitudinalmente, expondo o conteúdo intra-articular. (G) Uma pipeta contendo o líquido de lavagem é inserido dentro da articulação e (H) seu conteúdo é ali despejado (líquido azulado) e imediatamente aspirado.

3.8.4. Adesão e rolamento de leucócitos no endotélio sinovial

Para esse procedimento, utilizamos camundongos C57BL/6 devido às limitações técnicas de posicionamento do animal no microscópio. A microscopia intravital foi realizada na microcirculação sinovial do joelho de camundongos como descrita por Veihelman e colaboradores (Veihelmann et al. 1998). O tendão patelar dos animais foi removido para expor a cápsula sinovial subjacente. Após esse procedimento os animais foram mantidos numa plataforma aquecida (Thermo Plate, Nikon, Japão) acoplada à mesa do microscópio e o joelho foi levemente fletido para análise, em luz fria e a um aumento de 10x, os vasos que ali se encontravam.

Após a identificação dos vasos, uma injeção de rodamina 6G (Sigma) (150µg/Kg/100µL) foi injetada por meio da artéria infraorbital. A epiluminescência da rodamina 6G foi observada nos leucócitos circulantes poucos segundos após sua administração por meio de uma lâmpada de Hg de 150W em conjunto a um filtro Zeiss 15 (546/12 nm, Zeiss, Wetzlar, Alemanha). As imagens foram capturadas e analisadas por um software específico (Fiji)

Os leucócitos em rolamento foram definidos como aqueles que se movem mais lentamente àqueles observados no fluxo regular do vaso. O fluxo de células em rolamento foi considerado como o número de células em rolamento que passam por um ponto determinado na vênula por minuto. Os leucócitos considerados como aderidos ao endotélio foram definidos como aqueles que permaneceram em posição estacionária por ao menos 30 segundos, e a adesão total foi quantificada como o número de células aderidas dentro de 100µm do comprimento da vênula.

3.9. Teste Comportamental - labirinto em Cruz Elevado

O intuito do teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é verificar se a estimulação neural produz efeitos aversivos no comportamento dos animais, podendo levar a

resultados falso-positivos no presente estudo. Para o experimento, os animais submetidos ao teste de LCE foram aqueles sujeitos aos experimentos de ENV ou estimulação cortical que não passaram por procedimento de anestesia, nem foram injetados com compostos inflamatórios, sendo estimulados por eletrodos externos previamente implantados.

O LCE é um teste baseado na aversão de roedores por lugares abertos e altos, como consequência os ratos submetidos ao LCE tendem a permanecer mais tempo nos braços fechados e evitar os braços abertos (Cruz et al. 1994, File et al. 2004). Desse modo, o LCE envolve mecanismos aversivos condicionados, inatos, proximais e distais que são detectados pelos animais, proporcionando estímulos capazes de ativar o sistema de medo que os mantém distantes do perigo representado pelos braços abertos. Os animais foram submetidos ao teste do LCE, que consiste de um equipamento elevado a 50 cm do solo, composto por dois braços abertos (50×10 cm), dispostos perpendicularmente a dois braços fechados ($50 \times 10 \times 40$ cm), formando um ângulo de 90° . Nos braços abertos são colocadas lâminas acrílicas, fazendo uma borda de 1 cm de altura, com o objetivo de evitar a queda dos animais (Figura 41). Os animais foram colocados no centro do labirinto com a cabeça voltada para um dos braços fechados no início de cada sessão com duração de 5 min. Após o término de cada sessão o LCE foi limpo com papel de limpeza umedecido em álcool 70%. Uma câmara de vídeo acoplada a um circuito de TV registrou o comportamento dos animais durante o experimento e as análises comportamentais foram feitas manualmente com auxílio do programa OBS 1.1 (FFCLRP, Ribeirão Preto, Brazil).

Figura 41. Labirinto em Cruz Elevado. Foto do labirinto em cruz elevado utilizado no presente estudo mostrando os braços abertos (sem paredes laterais e frontais) e fechados. Fonte: www.inec-usp.org.

Certas categorias comportamentais analisadas no LCE refletem ansiedade, atividade locomotora ou outros fatores além dos parâmetros tradicionais de exploração. O desempenho do animal no labirinto foi medido através dos parâmetros:

- Número de entradas nos braços abertos: número de vezes que o animal atravessava, com as quatro patas, para o interior desses braços;
- Número de entradas nos braços fechados: número de vezes que o animal atravessava, com as quatro patas, para o interior desses braços;
- Porcentagem de entradas nos braços abertos: obtida através da razão entre o número de entradas nos braços abertos e do total de entradas no labirinto:

$$\% \text{ Entradas} = \frac{100 \times \text{Número de Entradas nos Braços Abertos}}{\text{Número Total de Entradas}}$$

- Porcentagem de tempo gasto nos braços abertos: obtida através da razão entre o tempo despendido nos braços abertos do labirinto pelo tempo total do teste (5 minutos)

$$\text{Tempo} = \frac{100 \times \text{Tempo nos Braços Abertos}}{\text{Tempo Total do Teste}}$$

Ao lado disso, foram também registradas 9 categorias comportamentais complementares de ratos no LCE (Anseloni 1997, Anseloni e Brandão 1997):

- Autolimpeza (*grooming*): sequência de autolimpeza corporal começando pelo focinho, indo às orelhas e terminando pela limpeza do corpo inteiro (Figura 42);
- Esquadrinhamento (*scanning*): projeções da cabeça sobre as bordas de um braço (aberto ou fechado), esquadrinhando em qualquer direção;
- Mergulho de cabeça (*head-dipping*): movimento exploratório de cabeça e ombros nas laterais do braço aberto do labirinto em direção ao precipício (Figura 42);

- Esticamento (*stretched attend posture*): postura exploratória em que o animal estica-se e se contrai à posição inicial, sem se locomover para frente (Figura 42);
- Rastejamento (*flat back approach*): locomoção exploratória em que o animal estica-se totalmente e, cuidadosamente, move-se para frente;
- Levantamento (*rearing*): postura bípede do animal, apoiando-se com as patas posteriores no assoalho do labirinto, estando completamente ereto ou semi-arqueado (Figura 42);
- Exploração do final do braço aberto (EFBA) (*end-arm exploration*): o animal alcança a extremidade do braço aberto e mergulha com a cabeça (Figura 42);
- Espreitamento (*peeping out*): projeções da cabeça e ombros a partir do braço fechado para o centro, mantendo as quatro patas no braço fechado (Figura 42);

Figura 42. Exemplos de categorias comportamentais analisadas no labirinto em cruz elevado. (A) Levantamento; (B) Espreitamento (peeping-out); (C) Mergulho de cabeça (head-dipping); (D) Autolimpeza (grooming); (E) Esticamento (stretched attend posture); (F) exploração do final do braço aberto (end-arm exploration). A parede dos braços abertos são transparentes para facilitar a visualização dos comportamentos. Extraído de Anseloni, 1997.

3.10. Procedimentos de Análise de Proteínas Articulares

3.10.1. Quantificação de citocinas inflamatórias articulares por ELISA

O fluido sinovial da articulação fêmuro-tibial foi coletado por meio de pipetagem e diluídos em um volume total de 150µL. O fluido foi imediatamente congelado em gelo seco após sua coleta e armazenado em *freezer* em -70 °C até o dia da quantificação. As amostras foram homogeneizadas num volume total de 500µL de PBS contendo inibidores de proteases e centrifugadas por 10 minutos em 2000xg para a coleta do sobrenadante. O sobrenadante foi utilizado para medir os níveis de TNF (catálogo#DY510), IL-1β (catálogo #DY501) e IL-6 (catálogo #DY506) pelo ensaio de ELISA por meio da utilização de kits específicos (Duo set kits from R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Resumidamente, placas de 96 poços de fundo chato passaram pelo procedimento de *coating* por um período *overnight* (4 °C) contendo anticorpo policlonal purificado (ovelha) com afinidade para TNF (4 µg/mL), IL-1β (0.8 µg/mL) ou IL-6 (4 µg/mL). Após esse procedimento, as placas foram lavadas (3x) com TBS-T, e TNF, IL-1β ou IL-6 murino foi utilizado como padrões em concentrações determinadas pelo fabricante, e as amostras foram então adicionadas em duplicatas e incubadas *overnight* (4 °C). No dia seguinte, anticorpos policlonais biotinilados (coelho) purificados (pAbs) anti-TNF (225 ng/mL), anti-IL-1β (350 ng/mL) ou anti-IL-6 (400 ng/mL) foram adicionados e incubados em temperatura ambiente por 1 hora. Por fim, 50µL de peroxidase de rábado ligada à avidina (*avidin-horseradish peroxidase*) (1:5000 dilution; DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca) foi adicionada em cada poço por 30 minutos. As placas foram então lavadas (3x) com solução TBS-T e o reagente óptico OPD (200 µg por poço, Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi adicionado. Após 15 minutos, a reação foi interrompida pela adição de solução de H₂SO₄ e a densidade óptica (OD) foi medida para uma intensidade de luz de 490 nm. Os resultados foram expressados como pg·mL⁻¹ de TNF, IL-1β e IL-6 baseando-se em curvas padrões.

3.10.2. Quantificação de noradrenalina articular por ELISA

O joelho foi primeiramente lavado e aspirado (lavagem com 200 μ L) por meio de uma agulha de 26G e diluídos numa solução de 200 μ L de PBS contendo metabissulfito de sódio (4mM) e EDTA (1mM). A solução foi então imediatamente congelada em gelo seco e armazenada em *freezer* em -70 °C. No dia da quantificação, as amostras foram descongeladas e centrifugadas, o sobrenadante foi coletado e utilizado para medir os níveis de noradrenalina (NA) por meio de kit de ELISA específico (catálogo#KA1891, versão 04) de acordo com as especificações do fabricante (Abnova, Taipei, Taiwan). Os resultados foram expressados como quantidade de NA em pg·mL⁻¹, baseando-se em curvas padrão fornecidas pelo fabricante.

3.10.3. Quantificação de ICAM-1 sinovial por Western-Blott

Após o término dos experimentos, os animais foram decapitados e o tecido sinovial em volta da articulação fêmuro-tibial foi removida cirurgicamente, imediatamente congelada em gelo seco e mantida em *freezer* em -70 °C. No dia da quantificação, as amostras foram imersas em nitrogênio líquido, pulverizadas por impacto mecânico, homogeneizadas em tampão de lise contendo inibidores de protease, centrifugas por 10 minutos em 2000xg e o sobrenadante foi coletado. A concentração de proteínas no lisado foi determinado pelo ensaio de Bradford. As amostras foram separadas em gel SDS/PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, RU). Após esse procedimento, as membranas contendo as proteínas foram incubadas com anticorpo primário (1:400) anti-ICAM1 (WH0003383M1, Sigma, St Louis, MD, EUA) dissolvido em TBS-T filtrado contendo ABS 5% *overnight* (4 °C). No dia seguinte, a membrana foi lavada com TBS-T (3x) e incubada por 1 hora, em temperatura ambiente, com anticorpo secundário conjugado com HRP (1:2000; Jackson ImmunoResearch, EUA). Após lavagem (TBS-T, 3x), a solução

reveladora ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, RU) foi utilizada para a visualização dos anticorpos ligados à proteína na membrana em equipamento específico (ChemiDoc MP Imaging System, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

3.11. Procedimentos *in vitro*

3.11.1. Isolamento de neutrófilos da medula óssea

Após os ratos estarem profundamente anestesiados (1,5 mL de solução de hidrato de cloral 10%), ambos fêmures e tíbias foram desconectados do corpo e todo o tecido conectivo em volta dele foi extraído. A epífise e o epicôndilo foram removidos e a medula óssea foi removida através de uma solução de RPMI a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ inserida na cavidade óssea por meio de um agulha de 18G. O lavado foi então submetido à centrifugação (400g, 4°C , 10 min), o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 2mL de meio Hanks a $\pm 4^{\circ}\text{C}$.

Os neutrófilos foram então obtidos a partir do método de centrifugação por gradiente de Percoll® de maneira similar àquela utilizada para o isolamento de neutrófilos humanos (Schleimer et al., 1986). O lavado medular foi então colocado sobre o gradiente de Percoll® 65% e 80% e centrifugados lentamente (1200g, 20°C , 30 min, 2m/s^2) e todas as bandas, exceto a última (banda 3), foram cuidadosamente aspiradas por meio de uma pipeta. Células da banda 3 foram submetidas à solução de lise (NH_4Cl 4%) e lavadas com meio de Hank. O número de células após o isolamento foi obtido a partir de análise em câmara de Neubauer, e amostras com pureza acima de 80% e viabilidade de 90% foram consideradas (Figura 43).

Figura 43. Obtenção de neutrófilos a partir da medula óssea de ratos. O aspirado da medula óssea é colocado em cima do gradiente de Percoll® de densidade 1.065 (65%) e 1.080 (80%) g/mL. Após a centrifugação, todas as três bandas podem ser observadas. A banda 1 contém mieloblastos e pró-mielócitos; a banda 2 contém mielócitos e metamielócitos; e a banda 3 contém neutrófilos segmentados. Adaptado de (Cowland e Borregaard 1999).

3.11.2. Quimiotaxia de neutrófilos

A quimiotaxia foi realizada em câmara de 48 poços (câmara de Boyden, Neuro Probe, Cabin John, EUA) e uma membrana de polycarbonato contendo poros de 5µm (Neuro Probe, Pleasanton, CA, EUA) foi utilizada entre as câmaras. Os neutrófilos isolados da medula óssea (1×10^6 células/mL) foram cuidadosamente colocados em cada poço (30µL) em direção a um gradiente de MIP-1β (CCL4) (30ng/mL). Como controle negativo, o meio de RPMI (RPMI-1640 medium, Sigma®, St. Louis, EUA) acrescido de albumina bovina sérica (BSA) 0.01% foi administrado à cultura. Um hora após a incubação em 37° C e 5% de CO₂, a membrana de polycarbonato foi cuidadosamente removida da câmara, fixada e corada em solução panótica (Panótico Rápido LB) e os neutrófilos foram contados em microscópio óptico (100X) abrangendo cinco campos aleatórios por poço. Os resultados foram expressados em neutrófilos/campo (Figura 44).

Figura 44. Montagem e funcionamento da câmara de Boyden. (A) fotografias da vista superior-lateral e (B) lateral da câmara de Boyden mostrando seus componentes; (C) figura esquemática de um único poço mostrando a migração das células pela membrana de policarbonato em rota para o gradiente de MIP-1α; (D) Fotografia (100x) exemplificando o observado ao microscópio.

3.12. Procedimentos de Análise Histológica

Após a realização dos experimentos, os animais foram mortos com uma dose alta de anestésico (1,5 mL de solução de hidrato de cloral 10%) por via intraperitoneal, e perfundidos intracardiacamente com solução de PBS 0,1M, seguido de formalina 4% + PBS. Os animais então foram decapitados e seus encéfalos removidos e mantidos em formalina 4% por 5 horas, depois mantidos em sacarose 40% por 24 horas para serem cortados para análise histológica. Para os animais submetidos à estimulação elétrica intraencefálica, após a perfusão com PBS 0,1M, perfundi-se os animais com formalina 4% + PBS + ferrocineto de potássio (1mM) e, antes da remoção do capacete, uma descarga elétrica de 1V foi aplicada por 5 segundos nos eletrodos para a demarcação da área afetada pela estimulação elétrica.

Após esses procedimentos, os encéfalos foram cortados em secções coronais de 35 µm de espessura com o auxílio de um criostato (Reichert-Jung, Alemanha) para posterior tratamento dos seguintes métodos de histoquímica e imunofluorescência:

3.12.1. Coloração por Nissl: locais de microinjeção e eletroestimulação:

Os cortes foram estendidos em lâminas de microscopia e a coloração pelo método de Nissl foi adotada. Os cortes foram analisados através de um microscópio óptico para a localização dos sítios de microinjeção e comparados aos seus respectivos diagramas correspondentes do atlas estereotático de Paxinos e Watson (2005).

3.12.2. Imunohistoquímica: análise da expressão de c-Fos encefálica

O termo *fos* é um acrônimo das palavras *Finkel*, *Osteogenic* e *Sarcoma*, e foi inicialmente utilizado para descrever os genes que codificam o retrovírus indutor de sarcoma osteogênico em roedores Finkel-Biskis-Jenkins (Curran e Teich 1982). C-Fos é um gene de resposta precoce (*early-response gene*), cuja ativação ocorre dentro de 5

minutos e continua por 15 a 20 minutos após o término do estímulo, e seu RNAm se acumula e alcança valores de pico entre 30 a 45 minutos pós-estimulação (Greenberg e Ziff 1984, Greenberg et al. 1985). A imunorreatividade para a proteína c-Fos é conhecida por ser um marcador confiável da atividade neuronal. Estudos mostraram que o aumento da imunorreatividade para c-Fos observada após a estimulação elétrica do córtex motor e sensorial de ratos, podendo também ser correlacionada à captação de [^{14}C]-2-deoxiglicose no SNC (Sagar et al. 1988, Sharp et al. 1989). Embora a marcação de c-Fos não seja o único indicador da atividade neuronal, sua expressão fornece um índice confiável do mapeamento da atividade do SNC frente as repostas funcionais produzidas pelos animais em diferentes condições experimentais incluindo estimulações elétricas periféricas (Naritoku et al., 1995) e centrais (Sagar et al., 1988; Sharp et al., 1989).

Para o presente estudo, a imunorreatividade para a proteína c-fos foi feita em animais submetidos à ENV ou estimulação do córtex cerebral. Os animais foram mortos 1,5 hora após o término das estimulações. Após a secção do encéfalo em criostato, as amostras passaram pelo seguinte protocolo experimental:

Os cortes encefálicos (35 μm) foram coletados e mantidos em PBS 0,1M para serem processados pelo método de *free-floating*. Todas as reações foram realizadas sob agitação e em temperatura ambiente de acordo com os procedimentos a seguir:

- 1) Incubação com H_2O_2 1% para bloqueio da peroxidase endógena por 10 minutos;
- 2) 4 lavagens com PBS 0,1M (5 minutos cada);
- 3) Incubação com anticorpo policlonal primário para Fos (*rabbit*) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), na proporção de 1:1000 em PBS 0,1M enriquecido com Triton-X 0,2% e albumina bovina sérica (ABS) 0,1% em período *overnight*;
- 4) 3 lavagens com PBS 0,1M (5 minutos cada);
- 5) Incubação com anticorpo biotinilado (*anti-rabbit*) (H+L; Vectastain, Vector) na proporção de 1:200 por 1 hora;

- 6) 3 lavagens com PBS 0,1M (5 minutos cada);
- 7) Incubação com complexo ABC (kit ABC, Vectastain, Vector, EUA) na proporção de 1:1000 por 1 hora;
- 8) 3 lavagens com PBS 0,1M (5 minutos cada);
- 9) Revelação de Fos pela adição do cromógeno 3,3'-diaminobenzidine (DAB, 0.02%, Sigma, EUA) + H₂O₂ (0,04%) por até 10 minutos;
- 10) 3 lavagens com PBS 0,1M (5 minutos cada);
- 11) Distensão das secções em lâminas gelatinizadas, secagem à temperatura ambiente e colagem das lamínulas

3.12.3. Imunofluorescência: análise da expressão de GFAP

O GFAP (proteína fibrilar acídica glial) é uma proteína filamentosa expressa constitutivamente em astrócitos fibrosos localizados na matéria branca e cinzenta (Ridet et al. 1996). O aumento na expressão de GFAP no SNC é um marcador confiável da resposta astrocística a vários estímulos lesivos ao sistema nervoso, tais como traumas mecânicos, doenças neurodegenerativas e envelhecimento (Hol et al. 2003, Wu et al. 2003, Pelinka et al. 2004, Lee et al. 2006). Após a lesão neuronal, o microambiente é dominado pela presença de mediadores pró-inflamatórios, os quais induzem a produção de citocinas e proteases. Essas proteases rompem a barreira-hemato-encefálica (BHE), afrouxam a matriz extracelular e estimulam o consequente recrutamento de leucócitos. A ativação dos astrócitos, por meio do aumento na expressão de GFAP pode ser observada dentro de 6 horas após a lesão (Siemionow et al. 2009).

Para o presente estudo, o procedimento de imunofluorescência para o GFAP foi feito em animais submetidos à estimulação cortical. Os animais foram mortos 48 hora após o término das estimulações. Após a secção do encéfalo em criostato, as amostras passaram pelo seguinte protocolo experimental:

- 1) Incubação inicial com soro caprino 5% e ABS 1% dissolvidos em PBS 0,1M + Triton X100 0,1% por 1 hora
- 2) 4 lavagens com PBS 0,1M (5 minutos cada);
- 3) Incubação com anticorpo policlonal primário para GFAP (*rabbit*) (# sc-9065, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), na proporção de 1:1000 em PBS 0,1M enriquecido com Triton-X 0,2% e albumina bovina sérica (ABS) 0,1% em período *overnight*;
- 4) 3 lavagens com PBS 0,1M (5 minutos cada);
- 5) Incubação com anticorpo anti-*rabbit* caprino contendo Alexa fluor 488® (Molecular Probes, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA) por 2 horas;
- 6) 3 lavagens com PBS 0,1M (5 minutos cada);
- 7) Adição e colagem das lamínulas com Fluormont® para meio aquoso (Sigma, St. Louis, MO, EUA) às lâminas

3.12.4. Imunofluorescência: análise da expressão de ATF3

A família do Fator de Ativação da Transcrição (ATF) representa uma grande família de fatores de transcrição que contém a região básica bZip (*zipper* de leucina) que inclui o ATF1 (TREB36), CREB, CREM, ATF2 (CRE-BP1), ATF3, ATF4, ATF5 (ATFX), ATF6, ATF7 e B-ATF (Hai 2006). O homodímero do ATF-3 é comumente considerado como um repressor transcricional, porém seu heterodímero é considerado um ativador transcricional quando forma complexos do ATF-3 com c-Jun (Hashimoto 2002, Wang et al. 2003). Fisiologicamente, a expressão de ATF3 é mantida em baixos níveis em células quiescentes (Tsujino et al. 2000) e vários estudos caracterizaram o ATF como um gene de resposta adaptativa induzido por uma ampla variedade de sinais, tais como citocinas, agentes genotóxicos ou estresses fisiológicos (Chen et al. 1994, Hai 2006, Lu et al. 2006). Por ser um marcador de estresse celular, o aumento na expressão de ATF-3 pode ser visualizada nas primeiras 6 horas após o dano neuronal e ser visualizada até 7 dias pós-lesão (Tsujino et al. 2000, Takeda et al. 2000, Mason et al. 2003, Hai 2006,

Sant'Anna et al. 2016). Além disso, a expressão de ATF-3 pode ser detectada nas primeiras 6 horas após (Tsujino et al., 2000).

Para o presente estudo, o procedimento de imunofluorescência para o ATF3 foi feito em animais submetidos à estimulação cortical. Os animais foram mortos 48 hora após o término das estimulações. Após a secção do encéfalo em criostato, as amostras passaram pelo seguinte protocolo experimental:

- 8) Incubação inicial com soro caprino 5% e ABS 1% dissolvidos em PBS 0,1M + Triton X100 0,1% por 1 hora
- 9) 4 lavagens com PBS 0,1M (5 minutos cada);
- 10) Incubação com anticorpo policlonal primário para ATF3 (*rabbit*) (# sc-188, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), na proporção de 1:1000 em PBS 0,1M enriquecido com Triton-X 0,2% e albumina bovina sérica (ABS) 0,1% em período *overnight*;
- 11) 3 lavagens com PBS 0,1M (5 minutos cada);
- 12) Incubação com anticorpo anti-*rabbit* caprino contendo Alexa fluor 488® (Molecular Probes, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA) por 2 horas;
- 13) 3 lavagens com PBS 0,1M (5 minutos cada);
- 14) Adição e colagem das lâminulas com Fluormount® para meio aquoso (Sigma, St. Louis, MO, EUA) às lâminas

3.12.5. Histofluorescência: análise da expressão de FluoroJade

Técnicas mais convencionais, tais como a histomacação por hematoxilina e eosina (HE) ou Nissl podem inferir a presença de processos degenerativos por meio da observação da morfologia celular, tais como vacuolização, hipercromatismo e encolhimento celular (Garcia e Kamijyo 1974, Siesjö 1981). Porém, a morfologia celular pode não ser um indicador confiável devido à presença de artefatos histológicos ou sua associação a alterações morfológicas não letais (Cammermeyer 1961, Stensaas et al. 1972). A vantagem da utilização de Fluoro-Jade sobre outras técnicas histoquímicas, tais

como Nissl ou hematoxilina/eosina é sua especificidade por neurônios em degeneração, incluindo o corpo celular, dendritos, axônios e axônios terminais (Schmued et al. 1997). Desse modo, células marcadas pelo Fluoro-Jade podem ser visualizadas através de um sistema de filtros ópticos para fluoresceína (excitação: 495 nm, emissão: 521 nm), gerando melhor contraste e aparência e menor esforço do observador para identificar sua marcação sobre um *background* preto.

Apesar dos mecanismos histoquímicos de marcação ainda não serem conhecidos, a técnica de histomarcação do Fluoro-Jade se mostrou confiável em modelos de degeneração neuronal causada pela administração ácido caínico (excitotoxina) e domótico (excitotoxina), ibogaína (alcalóide), 3-NPA (inibidor da via do metabolismo respiratório), MPTP (neurotoxina), metais diversos e epilepsia (Schmued et al. 1997, Schmued e Hopkins 2000, Castro et al. 2011).

Para o presente estudo, o procedimento de histofluorescência para Fluoro-Jade B foi feito em animais submetidos à estimulação cortical. Os animais foram mortos 48 hora após o término das estimulações. Após a secção do encéfalo em criostato, as amostras passaram pelo seguinte protocolo experimental:

- 1) Os cortes (35µm) foram inicialmente montados em lâminas gelatinizadas;
- 2) Imersão em etanol 100% por 3 minutos;
- 3) Imersão em etanol 70% por 1 minuto;
- 4) Imersão em água destilada;
- 5) Imersão em solução de permanganato de potássio (KMnO₄) 0,06% por 15 minutos, em agitação branda;
- 6) 3 lavagens com água destilada (1 minuto cada);
- 7) Imersão em solução de Fluoro-Jade 0,0001% + ácido acético 0,001% por 30 minutos;
- 8) 3 lavagens com água destilada (1 minuto cada);

3.13. Microscopia e Análise dos Cortes

As lâminas foram analisadas por um microscópio de campo claro/fluorescência (SP5, Leica, Wetzlar, Alemanha). As nomenclaturas utilizadas nos cortes foram baseadas no atlas de Paxinos e Watson (2005).

Os neurônios positivos para Fos foram visualizados como uma reação de cor amarronzada localizada no núcleo do neurônio. Objetos com áreas entre 10 e 80 μm^2 foram identificadas e automaticamente contadas por um sistema de análise computadorizada (Fiji) (Schindelin et al. 2012). Os neurônios positivos para c-Fos foram contados a partir de fotos obtidas em campo claro por uma objetiva de 10x num aumento de 40x por campo, abrangendo toda uma área desejada para a quantificação.

As marcações para GFAP, ATF3 e Fluoro-Jade foram visualizadas como marcações brilhantes verde-claras localizadas nos astrócitos (GFAP) e no corpo do neurônio (ATF3 e Fluoro-Jade). O laser argônio-kriptônio foi utilizado para excitar estruturas positivas para GFAP, ATF3 e Fluoro-Jade, com emissão de luz polarizada. A contagem das células fluorescentes foi feita manualmente por uma objetiva de 10x num aumento de 40x por campo, abrangendo toda uma área desejada para a quantificação.

Todas as áreas encefálicas foram contadas bilateralmente e a média foi calculada para cada estrutura. As regiões analisadas e suas respectivas coordenadas ântero-posteriores foram obtidas a partir da linha interaural (Paxino e Watson, 2005).

3.14. Análise Estatística

As análises estatísticas foram efetuadas através do software Prism 6.0. (GraphPad). O recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular, citocinas, dados comportamentais, parâmetros hemodinâmicos e o quantidade de neurônios positivos para

c-Fos foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) de uma via (one-way ANOVA) seguida pelo teste pós-hoc de comparações múltiplas de Tukey. O período de tempo dos diâmetros articulares e dos escores experimentais foram analisados através da ANOVA de duas vias (two-way ANOVA) para medidas repetidas seguida do teste pós-hoc de Bonferroni quando indicado. Os parâmetros hemodinâmicos foram analisados através da ANOVA de duas vias para medidas repetidas. A amostra experimental (n) se refere ao número de animais e está indicada dentro de cada gráfico e expressa como média + EPM. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

RESULTADOS

*“Em algum lugar,
algo incrível espera
para ser conhecido”*

Carl Sagan
Astrônomo e escritor científico

4. Resultados

4.1.A vagotomia cervical aumenta a migração de neutrófilos para a articulação fêmur-tibial.

Inicialmente efetuamos a vagotomia cervical cirúrgica na artrite experimental para analisar o papel imunomodulador do NV na inflamação articular. Em 24 horas após a cirurgia, a vagotomia cervical direita aumentou a inflamação na articulação fêmur tibial induzida por zimosan, como demonstrado pelo aumento do infiltrado neutrofílico (Figura 45).

Figura 45. A vagotomia cervical agrava o processo inflamatório articular. A vagotomia cervical (cVNX) aumenta a migração de neutrófilos no modelo de artrite experimental. *** $p < 0.001$.

4.2.A estimulação do nervo vago reduz o padrão inflamatório articular

Contrariamente ao observado na inflamação articular em animais submetidos à cVNX, a estimulação do nervo vago (ENV) melhorou o escore experimental (Figura 46 A), reduziu o diâmetro articular (Figura 46 B) e o infiltrado neutrofílico (Figura 46 C), assim como reduziu o número de leucócitos aderidos (Figura 47 D) e em rolamento (Figura 47 E) na microvasculatura sinovial (Figura 47 A-C).

Figura 46. A ENV melhora o padrão inflamatório articular. A Estimulação do Nervo Vago (ENV) melhora (A) o escore experimental, (B) reduz o diâmetro articular e o (C) infiltrado neutrofílico da articulação fêmur-tibial. **, \$\$ $p < 0.01$; ***, \$\$\$ $p < 0.001$.

Figura 47. A ENV reduz a adesão e rolamento de leucócitos no endotélio sinovial. Fotomicrografias (40x) da microvaculatura sinovial do joelho de camundongos mostrando o vaso aderido por leucócitos (pontos esbranquiçados ao longo do vaso) em animais naïve (A), zimposan (B) ou submetidos à ENV + zimposan (C). Número de leucócitos aderidos (D) e em rolamento (E). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Além disso, a estimulação vagal reduziu significativamente os níveis de TNF, IL-1 β , IL-6, (Figura 48 A-C) e da molécula de adesão intercelular (ICAM)-1 (Figura 49).

A análise temporal mostra que a ENV induziu um efeito anti-inflamatório, e não somente um atraso no início do processo inflamatório e no aparecimento de citocinas inflamatórias, tais como o TNF.

Figura 48. A ENV diminui os níveis de citocinas inflamatórias articulares. Nível de (A) TNF, (B) IL-1 β e (C) IL-6 e na articulação fêmur-tibial em animais submetidos à ENV. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figura 49. A ENV reduz os níveis de ICAM-1 sinovial. Expressão de ICAM-1 no tecido sinovial da articulação fêmur-tibial em animais submetidos à ENV. * $p < 0.05$.

Como próxima etapa, confirmamos que o efeito anti-inflamatório vagal depende da intensidade da estimulação elétrica. Esse efeito anti-inflamatório foi somente observado quando o NV foi estimulado em baixa (ENVL: 5 Hz, 0.1 ms, 1 V), mas não em alta (ENVH: 20 Hz, 0.1 ms, 3 V), intensidade (Figura 50 A). A ENVL não afetou a frequência cardíaca (FC) e a pressão arterial média (PAM) (Figura 50 B), mas reduziu a frequência respiratória (Figura 50 C).

Figura 50. A intensidade de estimulação do nervo vago interfere no processo inflamatório. (A) A ENV de baixa (ENVL: 5 Hz, 0.1 ms, 1 V), mas não de alta (ENVH: 20 Hz, 0.1 ms, 3 V), intensidade reduz a inflamação articular. **(B)** A ENVL não altera a frequência cardíaca (FC) e a pressão arterial média (PAM), porém **(C)** reduz a frequência respiratória. *** $p < 0.001$.

Esses resultados sugerem que a estimulação vagal pode produzir efeitos colaterais que podem ser evitados através da estimulação de vias aferentes em rota para o SNC. Logo, focamos nossos estudos somente na ENV de baixa intensidade, e observamos se esse mecanismo anti-inflamatório não é específico para o modelo experimental de artrite induzida por zimosan.

A estimulação vagal também reduziu a inflamação sinovial induzida por outros estímulos inflamatórios, tais como o fMLP (um peptídeo bacteriano quimiotático), LTB₄ (um leucotrieno) ou a injeção intra-articular de TNF (Figura 51 A-F), mostrando que o efeito anti-inflamatório da ENV não é devido a alterações hemodinâmicas locais e não está relacionado a um único estímulo inflamatório.

Figura 51. O efeito anti-inflamatório da ENV é de amplo espectro. O processo inflamatório produzido pela injeção intra-articular de (A) fMLP, (C) LTB₄ ou (E) TNF- α é reduzido após a ENV (BDF). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Como próxima etapa, analisamos se a imunorregulação propiciada pela estimulação do nervo vago na artrite experimental se dá por um mecanismo semelhante ao descrito para a sepse experimental. Estudos mostram que o nervo vago controla a inflamação sistêmica que ocorre na sepse através da regulação da atividade de linfócitos colinérgicos do baço e da produção de catecolaminas da glândula adrenal (Huston et al. 2006, Peña et al. 2011, Rosas-Ballina et al. 2011, Torres-Rosas et al. 2014). Porém, ao contrário da regulação vagal sobre a inflamação sistêmica na sepse experimental, a regulação vagal da artrite independe da vagotomia celíaca, esplenectomia, adrenalectomia, deficiência na atividade de linfócitos e de receptores TRPV1 (Figura 52 A-C, respectivamente). Esses resultados indicam que a regulação da artrite por mecanismos vagal não são mediados pelas estruturas neuroimunes convencionais.

Figura 52. O efeito anti-inflamatório da ENV não depende de estruturas neuroimunes clássicas. Os efeitos da ENV no perfil inflamatório da articulação fêmur-tibial é mantida após (A) esplenectomia (SPX, adrenalectomia (ADX) ou vagotomia subdiafragmática (sVNX). A ENV diminui a inflamação em camundongos (B) NUDE e (C) TRPV1 KO. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Dado que as juntas articulares são inervadas pelos nervos simpáticos (Langford e Schmidt 1983, Ferreira-Gomes et al. 2010), analisamos a potencial contribuição do sistema nervoso simpático no controle da inflamação articular induzida pela ENV. O bloqueio da atividade *simpática* por meio da injeção intra-articular de propranolol, um bloqueador β -adrenérgico muito bem caracterizado (McAinsh e Cruickshank 1990), inibiu a regulação vagal da artrite (Figura 53). Os resultados até aqui sugerem um novo mecanismo fisiológico neuroimune responsável pela coordenação de ambos sistemas *parassimpático* e *simpático*.

Figura 53. O efeito anti-inflamatório da ENV depende do sistema nervoso simpático. Os efeitos da ENV sobre o perfil inflamatório da articulação fêmur-tibial é bloqueado pelo pré-tratamento com propranolol (Prop) em ratos.

4.3.A ativação neuronal central é essencial para o controle vagal da inflamação articular

Dado que as estruturas neuroimunes clássicas não foram necessárias para controlar a inflamação articular, especulamos que a estimulação do NV induziria um sinal *eferente* para o encéfalo e para o SNC. O papel do SNC foi estudado através da estimulação elétrica seletiva do tronco vagal aferente por meio de dois métodos alternativos: farmacológico (lidocaína intravagal) ou bloqueio cirúrgico dos sinais neuronais para a periferia do nervo. Consistente com nossa hipótese, a estimulação vagal aferente reduziu a inflamação articular (Figura 54 A, B).

Figura 54. A ENV aferente reduz a inflamação articular. A ENV aferente por meio da (A) administração intra-axonal de lidocaína ou (B) corte cirúrgico reduz a inflamação articular. *** $p < 0.001$.

Como controle de nossos experimentos, confirmamos que esse efeito não foi revertido em animais vagotomizados, adrenalectomizados ou esplenectomizados submetidos à ENV aferente (Figura 57). Esses resultados evidenciam que a regulação vagal aferente do processo inflamatório articular é mediado por uma via neuronal central.

Figura 55. O efeito anti-inflamatório da ENV aferente não depende de estruturas neuroimunes clássicas. A estimulação vagal aferente reduz a inflamação periférica em animais esplenectomizados (SPX), vagotomizados (sVNX) ou adrenalectomizados (n=4 para cada grupo). *** $p < 0.001$.

Como próximo passo, investigamos quais estruturas supramedulares poderiam contribuir para o controle vagal da inflamação articular através da análise da expressão da proteína c-Fos, um marcador da atividade neuronal bem caracterizado (Morgan et al., 1987), induzido pela ENV no encéfalo de ratos não anestesiados. Dado que a anestesia pode afetar tanto a atividade neuronal quanto o sistema imune, desenvolvemos uma técnica para estimular eletricamente o nervo vago em animais não anestesiados. Como controle, primeiramente confirmamos que a ENV aumentou a expressão de c-Fos no NTS e no DMN (Figura 56 A, B, G). Também observamos o aumento da expressão de c-Fos no PVN (Figura 56 C, D, G) e no LC (Figura 56 E-G), estruturas supramedulares envolvidas com a modulação autonômica simpática.

Figura 56. A ENV aumenta a expressão de c-Fos em áreas encefálicas envolvidas no controle simpático. A ENV aumentou a expressão de c-Fos no (AB) núcleo do trato solitário (NTS) e no núcleo motor dorsal do vago (DMN), (CD) núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e no (EF) locus coeruleus (LC) comparado com o grupo controle não estimulado (A-G). ** $p < 0.01$.

Desse modo, analisamos se a estimulação do PVN ou do LC poderiam mimetizar os efeitos imunomodulatórios observados após a ENV. De fato, a estimulação elétrica do PVN ou do LC em animais não anestesiados reduziu o número de neutrófilos infiltrados em ambas patas (Figura 57 A-D) sem alterar o comportamento do animal no teste do labirinto em cruz elevado (LCE) (Figura 58).

Figura 57. A estimulação elétrica do LC ou do PVN reduz a inflamação articular. Microfotografias representativas dos locais de estimulação e injeção no (A) LC e no (B) PVN (●) ou em locais fora desses núcleos (▲). O número total de pontos na figura é menor que o número total de ratos usados devido à sobreposição de pontos. A estimulação elétrica do (C) LC ou do (D) PVN diminui a migração de neutrófilos para ambas articulações. Ambas: ambas articulações; Ipsi: articulação ipsilateral ao hemisfério de estimulação; Contra: articulação contralateral ao hemisfério de estimulação. Fotomicrografias extraídas do atlas de Paxinos e Watson (2006). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figura 58. A estimulação elétrica do LC ou do PVN não altera o comportamento dos animais.. A estimulação elétrica do (A-K) ou do (L-V) PVN não alterou o comportamento de animais submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE) nas medidas etológicas clássicas (LC: A-C, PVN: L-M) como nas complementares (LC: D-K, PVN: O-V). EFBA: exploração do final do braço aberto.

Por outro lado, a inativação temporária do LC, mas não do PVN, inibiu o efeito anti-inflamatório vagal (Figura 59 A, B, respectivamente) somente no joelho ipsilateral, mas não no contralateral, ao hemisfério inativado (Figura 59 A). De fato, estudos anteriores mostrando a inervação direta do LC para os neurônios pré-ganglionares ipsilaterais da medula espinal (Westlund et al. 1981, Proudfit e Clark 1991). Esses resultados evidenciam o papel crucial da ativação sensorial vagal aferente para o LC para modular sinais imunomodulatórios periféricos que controlam a inflamação articular.

Figura 59. O bloqueio do LC, mas não do PVN, inibe o efeito anti-inflamatório da ENV. A inativação temporária do (A) LC, mas não do (B) PVN, inibiu o efeito anti-inflamatório vagal somente na articulação ipsilateral, mas não na contralateral, ao hemisfério inativado do LC. Ambas: ambas articulações; Ipsi: articulação ipsilateral ao hemisfério de estimulação; Contra: articulação contralateral ao hemisfério de estimulação. *** $p < 0.001$.

4.4.O efeito anti-inflamatório da ENV depende da ativação simpática local

Utilizamos 5 etapas experimentais para avaliarmos como o sistema nervoso simpático modula a inflamação articular mediada pela estimulação do nervo vago.

- 1) A estimulação vagal em animais não anestesiados gera uma diminuição na temperatura cutânea obtida na cauda do animal (Figura 60 A), mimetizando o efeito da estimulação elétrica da cadeia simpática paravertebral lombar (Figura 60 B).

Figura 60. A ENV reduz a temperatura cutânea. A estimulação do (A) nervo vago (ENV) ou (B) da cadeia simpática lombar (Simp ES) diminui a temperatura da cauda do animal.

- 2) A ENV aumentou os níveis de noradrenalina (NA) sinoviais somente no joelho innervado pela cadeia simpática (Figura 61).

Figura 61. A ENV aumenta a quantidade de noradrenalina articular. Ensaio por ELISA da medida da quantidade de noradrenalina (NA) 5 minutos após a ENV no joelho ipsilateral (Ipsi-SimpX) e contralateral (Contra-SimpX) à remoção da cadeia simpática lombar. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

- 3) O efeito anti-inflamatório da estimulação vagal foi inibida no joelho ipsilateral, mas não contralateral à simpatectomia cirúrgica (Figura 62 A) ou química (Figura 62 B).

Figura 62. A ENV reduz a inflamação via ativação simpática local. (A) O efeito anti-inflamatório da ENV é bloqueado no joelho ipsilateral (Ipsi - SimpX), mas não no contralateral (Contra - SimpX) à simpatectomia cirúrgica. **(B)** A administração intra-articular de guanetidina (Guanet) bloqueia o efeito da ENV. *** $p < 0.001$.

- 4) A estimulação elétrica da cadeia simpática lombar reduz a migração de neutrófilos para ambos joelhos (Figura 63).

Figura 63. A estimulação da cadeia simpática (Simp ES) reduz a inflamação articular.

5) A injeção intra-articular de noradrenalina, o principal neurotransmissor liberado pela inervação simpática local diminuiu os níveis sinoviais de ICAM-1 (Figura 64 A) e o recrutamento de neutrófilos para a articulação fêmur-tibial (Figura 64 B) sem afetar diretamente a quimiotaxia de neutrófilos (Figura 64 C).

Figura 64. A ENV reduz a inflamação articular por meio da liberação local de noradrenalina. A administração intra-articular de noradrenalina (NA) diminui a (A) expressão de ICAM-1 no tecido sinovial e a (B) migração de neutrófilos para a articulação inflamada. (C) Experimento in vitro da quimiotaxia de neutrófilos submetidos a diferentes doses de NA. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Esses resultados mostram que a noradrenalina controla a inflamação articular por meio de um mecanismo local, e não sistêmico.

Como próxima etapa, confirmamos o papel dos receptores β -adrenérgicos no controle vagal da inflamação articular. Primeiramente, a administração de β -bloqueadores inibiu o efeito anti-inflamatório da estimulação vagal. A ENV falhou em controlar a inflamação articular em animais submetidos à injeção intra-articular prévia de atenolol (agonista β_1) ou butoxamida (agonista β_2) (Figura 65 C). Por outro lado, a administração de agonistas β -adrenérgicos mimetizou o controle da inflamação articular da estimulação vagal. A injeção intra-articular de dobutamina ou procaterol (agonistas β_1 e β_2 -adrenérgicos, respectivamente) inibiu a migração de neutrófilos para o sinóvia (Figura 65 A, B). Desse modo, nossos resultados mostram que a inervação simpática e seu neurotransmissor final, a noradrenalina, são os responsáveis pelo controle vagal da inflamação articular que ocorre na artrite reumatóide por meio da redução da expressão de ICAM-1 e da ativação de receptores β_1 e β_2 adrenérgicos do tecido sinovial.

Figura 65. A ENV reduz a inflamação articular via ativação de receptores β -adrenérgicos locais. Injeção intra-articular de (A) agonista β_1 (dobutamina – Dobut) ou (B) β_2 (Procaterol – Procat) diminui a inflamação articular. A administração intra-articular de (C) antagonistas β_2 (Butoxamina – But) ou β_1 (Atenonol – Ate) inibem o efeito anti-inflamatório da ENV. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

4.6. A estimulação elétrica cortical mimetiza os efeitos da expressão de c-Fos encefálica induzida pela ENV

Para desenvolvermos novas estratégias terapêuticas que não produzam os mesmos efeitos colaterais dos tratamentos farmacológicos da artrite reumatóide, estudos a neuroestimulação central pode controlar a inflamação articular. Dado que a ENV aumentos a expressão de c-Fos em áreas corticais associadas com a modulação simpática e as funções motoras (Burns e Wyss 1985, Tankus et al. 2014), como córtex cingulado e parietal (Figura 66 A-E), levantamos a hipótese que a estimulação de áreas corticais poderiam mimetizar o efeito imunomodulatória da ENV.

Figura 66. A ENV induz o aumento de c-Fos em áreas corticais. Aumento da expressão de c-Fos no córtex (A, C, E) cingulado (Cg) e (B, C, E) parietal em animais submetidos à ENV. *** $p < 0.001$; barra de escala = 50 μ M.

De fato, a estimulação elétrica cortical (EEC) direcionada para o córtex parietal (Figura 38 A-C) aumentou a expressão de c-Fos em regiões supramedulares associadas com o controle autonômico, tais como o PVN e o LC (Figura 67 A-D, G). Ao contrário da ENV, a EEC não aumentou a expressão de c-Fos no NTS (Figura 67 E-G). Porém, de modo similar à ENV, a EEC aumentou a expressão de c-Fos no córtex cingulado (Figura 67 H, I, L) e parietal (Figura 67 J-L).

Como estruturas corticais e subcorticais foram ativadas por ambos tipos de estimulação, fizemos a sobreposição da expressão de c-Fos através do *overlay* digital (co-localização) dos cortes encefálicos dos animais submetidos à ENV e à EEC para comparar a imunomarcação de c-Fos considerando intensidade, similaridade e alcance.

Estruturas bulbares e o NTS foram ativados principalmente pelo ENV, porém estruturas ativadas em comum à EEC foram observadas ao longo do neuroeixo, tais como o LC, PVN, a matéria cinzenta periaqueductal (PAG), amígdala e os córtex cingulado, parietal e piriforme (Figura 68).

Também fizemos a sobreposição da análise qualitativa mostrando, em cortes coronais (Figura 69) e sagitais (Figura 70), estruturas encefálicas comuns ativadas por ambos tipos de estimulação que podem estar envolvidas no controle da inflamação articular na artrite reumatóide.

Figura 68. Co-localização digital da imunomarcacão de c-Fos na ENV e EEC. Overlay (co-localização digital, em amarelo) do corte coronal do encéfalo de ratos a partir da imunomarcacão induzida pela ENV (verde) e EEC (vermelho) observada ao longo das divisões do neuroeixo. Cg: córtex cingulado; LC: locus coeruleus; NTS: núcleo do trato solitário; PAG: matéria cinzenta periaqueductal; Pir: córtex piriforme; PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo; Retro: córtex retroesplênico. IA: interaural. A escala dos diferentes cortes do encéfalo não foi mantida para facilitar a visualização.

Figura 69. Co-localização da imunomarcção de c-Fos na ENV e EEC em cortes coronais do encéfalo. Microfotografias de secções coronais do encéfalo de rato Wistar mostrando as áreas ativadas após ENV (amarelo) ou EEC (azul) por meio da intensidade da imunomarcção ao c-Fos e do overlay digital (verde) mostrando as áreas ativadas em comum.

Figura 70. Co-localização da imunomarcção de c-Fos na ENV e EEC em cortes sagitais do encéfalo. Microfotografias de secções sagitais do encéfalo de rato Wistar mostrando as áreas ativadas após ENV (verde) ou EEC (vermelho) por meio da intensidade da imunomarcção ao c-Fos e do overlay digital (amarelo) mostrando as áreas ativadas em comum.

4.7. A EEC controlou a inflamação articular no modelo de artrite

À medida que observamos que a EEC aumentou a imunomarcagem de c-Fos no LC e no PVN, de modo similar ao observado após a ENV, especulamos se a estimulação cortical poderiam controlar a inflamação na articulação artrítica. De fato, a estimulação elétrica cortical melhorou o escore experimental da artrite (Figura 71 A), reduziu o diâmetro articular (Figura 71 B) e a migração de neutrófilos (Figura 71 C), além de inibir os níveis sinoviais de TNF (Figura 71 D), IL-1 β (Figura 71 E) e IL-6 (Figura 71 F).

Figura 71. A EEC melhora os parâmetros articulares inflamatórios. (A) escore experimental, (B) diâmetro articular, (C) infiltrado neutrofílico e níveis sinoviais de (D) TNF, (E) IL-1 β e (F) IL-6 na articulação fêmur-tibial em animais submetidos à EEC (60 Hz, 0.5 ms, 50 μ A). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

A EEC também diminuiu a temperatura da cauda dos animais (Figura 72 A) e reduziu a inflamação somente no joelho innervado pela cadeia simpática (Figura 72 B), sugerindo que o sistema nervoso simpático é a principal via eferente para controlar o processo inflamatório articular.

Figura 72. A EEC reduz a inflamação articular via modulação simpática local. (A) A EEC diminuiu a temperatura da cauda de ratos; **(B)** O efeito anti-inflamatório da EEC é inibido da articulação ipsilateral à simpatectomia cirúrgica (Ipsi – SimpX) quando comparado com a articulação contralateral (Contra – SimpX). *** $p < 0.001$.

Desse modo, nosso protocolo de EEC provou-se ser um método seguro para controlar a inflamação no joelho artrítico, pois não induziu:

- 1) Diferenças significativas no comportamento de animais submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE) nas categorias comportamentais clássicas (Figura 73 A-C) e nas medidas etológicas complementares (Figura 73 D-K) 5 minutos após a EEC;

Figura 73. A EEC não altera o comportamento de ratos. Animais submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado e analisados através das medidas etológicas clássicas (A-C) ou complementares (D-K).

- 2) Produção de atividade neuronal epileptiforme aberrante (*spikes*, spikes ou ondas ou bursts) (Reis et al. 2010) observados no eletroencefalograma (EEG) obtidos a partir do hipocampo ou do córtex cerebral (Figura 74) durante ou ao término da EEC;

Figura 74. A EEC não induz alterações no EEG. Traçado superior: exemplos do registro do EEG de um único animal ($n=3$) mostrando a atividade do EEG (em mV) do hipocampo (linha vermelha) e do córtex (linha azul) antes (controle), durante e após a EEC. Traçado inferior: registros mostrando a frequência (Hz) e a intensidade (dB – heatmap) da atividade do EEG medida no hipocampo e no córtex antes (controle), durante e após a EEC (barra amarela).

- 3) Lesões macroscópicas observáveis (necrose, inflamação ou tumores), nos tecidos ósseo e meníngeo (dura-máter e leptomeninges) 7 dias após a implantação do capacete e 6 horas após o fim da EEC (Figura 75);

Figura 75. A EEC não induz lesões macroscópicas locais. Fotografias mostrando a localização das trepanações para a implantação dos eletrodos e dos parafusos de ancoramento (à esquerda: A,D,G) e da ausência de lesões macroscópicas na dura máter (ao centro: B,E,H) e na leptomeninge (à direita: C,F,I) 7 a 10 dias após a implantação do eletrodo nos animais de número 22 (A-C), 33 (D-F) e 32 (G-I).

- 4) Lesões corticais avaliadas pelo aumento da expressão da imunofluorescência ao GFAP (associada a uma potencial neuroinflamação local) em regiões próximas ao eletrodo de estimulação 48 horas após a EEC (Figura 76);

Figura 76. A EEC não aumenta a expressão de GFAP no local de estimulação. Microfotografias de secções coronais do encéfalo de rato Wistar mostrando a expressão de GFAP (verde) em áreas lesadas do córtex parietal em animais controle (à direita), EEC (ao meio) ou cujo córtex foi lesado eletricamente (corrente DC, onda quadrada, 1 mA, 10 seg; 10 mCoulombs) (à direita).

- 5) Aumento da histoquímica fluorescente para Fluoro-Jade (um marcador de necrose) em áreas corticais e subcorticais 48 horas após a EEC (Figura 77);

Figura 77. A EEC não induz a expressão de FluoroJade no tecido neuronal. Microfotografias de secções coronais do encéfalo de ratos Wistar mostrando a expressão de Fluoro Jade (FJ – verde) em neurônios necróticos ao nível do córtex parietal, hipocampo e habênula em animais submetidos à EEC ou ao Status Epilepticus (SE – controle positivo). Barra de escala = 50 μ m.

- 6) Lesões corticais avaliadas pela expressão da imunfluorescência ao ATF3 (marcador de dano neuronal) em áreas corticais e subcorticais 48 horas após a EEC (Figura 78).

Figura 78. A EEC não induz a expressão de ATF3 no tecido neuronal. Microfotografias de secções coronais do encéfalo de rato Wistar mostrando a expressão de ATF3 (flexas) em neurônios em degeneração em estruturas corticais e subcorticais em animais submetidos à EEC ou ao Status Epiléptico (SE – controle positivo). Barra de escala = 20 μ M.

Esses resultados confirmam a efetividade e a segurança da EEC em reduzir a inflamação articular sem efeitos colaterais observáveis.

DISCUSSÃO

“Entender o mundo atual
como ele é, e não como
desejaríamos que ele fosse,
é o princípio da sabedoria”

Bertrand Russell
Filósofo

5. Discussão

O tratamento da artrite reumatóide ainda é um desafio da ciência e da clínica modernas que afeta uma grande parcela da população. Os DMARDs mais promissores agem por meio da neutralização do TNF, porém estas terapias são caras e apresentam vários efeitos colaterais, como a imunossupressão associada ao aumentado risco de contrair infecções graves e tumores (Favalli et al. 2009).

Estudos revelam que hormônios periféricos ou neurotransmissores produzidos pelas glândulas adrenais, baço ou células T de memória são responsáveis pelas propriedades anti-inflamatórias atribuídas a estimulação eferente do nervo vago (Borovikova et al. 2000, Olofsson et al. 2012, Torres-Rosas et al. 2014). Muitos trabalhos vem sugerindo a existência de vias neuroimunes ainda desconhecidas que são localizadas em estruturas supraespinais (Bernik 2002, Arima et al. 2012, Andersson e Tracey 2012, Bassi et al. 2015). De fato, a ativação dessa hipotética via neuronal central seria independente das estruturas neuroimunes conhecidas, uma vez que sua localização seria exclusivamente dentro do encéfalo e da medula espinal (Bassi et al., 2015; Levy et al., 2016). Porém, a localização e os mecanismos dessa hipotética rede central é, até o momento, desconhecida. Para solucionar essa questão, efetuamos uma estimulação precisa e controlada do nervo vago (ENV) aferente com a finalidade de estudar as vias neuronais centrais que controlam uma resposta inflamatória periférica. Nossos resultados indicam que a ENV aferente reduz a inflamação articular independentemente da integridade de estruturas imunomodulatórias clássicas.

Observamos inicialmente que a intensidade do estímulo aplicado ao nervo vago influencia seletivamente no seu efeito. Por exemplo, somente a ENV de baixa intensidade que provocou sutis alterações no sistema cardiovascular reduziu os parâmetros inflamatórios articulares investigados. Esse dado apóia estudos clínicos evidenciando que

pacientes portadores de diversas doenças autoimunes, inclusive na artrite reumatóide, possuem déficits na regulação da resposta autonômica apresentando grandes variações hemodinâmicas quando submetidos a um estresse cardiovascular (Evrengül et al. 2003, Straub et al. 2005), que estão associados a um aumento de 50% no risco de mortalidade por doenças cardiovasculares (Solomon 2003, Maradit-Kremers et al. 2005, Kapetanovic et al. 2011).

Porém, apesar de verificarmos que a ativação do sistema simpático é o responsável pelo efeito anti-inflamatório da ENV, parece um tanto paradoxal que a estimulação de uma via parassimpática induziria a ativação de uma via simpática, visto que ambos sistemas apresentam efeitos antagônicos entre si. Porém podemos citar aqui 2 características ímpares do nervo vago que podem estar relacionados ao efeito observado no presente estudo:

Primeiramente, estudos anatômicos e funcionais demonstram fortes evidências que o nervo vago em si possui um pequeno número de fibras eferentes simpáticas (Randall e Armour 1974, Onkka et al. 2013). Essas fibras se originariam dos próprios corpos celulares parassimpáticos, os quais também dariam origem a eferentes simpáticos que podem ser localizados nos gânglios cervical superior e médio (Randall e Armour 1974, Hopkins e Armour 1984, Onkka et al. 2013). De fato, Onkka e colaboradores observaram a presença de taquicardia curta e intermitente independentemente da atividade do gânglio estrelado (o qual contém os corpos de neurônios simpáticos), mas em sincronia à uma atividade espontânea de baixa intensidade do nervo vago, sugerindo uma origem em componentes internos do nervo vago torácico (Onkka et al. 2013).

Portanto, a ENV poderia influenciar a atividade simpática através da estimulação direta de eferentes simpáticos encontrados no próprio nervo vago. Esses eferentes, por

serem pré-ganglionares influenciariam a atividade da cadeia simpática paravertebral, acarretando a ativação sequencial de outros gânglios simpáticos e consequentemente aumentando a atividade simpática no joelho. Apesar de ser uma idéia plausível, mostramos que o reflexo inflamatório central se localiza exclusivamente dentro do SNC, descartando a hipótese da estimulação periférica do tronco vasossimpático.

Em segundo lugar, outros estudos mostraram que a ENV pode levar à ativação de vias neurais que modulariam diferentemente a atividade autonômica simpática ou parassimpática. Por exemplo, a ENV estimula vias diferentes dependendo da intensidade do estímulo elétrico aplicado (Kember et al. 2014), sendo que a de “baixa” intensidade (± 0.75 a 1.5 mA) produz efeitos taquicárdicos que são lentamente revertidos à medida que a intensidade de estimulação aumenta. Baseando-se em modelos matemáticos, os autores propuseram a existência de uma via parassimpática direta, a qual estimularia diretamente os neurônios motores ganglionares, e uma via parassimpática indireta, a qual interagiria, de modo indireto, com neurônios dos circuitos locais cardíacos. Adicionalmente, outro grupo demonstrou que a estimulação de baixa intensidade (± 0.6 mA) leva paradoxalmente a uma taquicardia que é invertido à medida que a intensidade de estimulação aumenta, propondo que a ativação dos aferentes vagais (cujo limiar de ativação é menor que das fibras eferentes) tem como efeito primário a própria inibição do sistema parassimpático centralmente (Ardell et al. 2015). De fato, os autores também mostraram que a taquicardia induzida pela ENV foi eliminada pela VNX cranial ao eletrodo, sugerindo o envolvimento de mecanismos centrais (Figura 79).

Figura 79. Alterações cardíacas induzidas pela ENV de diferentes intensidades. (A) Atividade do nervo vago (ANV) em relação ao eletrocardiograma (ECG) em animais em repouso mostram atividades vagais espontâneas (setas) que produzem efeitos taquicárdicos breves e intermitentes. Note a ausência da atividade do gânglio estrelado (AGS) ao longo da ANV. (B) Alterações cronotrópicas em relação à ENV esquerdo antes e após a vagotomia (VNX) ipsi ou contralateral ao eletrodo. Observe a ligeira taquicardia provocada pela ENV entre 1 e 2 mA em animais “intactos” e como esse efeito é inibido pela VNX ipsi, mas não pela VNX contralateral. A ENV de baixa intensidade (0.75 mA) provoca efeitos taquicárdicos (C), enquanto a de alta intensidade (175 mA) provoca efeitos bradicárdicos (D). (E) Resposta cardíaca média em relação a intensidades crescentes da ENV. * $p < 0.002$ em relação ao nervo vago intacto; # $p < 0.0001$ em relação à VNX ipsi ou contralateral. A: Extraído de Onkka et al. (2013); B: Extraído de Ardell et al., 2015; C-E: Extraído de Kember et al., 2014.

De fato, nossos dados corroboram a literatura que mostra o aumento da atividade simpática durante uma sutil estimulação vagal, e esse efeito é revertido em estimulações mais altas (Figura 80).

Figura 80. Gráfico da modulação da atividade simpática pela ENV. Gráfico hipotético mostrando o possível efeito do aumento na intensidades de estimulação do nervo vago (ENV) em relação ao fenótipo observado na atividade simpática, parassimpática e cardíaca.

Apesar de estudos mostrarem que a ativação do sistema nervoso simpático e a noradrenalina (NA) podem regular a atividade de células imunes (Madden et al. 1994, Nance e Sanders 2007, Bhowmick et al. 2009), nossos resultados mostram que o efeito anti-inflamatório da ENV é devido à redução local de ICAM-1. De fato, estudos mostram que a noradrenalina reduz a interação linfócito-endotélio *in vitro* (Benschop et al. 1993, 1994, Carlson et al. 1996) e inibe a expressão de ICAM-1 endotelial (Kuroki et al. 2004, OtextquotesingleSullivan et al. 2010). É importante destacar que esse efeito foi devido à ativação de receptores β -adrenérgicos (Benschop et al. 1993, 1994, Takahashi 2003, Kuroki et al. 2004, OtextquotesingleSullivan et al. 2010, Ryan et al. 2013, Noguchi et al. 2015). Desse modo, encontramos que a administração intra-articular de agonistas β -adrenérgicos reduz a inflamação articular, e a administração de antagonistas β -adrenérgicos bloqueia o efeito da estimulação vagal, indicando que esses receptores estão envolvidos no efeito imunomodulatório das catecolaminas articulares.

Dado que estudos imunohistoquímicos prévios mostraram que a ENV pode aumentar a expressão de c-Fos em vários núcleos encefálicos (Naritoku et al. 1995, Cunningham et al. 2008), encontramos que a estimulação vagal de baixa intensidade aumenta a expressão de c-Fos em estruturas supramedulares simpatoexcitatórias, tais como o LC e o PVN, corroborando dados da literatura (Rutherford et al. 1992, Yousfi-Malki e Puizillout 1994, Naritoku et al. 1995, Osharina et al. 2006, Cunningham et al. 2008, Rijkers et al. 2012). É importante destacar que ambos PVN e LC recebem conexões diretas provindas do NTS (Ricardo e Koh 1978, Cechetto 1987). Desse modo, o papel das estruturas simpáticas centrais foi comprovada uma vez que a estimulação elétrica do LC e do PVN atenua a inflamação articular, porém somente o LC foi para o efeito anti-inflamatório vagal. Esse aparente afunilamento da informação neuroimune corrobora estudos da literatura indicando que o LC e regiões pericerúleas recebem projeções sinápticas de várias áreas importantes do SNC, como bulbo rostral e ventrolateral,

hipotálamo, córtex pré-frontal, amígdala e núcleos da rafe (Cedarbaum e Aghajanian 1978, Shipley et al. 1996, Aston-Jones e Card 2000).

Dado que também observamos o aumento na expressão de c-Fos em áreas corticais após a ENV, tais como os córtex cingulado e o parietal, também estudamos seu potencial imunomodulador. A partir desses dados, adotamos um método de estimulação elétrica direcionada para o córtex na tentativa de mimetizar os efeitos anti-inflamatórios da ENV. Quando o estímulo elétrico é direcionado para o córtex parietal, observamos o aumento da expressão de c-Fos nessa área e também do LC, com consequente melhora da inflamação articular. Além disso, nosso protocolo não causou qualquer dano neuronal, distúrbios comportamentais ou induziu atividade epileptogênica aberrante no córtex ou no hipocampo. Esses resultados sugerem que a estimulação elétrica cortical (EEC) pode ser utilizada como uma nova e segura terapia alternativa para tratar a artrite reumatóide, com o potencial terapêutico não farmacológico semelhante aos anticorpos anti-TNF (Edrees et al. 2005, Upchurch e Kay 2012), e de forma não invasivo como observado na implantação cirúrgica do estimulador de nervo vago (Koopman et al. 2014, 2016).

Além disso, nossos dados apóiam fortemente duas teorias encefálicas correntes: a existência de um *homúnculo imunológico* (imúnculo) com um papel direto sobre as respostas encéfalo-imune (Cohen e Young 1991) e a *teoria polivagal* com um papel modulador em respostas vagais-comportamentais (Porges 1995).

Diferentemente da VCA, a qual coordena funcional e anatomicamente as respostas de citocinas por meio de vias neurais análogas a outros sistemas fisiológicos complexos – como o eixo HPA, o homúnculo imunológico mostra a existência de regiões encefálicas específicas que podem controlar as repostas imunes em órgãos específicos: uma área encefálica poderia modular a resposta de citocinas no fígado e outra regular a ativação de células T no baço ou linfonodos (Cohen e Young 1991, Diamond e Tracey

2011). Apesar dessa divisão neural da resposta imune em compartimentos orgânicos seja um tanto romântica, não podemos descartar que a ativação da VCA contém, em maior ou menor grau, componentes do reflexo inflamatório central, visto a inexistência de uma conexão vagal-esplênica. Um estudo clínico mostrou que um indivíduo treinados conseguiam ativar voluntariamente o sistema nervoso simpático (Kox et al. 2012b, 2012a), liberando catecolaminas e com consequente redução da produção citocinas induzida pela administração de baixas doses de LPS (Kox et al. 2014), sugerindo que a ativação voluntária de áreas encefálicas específicas pode ter efeitos imunorreguladores. Adicionalmente, outros estudos demonstram que fatores psicológicos podem influenciar várias condições mediadas pelo sistema imune (Benedetti 2008, Holtforth et al. 2011, Sharpe e Schrieber 2012). De fato, a expectativa em relação ao prognóstico da doença pode influenciar as próprias consequências do tratamento e do desenvolvimento da doença (Kaptchuk et al. 2009, Ader et al. 2010, Bartels et al. 2014), como evidenciado por estudos envolvendo os efeitos do tratamento placebo (Stewart-Williams e Podd 2004, Pacheco-López et al. 2006, Doering e Rief 2012, Enck et al. 2013). Além disso, o otimismo em relação a um determinado evento, reduz o estresse e melhora o sistema imune (Rasmussen et al. 2009, Meevissen et al. 2011, Hanssen et al. 2012, Evers et al. 2014) e essa percepção de um evento futuro necessita de um alto grau de cognição que exige a ativação e interação de estruturas corticais específicas, tais como o córtex parietal e o cíngulo (Paulus et al. 2002, Kingery 2003, Honk et al. 2003, Pascalis et al. 2013), sugerindo o efeito imunomodulador do córtex. De fato, estudos clínicos mostram que lesões do lobo parietal podem aumentar o risco de cardiopatias de origem neurogênica (Naver et al. 1996, Hilz et al. 2002, Li e Jia 2012), sugerindo a participação de outras estruturas corticais e subcorticais no controle da atividade dessa área do córtex.

A Teoria Polivagal propõe que as respostas fisiológicas adotadas em comportamentos de sobrevivência, como aqueles mais primitivos e menos sociais,

produzem efeitos cada vez mais complexos e somatórios à medida que avançamos na cadeia evolutiva. Se observamos as respostas fisiológicas mais primitivas de sobrevivência, tal como a resposta de luta ou fuga, a estratégia comportamental adotada ao longo da cadeia evolutiva é diferente entre as espécies. Répteis, tais como iguanas, cobras e tartarugas, apresentam uma resposta neurogênica de bradicardia na presença de grande estresse ou morte iminente, caracterizando-se na orientação comportamental focada no congelamento (*freezing*) da atividade motora. (Belkin 1964, McDonald 1974, Lanteri et al. 1980). De fato, a bradicardia em répteis é adaptativa e não compromete a fisiologia do animal, devido à sua menor necessidade metabólica e menor dependência do oxigênio que mamíferos. Por outro lado, essa estratégia comportamental é potencialmente letal em mamíferos que precisam aumentar sua demanda metabólica para suprir as necessidades de um comportamento de luta ou fuga. Neste caso, a bradicardia neurogênica por longos períodos poderia reduzir as demandas de oxigênio e do metabolismo, comprometendo a função do SNC e a resposta de sobrevivência. Portanto, podemos sugerir que os mecanismos vagais que levam ao aumento da atividade simpática, como a ativação do LC e do PVN, pode ser um resquício fisiológico evolutivo de uma ancestral comum próximo aos répteis. Desse modo, podemos transportar essa linha de pensamento para o efeito observado após a ENV, sugerindo que o efeito anti-inflamatório da estimulação vagal precede a função parassimpática do nervo.

CONCLUSÃO

“A grande tragédia da Ciência:
o assassinato de uma
bela hipótese por um
fato desagradável”

Thomas Henry Huxley
Cientista inglês

6. Conclusão

Nosso estudo fornece, pela primeira vez, uma dissecação cuidadosa e abrangente de uma nova via neuroimune, o reflexo inflamatório central, descrevendo um mapa neuroimune encefálico para o controle da inflamação articular na artrite reumatóide (Figura 81), podendo ser utilizado como terapia e evitar as limitações dos tratamentos farmacológicos atuais.

Figura 81. O Reflexo Inflamatório Central. A ENV aferente (verde) ou a EEC (vermelho) controla a inflamação articular por meio da ativação de áreas encefálicas simpatoexcitatórias (amarelo) e fibras simpáticas locais para aumentar os níveis articulares de noradrenalina (NA) para reduzir a inflamação articular.

REFERÊNCIAS

“Não existe
tal coisa do desconhecido.
Somente as coisas
temporariamente escondidas,
e que temporariamente
não entendemos”

James Tiberius Kirk
Comandante da USS Enterprise

7. Referências

- Abercrombie, E. D., e B. L. Jacobs. 1987. Single-unit response of noradrenergic neurons in the locus coeruleus of freely moving cats. I. Acutely presented stressful e nonstressful stimuli. *J Neurosci* 7:2837–2843.
- ACR-Guidelines. 1996. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 39:713–722.
- Ader, R., e N. Cohen. 1975. Behaviorally conditioned immunosuppression. *Psychosom Med* 37:333–340.
- Ader, R., M. G. Mercurio, J. Walton, D. James, M. Davis, V. Ojha, A. B. Kimball, e D. Fiorentino. 2010. Conditioned Pharmacotherapeutic Effects: A Preliminary Study. *Psychosomatic Medicine* 72:192–197.
- Alamanos, Y., e A. A. Drosos. 2005. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 4:130–136.
- Alican, F., e J. D. Hardy. 1962. Sympatho-adrenal system in endotoxin shock. *Surg Forum* 13:8–10.
- Altamura, M., L. Caradonna, L. Amati, N. M. Pellegrino, G. Urgesi, e S. Miniello. 2001. Splenectomy e sepsis: the role of the spleen in the immune-mediated bacterial clearance. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 23:153–161.
- Andersson, U., e K. J. Tracey. 2012. Neural reflexes in inflammation e immunity. *The Journal of Experimental Medicine* 209:1057–1068.
- Andrade, R., e G. K. Aghajanian. 1982. Single cell activity in the noradrenergic A-5 region: Responses to drugs e peripheral manipulations of blood pressure. *Brain Research* 242:125–135.
- Anseloni, V. Z. 1997. Efeitos antiaversivos de microinjeções de morfina na materia cinzenta periaquedutal dorsal e Nucleo Acumbens de Ratos Submetidos Ao Labirinto Em Cruz Elevado. . Tese de Doutorado.
- Anseloni, V. Z., e M. L. Brandão. 1997. Ethopharmacological analysis of behaviour of rats using variations of the elevated plus-maze. *Behav Pharmacol* 8:533–540.
- Antonica, A., F. Magni, L. Mearini, e N. Paolocci. 1994. Vagal control of lymphocyte release from rat thymus. *J Auton Nerv Syst* 48:187–197.
- Ardell, J. L., P. S. Ragendran, H. A. Nier, B. H. KenKnight, e J. A. Armour. 2015. Central-Peripheral Neural Network Interactions Evoked by Vagus Nerve Stimulation: Functional Consequences on Control of Cardiac Function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*:ajpheart.00557.2015.
- Arend, W. P. 2001. Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 45:101–106.
- Arima, Y., M. Harada, D. Kamimura, J.-H. Park, F. Kawano, F. E. Yull, T. Kawamoto, Y. Iwakura, U. A. K. Betz, G. Márquez, T. S. Blackwell, Y. Ohira, T. Hirano, e M. Murakami. 2012. Regional Neural Activation Defines a Gateway for Autoreactive T Cells to Cross the Blood-Brain Barrier. *Cell* 148:447–457.
- Arora, S., e R. K. Sanyal. 1968. The role of the adrenergic system in the mechanism of action of Bordetella pertussis vaccine. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 33:299–305.
- Aston-Jones, G., e J. P. Card. 2000. Use of pseudorabies virus to delineate multisynaptic circuits in brain: opportunities e limitations. *J Neurosci Methods* 103:51–61.

- Bachman, S. L., E. J. Hanly, D. Saad, J. I. Nwanko, J. Lamb, A. E. Herring, M. R. Marohn, A. De-Maio, e M. A. Talamini. 2005. The role of the spleen in laparoscopy-associated inflammatory response. *Surg Endosc* 19:1035–1044.
- Balitskii, K., V. Vinnitskii, e K. Takaishvili. 1976. The role of the hypothalamus in the formation of antitumor resistance. *Vopr Onkol* 22:69–75.
- Baljet, B., e J. Drukker. 1979. The extrinsic innervation of the abdominal organs in the female rat. *Acta Anat (Basel)* 104:243–267.
- Banks, W. A., A. J. Kastin, e E. G. Gutierrez. 1994. Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neurosci Lett* 179:53–56.
- Banks, W. A., L. Ortiz, S. R. Plotkin, e A. J. Kastin. 1991. Human interleukin (IL) 1 alpha, murine IL-1 alpha e murine IL-1 beta are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 259:988–996.
- Bard, P. 1928. A diencephalic mechanism for the expression of rage with special reference to the sympathetic nervous system. *American Journal of Physiology – Legacy Content* 84:490–515.
- Barksby, H. E., S. R. Lea, P. M. Preshaw, e J. J. Taylor. 2007. The expanding family of interleukin-1 cytokines e their role in destructive inflammatory disorders. *Clinical & Experimental Immunology* 149:217–225.
- Barnhart, M. I., J. M. Riddle, e G. B. Bluhm. 1967. Immunocytology in arthritic joints. *Annals of the Rheumatic Diseases* 26:281–296.
- Bartels, D. J. P., A. I. M. van Laarhoven, E. A. Haverkamp, O. H. Wilder-Smith, A. R. T. Donders, H. van Middendorp, P. C. M. van de Kerkhof, e A. W. M. Evers. 2014. Role of Conditioning e Verbal Suggestion in Placebo e Nocebo Effects on Itch. *PLoS ONE* 9:e91727.
- Bassi, G. S., F. Brognara, J. A. Castania, J. Talbot, T. M. Cunha, F. Q. Cunha, L. Ulloa, A. Kanashiro, D. P. Dias, e H. C. Salgado. 2015. Baroreflex activation in conscious rats modulates the joint inflammatory response via sympathetic function. *Brain Behav Immun* 49:140–147.
- Beckett, A., e T. Manschreck. 1988. Neuropsychiatric complications of HIV infection: public policy implications. *N Engl J Public Policy* 4:111–119.
- Beckett, A., P. Summergrad, T. Manschreck, H. Vitagliano, M. Henderson, M. L. Buttolph, e M. Jenike. 1987. Symptomatic HIV infection of the CNS in a patient without clinical evidence of immune deficiency. *Am J Psychiatry* 144:1342–1344.
- Beckstead, R. M., e R. Norgren. 1979. An autoradiographic examination of the central distribution of the trigeminal, facial, glossopharyngeal, e vagal nerves in the monkey. *J Comp Neurol* 184:455–472.
- Beeson, P. B. 1945. A study of the fever resulting from intravenous injection of pyrogens. *Proc Am Fed Clin Res* 2:79.
- Belcher, C. 2002. Synovial fluid neutrophil function in RA: the effect of pregnancy associated proteins. *Annals of the Rheumatic Diseases* 61:379–380.
- Belkin, D. A. 1964. Variations in Heart Rate during Voluntary Diving in the Turtle *Pseudemys concinna*. *Copeia* 1964:321.
- Bellinger, D. L., S. Y. Felten, D. Lorton, e D. L. Felten. 1989. Origin of noradrenergic innervation of the spleen in rats. *Brain Behav Immun* 3:291–311.

- Bellinger, D. L., D. Lorton, R. W. Hamill, S. Y. Felten, e D. L. Felten. 1993. Acetylcholinesterase staining e choline acetyltransferase activity in the young adult rat spleen: lack of evidence for cholinergic innervation. *Brain Behav Immun* 7:191–204.
- Benarroch, E. E. 2005. Paraventricular nucleus, stress response, e cardiovascular disease. *Clinical Autonomic Research* 15:254–263.
- Benedetti, F. 2008. Mechanisms of Placebo e Placebo-Related Effects Across Diseases e Treatments. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48:33–60.
- Benschop, R. J., F. P. Nijkamp, R. E. Ballieux, e C. J. Heijnen. 1994. The effects of beta-adrenoceptor stimulation on adhesion of human natural killer cells to cultured endothelium. *Br J Pharmacol* 113:1311–1316.
- Benschop, R. J., F. G. Oostveen, C. J. Heijnen, e R. E. Ballieux. 1993. Beta 2-adrenergic stimulation causes detachment of natural killer cells from cultured endothelium. *Eur J Immunol* 23:3242–3247.
- Berda-Haddad, Y., S. Robert, P. Salers, L. Zekraoui, C. Farnarier, C. A. Dinarello, F. Dignat-George, e G. Kaplanski. 2011. Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:20684–20689.
- Berg, D. K., e Z. W. Hall. 1975. Loss of alpha-bungarotoxin from junctional e extrajunctional acetylcholine receptors in rat diaphragm muscle in vivo e in organ culture. *The Journal of Physiology* 252:771–789.
- Bernard, C. 1878. *Lectures on the phenomena of life common to animals e plants.* . Thomas.
- Bernik, T. R. 2002. Pharmacological Stimulation of the Cholinergic Antiinflammatory Pathway. *Journal of Experimental Medicine* 195:781–788.
- Berthoud, H. R., e T. L. Powley. 1993. Characterization of vagal innervation to the rat celiac, suprarenal e mesenteric ganglia. *J Auton Nerv Syst* 42:153–169.
- Besedovsky, H., A. del Rey, E. Sorkin, M. D. Prada, R. Burri, e C. Honegger. 1983. The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons. *Science* 221:564–566.
- Besedovsky, H., E. Sorkin, D. Felix, e H. Haas. 1977. Hypothalamic changes during the immune response. *Eur J Immunol* 7:323–325.
- Betтели, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, e V. K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 e regulatory T cells. *Nature* 441:235–238.
- Beutler, B., e A. Cerami. 1988. The history, properties, e biological effects of cachectin. *Biochemistry* 27:7575–7582.
- Beyer, C., e D. S. Pisetsky. 2009. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 6:21–29.
- Bhowmick, S., A. Singh, R. A. Flavell, R. B. Clark, J. OtextquotesingleRourke, e R. E. Cone. 2009. The sympathetic nervous system modulates CD4mathplusFoxP3mathplus regulatory T cells via a TGF- -dependent mechanism. *Journal of Leukocyte Biology* 86:1275–1283.
- Bienkowski, M. S., e L. Rinaman. 2008. Noradrenergic inputs to the paraventricular hypothalamus contribute to hypothalamic–pituitary–adrenal axis e central Fos activation in rats after acute systemic endotoxin exposure. *Neuroscience* 156:1093–1102.
- Blalock, J. E. 1984. The immune system as a sensory organ. *J Immunol* 132:1067–1070.

- Blatteis, C. M., e E. Sehic. 1997. Circulating pyrogen signaling of the brain. A new working hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* 813:445–447.
- Bluthe, R. M., B. Michaud, K. W. Kelley, e R. Dantzer. 1996. Vagotomy blocks behavioural effects of interleukin-1 injected via the intraperitoneal route but not via other systemic routes. *Neuroreport* 7:2823–2827.
- Bluthe, R. M., V. Walter, P. Parnet, S. Layé, J. Lestage, D. Verrier, S. Poole, B. E. Stenning, K. W. Kelley, e R. Dantzer. 1994. Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. *C R Acad Sci III* 317:499–503.
- Van Bockstaele, E. J., J. Peoples, e P. Telegan. 1999. Efferent projections of the nucleus of the solitary tract to peri-locus coeruleus dendrites in rat brain: evidence for a monosynaptic pathway. *J Comp Neurol* 412:410–428.
- Boekelaar, A. 1985. The extrinsic innervation of the stomach e other upper gastrointestinal organs in the rat: Morphology e morphogenesis. . University of Amsterdam (PhD thesis).
- Bongartz, T., A. J. Sutton, M. J. Sweeting, I. Buchan, E. L. Matteson, e V. Montori. 2006. Anti-TNF Antibody Therapy in Rheumatoid Arthritis e the Risk of Serious Infections e Malignancies. *JAMA* 295:2275.
- Bornstein, S. R., M. Ehrhart-bornstein, W. A. Scherbaum, E. F. Pfeiffer, e J. J. Holst. 1990. Effects of Splanchnic Nerve Stimulation on the Adrenal Cortex May Be Mediated by Chromaffin Cells in a Paracrine Manner. *Endocrinology* 127:900–906.
- Borovikova, L. V., S. Ivanova, M. Zhang, H. Yang, G. I. Botchkina, L. R. Watkins, H. Wang, N. Abumrad, J. W. Eaton, e K. J. Tracey. 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405:458–462.
- Borregaard, N. 2010. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* 33:657–670.
- Borregaard, N., O. E. Sørensen, e K. Theilgaard-Mönch. 2007. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends in Immunology* 28:340–345.
- Bourguery, J. B. M. 1844. *Traité complet de l'anatomie de l'homme: comprenant la médecine opératoire* 1831-1844. (C. Delaunay, Ed.).
- Brady, L. S., A. B. Lynn, M. Herkenham, e Z. Gottesfeld. 1994. Systemic interleukin-1 induces early e late patterns of c-fos mRNA expression in brain. *J Neurosci* 14:4951–4964.
- Bratton, B. O., D. Martelli, M. J. McKinley, D. Trevaks, C. R. Anderson, e R. M. McAllen. 2012. Neural regulation of inflammation: no neural connection from the vagus to splenic sympathetic neurons. *Exp Physiol* 97:1180–1185.
- Bresnihan, B., J. M. Alvaro-Gracia, M. Cobby, M. Doherty, Z. Domljan, P. Emery, G. Nuki, K. Pavelka, R. Rau, B. Rozman, I. Watt, B. Williams, R. Aitchison, D. McCabe, e P. Musikic. 1998. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 41:2196–2204.
- Bresnihan, B., R. Newmark, S. Robbins, e H. K. Genant. 2004. Effects of anakinra monotherapy on joint damage in patients with rheumatoid arthritis. Extension of a 24-week randomized, placebo-controlled trial. *J Rheumatol* 31:1103–1111.
- Bredibat, J. L., R. M. Bluthe, S. Kent, K. W. Kelley, e R. Dantzer. 1995. Lipopolysaccharide e Interleukin-1 Depress Food-Motivated Behavior in Mice by a Vagal-Mediated Mechanism. *Brain, Behavior, e Immunity* 9:242–246.

- Briggs, G. W., e W. M. Brown. 1960. Neurological complications of antirabies vaccine; treatment with corticosteroids. *J Am Med Assoc* 173:802–804.
- Brodal, P. 2010. The central nervous system : structure e function. . Oxford University Press, New York.
- Broeder, A. A. den, G. J. Wanten, W. J. Oyen, T. Naber, P. L. van Riel, e P. Barrera. 2003. Neutrophil migration e production of reactive oxygen species during treatment with a fully human anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 30:232–237.
- Brooks, W. H., R. J. Cross, T. L. Roszman, e W. R. Markesbery. 1982. Neuroimmunomodulation: Neural anatomical basis for impairment e facilitation. *Annals of Neurology* 12:56–61.
- Buijs, R. M., J. van der Vliet, M. L. Garidou, I. Huitinga, e C. Escobar. 2008. Spleen vagal denervation inhibits the production of antibodies to circulating antigens. *PLoS One* 3.
- Buller, K. M. 2003. Neuroimmune stress responses: reciprocal connections between the hypothalamus e the brainstem. *Stress* 6:11–17.
- Bulloch, K., M. R. Cullen, R. H. Schwartz, e D. L. Longo. 1987. Development of innervation within syngeneic thymus tissue transplanted under the kidney capsule of the nude mouse: A light e ultrastructural microscope study. *J. Neurosci. Res.* 18:16–27.
- Burmester, G. R., R. Panaccione, K. B. Gordon, M. J. McIlraith, e A. P. M. Lacerda. 2012. Adalimumab: long-term safety in 23 458 patients from global clinical trials in rheumatoid arthritis, juvenile idiopathic arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, psoriasis e Crohn's disease. *Annals of the Rheumatic Diseases* 72:517–524.
- Burns, S. M., e J. M. Wyss. 1985. The involvement of the anterior cingulate cortex in blood pressure control. *Brain Res* 340:71–77.
- Butler, P. D., J. M. Weiss, J. C. Stout, e C. B. Nemeroff. 1990. Corticotropin-releasing factor produces fear-enhancing e behavioral activating effects following infusion into the locus coeruleus. *J Neurosci* 10:176–183.
- Cailotto, C., L. M. Costes, J. van der Vliet, S. H. van Bree, J. J. van Heerikhuize, R. M. Buijs, e G. E. Boeckxstaens. 2012. Neuroanatomical evidence demonstrating the existence of the vagal anti-inflammatory reflex in the intestine. *Neurogastroenterol Motil* 24:191–200.
- Caldwell, F. T., D. B. Graves, e B. H. Wallace. 1999. Humoral versus neural pathways for fever production in rats after administration of lipopolysaccharide. *J Trauma* 47:120–129.
- Cammermeyer, J. 1961. The importance of avoiding 'dark' neurons in experimental neuropathology. *Acta Neuropathologica* 1:245–270.
- Campbell, G. 1970. Smooth muscle. Pages 451–495 in L. Arnold, editor. *Bülbring E, Brading A, Jones A, Tomita T.*
- Camussi, G., E. Albano, C. Tetta, e F. Bussolino. 1991. The molecular action of tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Biochem* 202:3–14.
- Cannon, W. B. 1927. The James-Lange Theory of Emotions: A Critical Examination e an Alternative Theory. *The American Journal of Psychology* 39:106.
- Cannon, W. B. 1932. The wisdom of the body. . W.W. Norton & Company, inc.
- Cano, G., A. F. Sved, L. Rinaman, B. S. Rabin, e J. P. Card. 2001. Characterization of the central nervous system innervation of the rat spleen using viral transneuronal tracing. *J Comp Neurol* 439:1–18.

- Carlson, S. L., D. J. Beiting, C. A. Kiani, K. M. Abell, e J. P. McGillis. 1996. Catecholamines Decrease Lymphocyte Adhesion to Cytokine-Activated Endothelial Cells. *Brain, Behavior, e Immunity* 10:55–67.
- Carmona, L., M. A. Descalzo, E. Perez-Pampin, D. Ruiz-Montesinos, A. Erra, T. Cobo, J. J. Gómez-Reino, BIOBADASER, e E. Groups. 2007. All-cause e cause-specific mortality in rheumatoid arthritis are not greater than expected when treated with tumour necrosis factor antagonists. *Ann Rheum Dis* 66:880–885.
- Caroleo, M. C., L. Pulvirenti, M. Arbitrio, R. Lopilato, e G. Nisticò. 1993. Evidence that CRH microinfused into the locus coeruleus decreases cell-mediated immune response in rats. *Funct Neurol* 8:271–277.
- Casale, T., e M. Kaliner. 1984. Demonstration that circulating human blood cells have no detectable alpha-adrenergic receptors by radioligand binding analysis. *Journal of Allergy e Clinical Immunology* 74:812–818.
- Cascão, R., H. S. Rosário, M. M. Souto-Carneiro, e J. E. Fonseca. 2010. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmunity Reviews* 9:531–535.
- Castro, O. W., M. A. Furtado, C. Q. Tilelli, A. Fernandes, G. P. Pajolla, e N. Garcia-Cairasco. 2011. Comparative neuroanatomical e temporal characterization of FluoroJade-positive neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic e intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. *Brain Research* 1374:43–55.
- Ceccatelli, S., M. J. Villar, M. Goldstein, e T. Hökfelt. 1989. Expression of c-Fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9569–9573.
- Cechetto, D. F. 1987. Central representation of visceral function. *Fed Proc* 46:17–23.
- Cedarbaum, J. M., e G. K. Aghajanian. 1978. Afferent projections to the rat locus coeruleus as determined by a retrograde tracing technique. *J Comp Neurol* 178:1–16.
- Chang, C. C., e M. C. Huang. 1975. Turnover of junctional e extrajunctional acetylcholine receptors of the rat diaphragm. *Nature* 253:643–644.
- Chen, B. P., G. Liang, J. Whelan, e T. Hai. 1994. ATF3 e ATF3 delta Zip. Transcriptional repression versus activation by alternatively spliced isoforms. *Journal of Biological Chemistry* 269:15819–15826.
- Chen, X. H., M. Itoh, W. Sun, T. Miki, e Y. Takeuchi. 1996. Localization of sympathetic e parasympathetic neurons innervating pancreas e spleen in the cat. *J Auton Nerv Syst* 59:12–16.
- Chiu, H.-Y., P.-R. Hsueh, e T.-F. Tsai. 2011. Clinical experience of QuantiFERON®-TB Gold testing in patients with psoriasis treated with tumour necrosis factor blockers in Taiwan. *British Journal of Dermatology*:no–no.
- Clara, M. 1942. *Das Nervensystem des Menschen. Lehrbuch für Studierende und Ärzte.* . Barth, Leipzig.
- Clark, W., P. Jobanputra, P. Barton, e A. Burls. 2004. The clinical e cost-effectiveness of anakinra for the treatment of rheumatoid arthritis in adults: a systematic review e economic analysis. *Health Technol Assess* 8.
- Cohen, I. R., e D. B. Young. 1991. Autoimmunity, microbial immunity e the immunological homunculus. *Immunology Today* 12:105–110.
- Cohen, S., E. Hurd, J. Cush, M. Schiff, M. E. Weinblatt, L. W. Moreland, J. Kremer, M. B. Bear, W. J. Rich, e D. McCabe. 2002. Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate: Results of a twenty-four-

- week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis & Rheumatism* 46:614–624.
- Colouma, P. 1937. La terminaison des nerfs pneumogastriques et ses variations – Etude d'Anatomie descriptive comparée chez l'Homme et dans la série des Vertébrés. . Lille's University, Paris, France.
- Coote, J. H. 2004. The Hypothalamus e Cardiovascular Regulation. Pages 117–146 *Neural Mechanisms of Cardiovascular Regulation*. . Springer Science mathplus Business Media.
- Costantini, T. W., V. Bansal, M. Krzyzaniak, J. G. Putnam, C. Y. Peterson, W. H. Loomis, P. Wolf, A. Baird, B. P. Eliceiri, e R. Coimbra. 2010. Vagal nerve stimulation protects against burn-induced intestinal injury through activation of enteric glia cells. *AJP: Gastrointestinal e Liver Physiology* 299:G1308–G1318.
- Costenbader, K. H., D. Feskanich, M. J. Stampfer, e E. W. Karlson. 2007. Reproductive e menopausal factors e risk of systemic lupus erythematosus in women. *Arthritis Rheum* 56:1251–1262.
- Coupland, R. E., T. L. Parker, W. K. Kesse, e A. A. Mohamed. 1989. The innervation of the adrenal gland. III. Vagal innervation. *J Anat* 163:173–181.
- Cowland, J. B., e N. Borregaard. 1999. The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules. *J Leukoc Biol* 66:989–995.
- Crawley, J. N., S. E. Hattox, J. W. Maas, e R. H. Roth. 1978. 3-Methoxy-4-hydroxyphenethyleneglycol increase in plasma after stimulation of the nucleus locus coeruleus. *Brain Research* 141:380–384.
- Crawley, J. N., J. W. Maas, e R. H. Roth. 1980. Evidence against specificity of electrical stimulation of the nucleus locus coeruleus in activating the sympathetic nervous system in the rat. *Brain Res* 183:301–311.
- Cross, A., R. C. Bucknall, M. A. Cassatella, S. W. Edwards, e R. J. Moots. 2003. Synovial fluid neutrophils transcribe e express class II major histocompatibility complex molecules in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 48:2796–2806.
- Cross, R. J., W. H. Brooks, T. L. Roszman, e W. R. Markesbery. 1982. Hypothalamic-immune interactions. *Journal of the Neurological Sciences* 53:557–566.
- Cross, R. J., W. R. Markesbery, W. H. Brooks, e T. L. Roszman. 1980. Hypothalamic-immune interactions. I. The acute effect of anterior hypothalamic lesions on the immune response. *Brain Research* 196:79–87.
- Cruz, A. P., F. Frei, e F. G. Graeff. 1994. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 49:171–176.
- Cullinan, W. E., J. P. Herman, D. F. Battaglia, H. Akil, e S. J. Watson. 1995. Pattern e time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 64:477–505.
- Cunnick, J. E., D. T. Lysle, B. J. Kucinski, e B. S. Rabin. 1990. Evidence that shock-induced immune suppression is mediated by adrenal hormones e peripheral beta-adrenergic receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 36:645–651.
- Cunningham, J. T., S. W. Mifflin, G. G. Gould, e A. Frazer. 2008. Induction of c-Fos e DeltaFosB immunoreactivity in rat brain by Vagal nerve stimulation. *Neuropsychopharmacology* 33:1884–1895.

- Curran, T., e N. M. Teich. 1982. Candidate product of the FBJ murine osteosarcoma virus oncogene: characterization of a 55,000-dalton phosphoprotein. *J Virol* 42:114–122.
- Curtis, A. L., S. M. Lechner, L. A. Pavcovich, e R. J. Valentino. 1997. Activation of the locus coeruleus noradrenergic system by intracoeular microinfusion of corticotropin-releasing factor: effects on discharge rate, cortical norepinephrine levels e cortical electroencephalographic activity. *J Pharmacol Exp Ther* 281:163–172.
- Curtis, J. R., N. Patkar, A. Xie, C. Martin, J. J. Allison, M. Saag, D. Shatin, e K. G. Saag. 2007. Risk of serious bacterial infections among rheumatoid arthritis patients exposed to tumor necrosis factor antagonists. *Arthritis Rheum* 56:1125–1133.
- Dale, H. H. 1914. The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *Journal of Pharmacology e Experimental Therapeutics* 6:147–190.
- Dale, H. H., e H. W. Dudley. 1929. The presence of histamine e acetylcholine in the spleen of the ox e the horse. *J Physiol* 68:97–123.
- Dalsgaard, C. J., T. Hökfelt, L. G. Elfvin, L. Skirboll, e P. Emson. 1982. Substance P-containing primary sensory neurons projecting to the inferior mesenteric ganglion: evidence from combined retrograde tracing e immunohistochemistry. *Neuroscience* 7:647–654.
- Dayer, J. M., B. de Rochemonteix, B. Burrus, S. Demczuk, e C. A. Dinarello. 1986. Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase e prostaglandin E2 production by human synovial cells. *J Clin Invest* 77:645–648.
- Dayer, J.-M. 2003. The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 42:3ii–10.
- Deriy, L. V., D. W. Beno, M. R. Uhing, V. A. Jiyamapa-Serna, e R. E. Kimura. 2002. Splenectomy ablates endotoxin-induced IFN γ response in rats. *Shock* 17:312–315.
- Devi, R. S., e A. Namasivayam. 1991. Modulation of specific immunity by ventral hippocampal formation in albino rats. *Journal of Neuroimmunology* 33:1–6.
- Diamond, B., e K. J. Tracey. 2011. Mapping the immunological homunculus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:3461–3462.
- Diego, A. M. G. D., L. Gandia, e A. G. Garcia. 2007. A physiological view of the central e peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta Physiologica* 192:287–301.
- Dinarello, C. A. 2002. The IL-1 family e inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* 20:1–13.
- Doering, B. K., e W. Rief. 2012. Utilizing placebo mechanisms for dose reduction in pharmacotherapy. *Trends in Pharmacological Sciences* 33:165–172.
- Douglas, W. W. 1954. The role of local sympathetic innervation in pyrogen-induced vasoconstriction occurring in the rabbit ear. *J. Physiol. (Lond.)* 126:319–328.
- Drolet, G., e P. Gauthier. 1985. Peripheral e central mechanisms of the pressor response elicited by stimulation of the locus coeruleus in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 63:599–605.
- Dularay, B., J. S. Badesha, P. A. Dieppe, e C. J. Elson. 1990. Oxidative response of polymorphonuclear leucocytes to synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 49:661–664.
- Dularay, B., C. J. Elson, e P. A. Dieppe. 1988. Enhanced oxidative response of polymorphonuclear leukocytes from synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* 1:159–169.

- Duncan, M. R., e B. Berman. 1991. Stimulation of collagen e glycosaminoglycan production in cultured human adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin 6. *J Invest Dermatol* 97:686–692.
- Edrees, A. F., S. N. Misra, e N. I. Abdou. 2005. Anti-tumor necrosis factor (TNF) therapy in rheumatoid arthritis: correlation of TNF-alpha serum level with clinical response e benefit from changing dose or frequency of infliximab infusions. *Clin Exp Rheumatol* 23:469–474.
- Eggleton, P., L. Wang, J. Penhallow, N. Crawford, e K. A. Brown. 1995. Differences in oxidative response of subpopulations of neutrophils from healthy subjects e patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 54:916–923.
- Elam, M., T. Yao, P. Thoretasciacuten, e T. H. Svensson. 1981. Hypercapnia e hypoxia: Chemoreceptor-mediated control of locus coeruleus neurons e splanchnic, sympathetic nerves. *Brain Research* 222:373–381.
- Elfvin, L. G., e C. J. Dalsgaard. 1977. Retrograde axonal transport of horseradish peroxidase in afferent fibers of the inferior mesenteric ganglion of the guinea pig. Identification of the cells of origin in dorsal root ganglia. *Brain Res* 126:149–153.
- Elfvin, L. G., B. Lindh, e T. Hokfelt. 1993. The chemical neuroanatomy of sympathetic ganglia. *Annu Rev Neurosci* 16:471–507.
- Ellenberger, W., e H. Baum. 1891. *Systematische und Topographische Anatomie des Hundes*. (P. Parey, Ed.). . Verlag.
- Elmqvist, J. K., M. R. Ackermann, K. B. Register, R. B. Rimler, L. R. Ross, e C. D. Jacobson. 1993. Induction of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following *Pasteurella multocida* endotoxin administration. *Endocrinology* 133:3054–3057.
- Emerson, T. E., C. M. Brake, e L. B. Hinshaw. 1966. Splanchnic sympathetic e adrenal participation in endotoxin shock. *J Okla State Med Assoc* 59:425–431.
- Enck, P., U. Bingel, M. Schedlowski, e W. Rief. 2013. The placebo response in medicine: minimize, maximize or personalize? *Nature Reviews Drug Discovery* 12:191–204.
- Engeland, W. C. 1998. Functional innervation of the adrenal cortex by the splanchnic nerve. *Horm Metab Res* 30:311–314.
- Engelmann, M., R. Landgraf, e C. T. Wotjak. 2004. The hypothalamic–neurohypophysial system regulates the hypothalamic–pituitary–adrenal axis under stress: An old concept revisited. *Frontiers in Neuroendocrinology* 25:132–149.
- Engler, H., R. Doenlen, C. Riether, A. Engler, H. O. Besedovsky, A. del Rey, G. Pacheco-López, e M. Schedlowski. 2010. Chemical destruction of brain noradrenergic neurons affects splenic cytokine production. *Journal of Neuroimmunology* 219:75–80.
- Erb, K. J., B. Rüger, M. von Brevern, B. Ryffel, A. Schimpl, e K. Rivett. 1997. Constitutive expression of interleukin (IL)-4 in vivo causes autoimmune-type disorders in mice. *J Exp Med* 185:329–339.
- Ericsson, A., K. J. Kovács, e P. E. Sawchenko. 1994. A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. *J Neurosci* 14:897–913.
- Euler, U. S. V. 1946. A Specific Sympathomimetic Ergone in Adrenergic Nerve Fibres (Sympathin) e its Relations to Adrenaline e Nor-Adrenaline. *Acta Physiologica Scandinavica* 12:73–97.

- Evers, A. W. M., U. Gieler, M. I. Hasenbring, e H. van Middendorp. 2014. Incorporating Biopsychosocial Characteristics into Personalized Healthcare: A Clinical Approach. *Psychotherapy e Psychosomatics* 83:148–157.
- Evrengül, H., D. Dursunoglu, V. Cobankara, B. Polat, D. Selecı, S. Kabukçu, A. Kaftan, E. Semiz, e M. Kilic. 2003. Heart rate variability in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology International* 24:198–202.
- Fairweather, D., S. Frisancho-Kiss, e N. R. Rose. 2008. Sex Differences in Autoimmune Disease from a Pathological Perspective. *The American Journal of Pathology* 173:600–609.
- Falck, B., N.-A. Hillarp, G. Thieme, e A. Torp. 1962. Fluorescence of catechol amines e related compounds condensed with formaldehyde. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 10:348–354.
- Favalli, E. G., F. Desiati, F. Atzeni, P. Sarzi-Puttini, R. Caporali, F. B. Pallavicini, R. Gorla, M. Filippini, e A. Marchesoni. 2009. Serious infections during anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis patients. *Autoimmunity Reviews* 8:266–273.
- Feldman, B. M., N. Birdi, J. E. Boone, P. B. Dent, C. M. Duffy, J. E. Ellsworth, B. A. Lang, R. M. Laxer, R. M. Lewkonia, P. N. Malleson, K. G. Oen, J. D. Paquin, A. M. Rosenberg, R. Schneider, e E. D. Silverman. 1996. Seasonal onset of systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis. *J Pediatr* 129:513–518.
- Feldmann, M., F. M. Brennan, e R. N. Maini. 1996. Rheumatoid arthritis. *Cell* 85:307–310.
- Felten, D. L., J. M. Overhage, S. Y. Felten, e J. F. Schmedtje. 1981. Noradrenergic sympathetic innervation of lymphoid tissue in the rabbit appendix: further evidence for a link between the nervous e immune systems. *Brain Res Bull* 7:595–612.
- Ferguson, A. V., e W. K. Samson. 2003. The orexin/hypocretin system: a critical regulator of neuroendocrine e autonomic function. *Frontiers in Neuroendocrinology* 24:141–150.
- Ferreira-Gomes, J., S. Adães, J. Sarkander, e J. M. Castro-Lopes. 2010. Phenotypic alterations of neurons that innervate osteoarthritic joints in rats. *Arthritis & Rheumatism* 62:3677–3685.
- Fertuck, H. C. 1975. In vivo recovery of muscle contraction after alpha-bungarotoxin binding. *The Journal of Cell Biology* 66:209–213.
- File, S. E., A. S. Lippa, B. Beer, e M. T. Lippa. 2004. Animal tests of anxiety. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 8.
- Fillenz, M. 1970. The innervation of the cat spleen. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 174:459–468.
- Fish, D. J., e J. A. Dillon. 1953. Symptoms of depression in cardiac failure; report of a case. *N Engl J Med* 249:493–494.
- Fleischmann, R. M. 2006. Safety of extended treatment with anakinra in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 65:1006–1012.
- Fleming, A., R. T. Benn, M. Corbett, e P. H. Wood. 1976. Early rheumatoid disease. II. Patterns of joint involvement. *Ann Rheum Dis* 35:361–364.
- Fleshner, M., L. E. Goehler, J. Hermann, J. K. Relton, S. F. Maier, e L. R. Watkins. 1995. Interleukin-1 induced corticosterone elevation e hypothalamic NE depletion is vagally mediated. *Brain Research Bulletin* 37:605–610.
- Fras, I., E. M. Litin, e J. S. Pearson. 1967. Comparison of psychiatric symptoms in carcinoma of the pancreas with those in some other intra-abdominal neoplasms. *Am J Psychiatry* 123:1553–1562.

- Freeman, H., e F. Elmadjian. 1947. The Relationship Between Blood Sugar e Lymphocyte Levels in Normal e Psychotic Subjectsast. *Psychosomatic Medicine* 9:226–232.
- Fuentes, J. M., E. J. Hanly, A. R. Aurora, A. De Maio, e M. A. Talamini. 2005. Anesthesia-specific protection from endotoxic shock is not mediated through the vagus nerve. *Surgery* 138:766–771.
- Fuller, R. W., S. Y. Felten, K. W. Perry, H. D. Snoddy, e D. L. Felten. 1981. Sympathetic noradrenergic innervation of guinea-pig liver: histofluorescence e pharmacological studies. *J Pharmacol Exp Ther* 218:282–288.
- Furmaga, H., M. Sadhu, e A. Frazer. 2012. Comparison of FosB Immunoreactivity Induced by Vagal Nerve Stimulation with That Caused by Pharmacologically Diverse Antidepressants. *Journal of Pharmacology e Experimental Therapeutics* 341:317–325.
- Furness, J. B. 2015. Peripheral Autonomic Nervous System. Pages 61–76 *The Rat Nervous System*. . Elsevier BV.
- Fyda, D. M., K. E. Cooper, e W. L. Veale. 1991. Nucleus tractus solitarii lesions alter the metabolic e hyperthermic response to central prostaglandin E1 in the rat. *J Physiol* 442:337–349.
- Galloway, J. B., K. L. Hyrich, L. K. Mercer, W. G. Dixon, B. Fu, A. P. Ustianowski, K. D. Watson, M. Lunt, e D. P. M. Symmons. 2010. Anti-TNF therapy is associated with an increased risk of serious infections in patients with rheumatoid arthritis especially in the first 6 months of treatment: updated results from the British Society for Rheumatology Biologics Register with special emphasis on risks in the elderly. *Rheumatology* 50:124–131.
- Garcia, J. H., e Y. Kamijyo. 1974. Cerebral infarction. Evolution of histopathological changes after occlusion of a middle cerebral artery in primates. *J Neuropathol Exp Neurol* 33:408–421.
- Garlanda, C., C. A. Dinarello, e A. Mantovani. 2013. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity* 39:1003–1018.
- Gaskell, W. H. 1916. *The Involuntary Nervous System*. . Longmans, Green e Company.
- Geffen, L. B., B. G. Livett, e R. A. Rush. 1969. Immunohistochemical localizatio of protein components of catecholamine storage vesicles. *J Physiol* 204:593–605.
- Genovese, M. C., R. Fleischmann, A. J. Kivitz, M. Rell-Bakalarska, R. Martincova, S. Fiore, P. Rohane, H. van Hoogstraten, A. Garg, C. Fan, J. van Adelsberg, S. P. Weinstein, N. M. H. Graham, N. Stahl, G. D. Yancopoulos, T. W. J. Huizinga, e D. van der Heijde. 2015. Sarilumab Plus Methotrexate in Patients With Active Rheumatoid Arthritis e Inadequate Response to Methotrexate: Results of a Phase III Study. *Arthritis & Rheumatology* 67:1424–1437.
- Gillespie, J. S., e S. M. Kirpekar. 1966. The histological localization of noradrenaline in the cat spleen. *J Physiol* 187:69–79.
- Gillmore, J. D., L. B. Lovat, M. R. Persey, M. B. Pepys, e P. N. Hawkins. 2001. Amyloid load e clinical outcome in AA amyloidosis in relation to circulating concentration of serum amyloid A protein. *The Lancet* 358:24–29.
- Glaser, W. 1928. Über die motorische Innervierung der Blutgefäse der Milz. *Ztsch Anat Etwgsch* 87:741–745.
- Goehler, L. E., R. P. A. Gaykema, M. K. Hansen, K. Anderson, S. F. Maier, e L. R. Watkins. 2000. Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway. *Autonomic Neuroscience* 85:49–59.

- Goldstein, M. M. 1978. Antibody-forming cells of the rat spleen after injury to the midbrain. *Bulletin of Experimental Biology e Medicine* 85:183–185.
- Gordon, F. J. 2000. Effect of nucleus tractus solitarius lesions on fever produced by interleukin-1beta. *Auton Neurosci* 85:102–110.
- Grant, R., e J. D. Hirsch. 1950. Pyrogen fever in rabbits: effects of adrenalectomy. *Am. J. Physiol.* 161:528–533.
- Greenberg, M. E., L. A. Greene, e E. B. Ziff. 1985. Nerve growth factor e epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry* 260:14101–14110.
- Greenberg, M. E., e E. B. Ziff. 1984. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 311:433–438.
- Greene, E. 1963. *Anatomy of the rat.* . Hafner Pub. Co. New York, New York.
- Gregersen, P. K., J. Silver, e R. J. Winchester. 1987. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 30:1205–1213.
- Griffin, J. W., R. George, e T. Ho. 1993. Macrophage systems in peripheral nerves. A review. *J Neuropathol Exp Neurol* 52:553–560.
- Grossman, R. M., J. Krueger, D. Yourish, A. Granelli-Piperno, D. P. Murphy, L. T. May, T. S. Kupper, P. B. Sehgal, e A. B. Gottlieb. 1989. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin e stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86:6367–6371.
- Guard, H. L. 1953. Fulminating staphylococemia with acute adrenal insufficiency. *Med Bull US Army Eur* 10:203–205.
- Guarini, S., D. Altavilla, M. M. Cainazzo, D. Giuliani, A. Bigiani, H. Marini, G. Squadrito, L. Minutoli, A. Bertolini, R. Marini, E. B. Adamo, F. S. Venuti, e F. Squadrito. 2003. Efferent vagal fibre stimulation blunts nuclear factor-kappaB activation e protects against hypovolemic hemorrhagic shock. *Circulation* 107:1189–1194.
- Gutierrez, E. G., W. A. Banks, e A. J. Kastin. 1993. Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. *Journal of Neuroimmunology* 47:169–176.
- Guyenet, P. G. 1991. Central noradrenergic neurons: the autonomic connection. *Prog Brain Res* 88:365–380.
- Hai, T. 2006. The ATF Transcription Factors in Cellular Adaptive Responses. Pages 329–340 *in* J. Ma, editor. *Gene Expression e Regulation.* . Springer New York, New York, NY.
- Hamer, D. W., e R. M. Santer. 1981. Anatomy e blood supply of the coeliac-superior mesenteric ganglion complex of the rat. *Anat Embryol (Berl)* 162:353–362.
- Hammar, J. 1935. Konstitutionsanatomische Studien über die Neurotisierung des Menschenembryos. *Zeitschrift für mikroskopischanatomie Forschung* 38:253–293.
- Hansen, M. K., e J. M. Krueger. 1997. Subdiaphragmatic vagotomy blocks the sleep- e fever-promoting effects of interleukin-1beta. *Am J Physiol* 273:1246–1253.
- Hanssen, M. M., L. M. G. Vancleef, J. W. S. Vlaeyen, e M. L. Peters. 2012. More optimism, less pain! The influence of generalized e pain-specific expectations on experienced cold-pressor pain. *J Behav Med* 37:47–58.

- Hare, A. S., G. Clarke, e S. Tolchard. 1995. Bacterial Lipopolysaccharide-Induced Changes in FOS Protein Expression in the Rat Brain: Correlation with Thermoregulatory Changes e Plasma Corticosterone. *J Neuroendocrinol* 7:791–799.
- Hart, J. E., F. Laden, R. C. Puett, K. H. Costenbader, e E. W. Karlson. 2009. Exposure to Traffic Pollution e Increased Risk of Rheumatoid Arthritis. *Environ Health Perspect* 117:1065–1069.
- Hashimoto, Y. 2002. An alternatively spliced isoform of transcriptional repressor ATF3 e its induction by stress stimuli. *Nucleic Acids Research* 30:2398–2406.
- Hastings, R., T. Ding, S. Butt, K. Gadsby, W. Zhang, R. J. Moots, e C. Deighton. 2010. Neutropenia in patients receiving anti-tumor necrosis factor therapy. *Arthritis Care Res* 62:764–769.
- Heinrich, P. C., J. V. Castell, e T. Andus. 1990. Interleukin-6 e the acute phase response. *Biochem J* 265:621–636.
- Helwig, B. G., R. A. Craig, R. J. Fels, F. Blecha, e M. J. Kenney. 2008. Central nervous system administration of interleukin-6 produces splenic sympathoexcitation. *Autonomic Neuroscience* 141:104–111.
- Hilton, S. M., e K. M. Spyer. 1971. Participation of the anterior hypothalamus in the baroreceptor reflex. *J Physiol* 218:271–293.
- Hilz, M. J., O. Devinsky, W. Doyle, A. Maurer, e M. Dütsch. 2002. Decrease of sympathetic cardiovascular modulation after temporal lobe epilepsy surgery. *Brain* 125:985–995.
- Hinshaw, L. B., L. A. Solomon, D. A. Reins, e V. Fiorica. 1967. Sympathoadrenal system e renal response to endotoxin in the primate. *Nephron* 4:394–404.
- Hol, E. M., R. F. Roelofs, E. Moraal, M. A. F. Sonnemans, J. A. Sluijs, E. A. Proper, P. N. E. de Graan, D. F. Fischer, e F. W. van Leeuwen. 2003. Neuronal expression of GFAP in patients with Alzheimer pathology e identification of novel GFAP splice forms. *Molecular Psychiatry* 8:786–796.
- Holstege, G., R. Bandler, e C. B. Saper. 1996. Chapter 1 The emotional motor system. Pages 3–6 *Progress in Brain Research*. Elsevier BV.
- Holtforth, M. G., T. Krieger, K. Bochsler, e B. Mauler. 2011. The Prediction of Psychotherapy Success by Outcome Expectations in Inpatient Psychotherapy. *Psychotherapy e Psychosomatics* 80:321–322.
- Honk, J. van, D. J. L. G. Schutter, P. Putman, E. H. de Haan, e A. A. Alfonso. 2003. Reductions in phenomenological, physiological e attentional indices of depressive mood after 2 Hz rTMS over the right parietal cortex in healthy human subjects. *Psychiatry Research* 120:95–101.
- Hopkins, D. A., e J. A. Armour. 1984. Localization of sympathetic postganglionic e parasympathetic preganglionic neurons which innervate different regions of the dog heart. *The Journal of Comparative Neurology* 229:186–198.
- Hosoya, Y., Y. Sugiura, N. Okado, A. D. Loewy, e K. Kohno. 1991. Descending input from the hypothalamic paraventricular nucleus to sympathetic preganglionic neurons in the rat. *Exp Brain Res* 85:10–20.
- Huber, A., S. Kunkel, R. Todd, e S. Weiss. 1991. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 254:99–102.
- Huston, J. M., M. Ochani, M. Rosas-Ballina, H. Liao, K. Ochani, V. A. Pavlov, M. Gallowitsch-Puerta, M. Ashok, C. J. Czura, B. Foxwell, K. J. Tracey, e L. Ulloa. 2006. Splenectomy inactivates the

- cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia e polymicrobial sepsis. *J Exp Med* 203:1623–1628.
- Huston, J. M., H. Wang, M. Ochani, K. Ochani, M. Rosas-Ballina, M. Gallowitsch-Puerta, M. Ashok, L. Yang, K. J. Tracey, e H. Yang. 2008. Splenectomy protects against sepsis lethality e reduces serum HMGB1 levels. *J Immunol* 181:3535–3539.
- Ichijo, T., T. Katafuchi, e T. Hori. 1994. Central interleukin-1 beta enhances splenic sympathetic nerve activity in rats. *Brain Res Bull* 34:547–553.
- Inanc, N., e H. Direskeneli. 2006. Serious infections under treatment with TNF- antagonists compared to traditional DMARDs in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 27:67–71.
- Isaković, K., e B. D. Janković. 1973. Neuro-endocrine correlates of immune response. II. Changes in the lymphatic organs of brain-lesioned rats. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 45:373–384.
- Ishibashi, T., H. Kimura, Y. Shikama, T. Uchida, S. Kariyone, T. Hirano, T. Kishimoto, F. Takatsuki, e Y. Akiyama. 1989. Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood* 74:1241–1244.
- Ishizuka, Y., Y. Ishida, T. Kunitake, K. Kato, T. Hanamori, Y. Mitsuyama, e H. Kannan. 1997. Effects of area postrema lesion e abdominal vagotomy on interleukin-1 beta-induced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus region in the rat. *Neurosci Lett* 223:57–60.
- Jackson, R. G. 1949. Anatomy of the vagus nerves in the region of the lower esophagus e the stomach. *Anat Rec* 103:1–18.
- Jacobs, B. L., E. D. Abercrombie, C. A. Fornal, E. S. Levine, D. A. Morilak, e I. L. Stafford. 1991. Single-unit e physiological analyses of brain norepinephrine function in behaving animals. *Prog Brain Res* 88:159–165.
- Jacobsson, L. T. H. 2003. Perinatal characteristics e risk of rheumatoid arthritis. *BMJ* 326:1068–1069.
- Jaeger, B. N., J. Donadieu, C. Cognet, C. Bernat, D. Ordonez-Rueda, V. Barlogis, N. Mahlaoui, A. Fenis, E. Narni-Mancinelli, B. Beaupain, C. Bellanne-Chantelot, M. Bajenoff, B. Malissen, M. Malissen, E. Vivier, e S. Ugolini. 2012. Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, e homeostasis. *Journal of Experimental Medicine* 209:565–580.
- James, W. 1884. II.—what is an emotion ? *Mind* os-IX:188–205.
- Janković, B. D., K. Jovanova-Nesić, e V. Nikolić. 1993. Locus ceruleus e immunity. III. Compromised immune function (antibody production, hypersensitivity skin reactions e experimental allergic encephalomyelitis) in rats with lesioned locus ceruleus is restored by magnetic fields applied to the brain. *Int J Neurosci* 69:251–269.
- Ji, H., M. F. Rabbi, B. Labis, V. A. Pavlov, K. J. Tracey, e J. E. Ghia. 2014. Central cholinergic activation of a vagus nerve-to-spleen circuit alleviates experimental colitis. *Mucosal Immunol* 7:335–347.
- Jirillo, E., M. L. Mastronardi, M. Altamura, I. Munno, S. Miniello, G. Urgesi, e L. Amati. 2003. The immunocompromised host: immune alterations in splenectomized patients e clinical implications. *Curr Pharm Des* 9:1918–1923.
- Jonnesco, T. 1889. Anatomie topographique du duodénum et hernies duodénales. (L. et Babe, Ed.). . Lecrosnier et Babe, Paris.
- Kadlecova, O., K. Mašek, J. Seifert, e P. Petrovický. 1987. The Involvement of Some Brain Structures in the Effect of Immunomodulators. *Ann NY Acad Sci* 496:394–398.

- Kalia, M., K. Fuxe, M. Goldstein, A. Harfstrand, L. F. Agnati, e J. T. Coyle. 1984. Evidence for the existence of putative dopamine-, adrenaline- e noradrenaline-containing vagal motor neurons in the brainstem of the rat. *Neurosci Lett* 50:57–62.
- Kapetanovic, M., E. Lindqvist, P. Geborek, T. Saxne, e K. Eberhard. 2011. Long-term mortality rate in rheumatoid arthritis patients with disease onset in the 1980s. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 40:433–438.
- Kaptschuk, T. J., J. Shaw, C. E. Kerr, L. A. Conboy, J. M. Kelley, T. J. Csordas, A. J. Lembo, e E. E. Jacobson. 2009. Maybe I Made Up the Whole Thing“: Placebos e Patients” Experiences in a Randomized Controlled Trial. *Cult Med Psychiatry* 33:382–411.
- Karlson, E. W., L. A. Mandl, S. E. Hankinson, e F. Grodstein. 2004. Do breast-feeding e other reproductive factors influence future risk of rheumatoid arthritis?: Results from the Nurses’ Health Study. *Arthritis & Rheumatism* 50:3458–3467.
- Kasten, K. R., J. T. Muenzer, e C. C. Caldwell. 2010. Neutrophils are significant producers of IL-10 during sepsis. *Biochemical e Biophysical Research Communications* 393:28–31.
- Katafuchi, T., T. Hori, e S. Take. 1991. Central administration of interferon-alpha enhances rat sympathetic nerve activity to the spleen. *Neurosci Lett* 125:37–40.
- Katafuchi, T., S. Take, e T. Hori. 1993. Roles of sympathetic nervous system in the suppression of cytotoxicity of splenic natural killer cells in the rat. *J Physiol* 465:343–357.
- Katsuura, G., A. Arimura, K. Kovacs, e P. E. Gottschall. 1990. Involvement of organum vasculosum of lamina terminalis e preoptic area in interleukin 1 beta-induced ACTH release. *Am J Physiol* 258:163–171.
- Kay, J., e L. Calabrese. 2004. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 43 Suppl 3:2–2.
- Kebir, D. E., e J. G. Filep. 2013. Modulation of Neutrophil Apoptosis e the Resolution of Inflammation through 2 Integrins. *Front. Immunol.* 4.
- Kember, G., J. L. Ardell, J. A. Armour, e M. Zamir. 2014. Vagal Nerve Stimulation Therapy: What Is Being Stimulated? *PLoS ONE* 9:e114498.
- Kenny, P. J. 2011. Common cellular e molecular mechanisms in obesity e drug addiction. *Nature Reviews Neuroscience* 12:638–651.
- Kesse, W. K., T. L. Parker, e R. E. Coupland. 1988. The innervation of the adrenal gland. I. The source of pre- e postganglionic nerve fibres to the rat adrenal gland. *J Anat* 157:33–41.
- Kimura, A., e T. Kishimoto. 2010. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *European Journal of Immunology* 40:1830–1835.
- Kingery, L. R. 2003. The psychological correlates of asymmetric cerebral activation. . University of Maine.
- Kishimoto, T. 2005. INTERLEUKIN-6: From Basic Science to Medicine—40 Years in Immunology. *Annual Review of Immunology* 23:1–21.
- Kitsis, E., e G. Weissmann. 1991. The role of the neutrophil in rheumatoid arthritis. *Clin Orthop Relat Res*:63–72.
- Klareskog, L., L. Padyukov, J. Lorentzen, e L. Alfredsson. 2006. Mechanisms of disease: Genetic susceptibility e environmental triggers in the development of rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2:425–433.

- Koike, T., M. Harigai, S. Inokuma, N. Ishiguro, J. Ryu, T. Takeuchi, S. Takei, Y. Tanaka, Y. Sano, H. Yaguramaki, e H. Yamanaka. 2013. Effectiveness e Safety of Tocilizumab: Postmarketing Surveillance of 7901 Patients with Rheumatoid Arthritis in Japan. *The Journal of Rheumatology* 41:15–23.
- Kollman, K. 1860. Ueber den Verlauf der Lungenmagennerven furder Bauchhohle. *Zeitschrift für Wissenschaft Zoologie* 10:413.
- Koopman, F. A., S. S. Chavan, S. Miljko, S. Grazio, S. Sokolovic, P. R. Schuurman, A. D. Mehta, Y. A. Levine, M. Faltys, R. Zitnik, K. J. Tracey, e P. P. Tak. 2016. Vagus nerve stimulation inhibits cytokine production e attenuates disease severity in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113:8284–8289.
- Koopman, F. A., P. R. Schuurman, M. J. Vervoordeldonk, e P. P. Tak. 2014. Vagus nerve stimulation: A new bioelectronics approach to treat rheumatoid arthritis? *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 28:625–635.
- Koopman, W. J. 2001. Prospects for autoimmune disease: Research advances in rheumatoid arthritis. *JAMA* 285:648–650.
- Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, e V. K. Kuchroo. 2009. IL-17 e Th17 Cells. *Annual Review of Immunology* 27:485–517.
- Kotzin, B. L., e J. Kappler. 1998. Targeting the T cell receptor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 41:1906–1910.
- Kox, M., L. T. van Eijk, J. Zwaag, J. van den Wildenberg, F. C. G. J. Sweep, J. G. van der Hoeven, e P. Pickkers. 2014. Voluntary activation of the sympathetic nervous system e attenuation of the innate immune response in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111:7379–7384.
- Kox, M., M. Stoffels, S. P. Smekens, N. van Alfen, M. Gomes, T. M. H. Eijsvogels, M. T. E. Hopman, J. G. van der Hoeven, M. G. Netea, e P. Pickkers. 2012a. The Influence of Concentration/Meditation on Autonomic Nervous System Activity e the Innate Immune Response. *Psychosomatic Medicine* 74:489–494.
- Kox, M., M. Vaneker, J. G. van der Hoeven, G. J. Scheffer, C. W. Hoedemaekers, e P. Pickkers. 2012b. Effects of vagus nerve stimulation e vagotomy on systemic e pulmonary inflammation in a two-hit model in rats. *PLoS One* 7.
- Kraan, M. C., B. M. de Koster, J. G. Elferink, W. J. Post, F. C. Breedveld, e P. P. Tak. 2000. Inhibition of neutrophil migration soon after initiation of treatment with leflunomide or methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: findings in a prospective, randomized, double-blind clinical trial in fifteen patients. *Arthritis Rheum* 43:1488–1495.
- Krause, W. 1884. *Die Anatomie des Kaninchens in topographischer und operativer Rücksicht.* (W. Engelmann, Ed.). . Leipzig.
- Kudoh, G., K. Hoshi, e T. Murakami. 1979. Fluorescence microscopic e enzyme histochemical studies of the innervation of the human spleen. *Arch Histol Jpn* 42:169–180.
- Kuntz, A. 1938. The structural organization of the celiac ganglia. *The Journal of Comparative Neurology* 69:1–12.
- Kuo, D. C., W. C. de Groat, e I. Nadelhaft. 1982. Origin of sympathetic efferent axons in the renal nerves of the cat. *Neurosci Lett* 29:213–218.

- Kuroki, K., H. K. Takahashi, H. Iwagaki, T. Murakami, M. Kuinose, S. Hamanaka, K. Minami, M. Nishibori, N. Tanaka, e K. Tanemoto. 2004. beta2-adrenergic receptor stimulation-induced immunosuppressive effects possibly through down-regulation of co-stimulatory molecules, ICAM-1, CD40 e CD14 on monocytes. *J Int Med Res* 32:465–483.
- Lally, F., E. Smith, A. Filer, M. A. Stone, J. S. Shaw, G. B. Nash, C. D. Buckley, e G. E. Rainger. 2005. A novel mechanism of neutrophil recruitment in a coculture model of the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 52:3460–3469.
- Lange, K. 1887. *Ueber Gemuthsbewegungen: Eine Psycho-Physiologische Studie*. Page 108 (K. Lange, Ed.). . T. Thomas.
- Langford, L. A., e R. F. Schmidt. 1983. Afferent e efferent axons in the medial e posterior articular nerves of the cat. *Anat. Rec.* 206:71–78.
- Langley, J. N. 1893. The Arrangement of the Sympathetic Nervous System, based chiefly on Observations upon Pilo-motor Nerves. *J Physiol* 15:176–248.
- Langley, J. N. 1900. On axon-reflexes in the pre-ganglionic fibres of the sympathetic system. *The Journal of Physiology* 25:364–398.
- Langley, J. N. 1909. On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of 'receptive' substances: Part IV. The effect of curari e of some other substances on the nicotine response of the sartorius e gastrocnemius muscles of the frog. *J Physiol* 39:235–295.
- Lanteri, A., H. Roussel, e R. Lloze. 1980. Diving e Heart Beat Compounds in the Marine Turtle *Caretta caretta* (LINNÉ) (Reptilia, Testudines). *Amphibia-Reptilia* 1:337–341.
- Latarjet, A. 1922. Resection des Nerfs de lestomac. Technique opératoire. Resultats cliniques. *Bull Acad Med* 87:681–691.
- Laurindo, I. M. M., G. R. C. Pinheiro, A. C. Ximenes, M. B. Bertolo, R. M. Xavier, e R. D. N. Giorgi. 2002. Consenso Brasileiro para o diagnóstico e tratamento da Artrite Reumatóide. *Rev Bras Reumatol* 42(6):335–361.
- Lawrence, R. C., C. G. Helmick, F. C. Arnett, R. A. Deyo, D. T. Felson, E. H. Giannini, S. P. Heyse, R. Hirsch, M. C. Hochberg, G. G. Hunder, M. H. Liang, S. R. Pillemer, V. D. Steen, e F. Wolfe. 1998. Estimates of the prevalence of arthritis e selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum* 41:778–799.
- Lee, H. Y., M. B. Whiteside, e M. Herkenham. 1998. Area postrema removal abolishes stimulatory effects of intravenous interleukin-1 β on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity e c-fos mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Research Bulletin* 46:495–503.
- Lee, H.-S., B. D. Korman, J. M. Le, D. L. Kastner, E. F. Remmers, P. K. Gregersen, e S.-C. Bae. 2009. Genetic risk factors for rheumatoid arthritis differ in caucasian e Korean populations. *Arthritis Rheum* 60:364–371.
- Lee, Y., M. Su, A. Messing, e M. Brenner. 2006. Astrocyte heterogeneity revealed by expression of a GFAP-LacZ transgene. *Glia* 53:677–687.
- Levy, G., J. E. Fishman, D. Xu, B. T. Chandler, E. Feketova, W. Dong, Y. Qin, V. Alli, L. Ulloa, e E. A. Deitch. 2013. Parasympathetic stimulation via the vagus nerve prevents systemic organ dysfunction by abrogating gut injury e lymph toxicity in trauma e hemorrhagic shock. *Shock* 39:39–44.

- Li, F., e Y. Jia. 2012. Cortical infarction of the right parietal lobe e neurogenic heart disease: A report of three cases. *Neural Regen Res* 7:943–947.
- Lindh, B., J. M. Lundberg, e T. Hökfelt. 1989. NPY-, galanin-, VIP/PHI-, CGRP- e substance P-immunoreactive neuronal subpopulations in cat autonomic e sensory ganglia e their projections. *Cell Tissue Res* 256:259–273.
- Liuzzi, J. P., L. A. Lichten, S. Rivera, R. K. Blanchard, T. B. Aydemir, M. D. Knutson, T. Ganz, e R. J. Cousins. 2005. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver e contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:6843–6848.
- Lockshin, M. D. 2007. Biology of the sex e age distribution of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 57:608–611.
- Louveau, A., I. Smirnov, T. J. Keyes, J. D. Eccles, S. J. Rouhani, J. D. Peske, N. C. Derecki, D. Castle, J. W. Mandell, K. S. Lee, T. H. Harris, e J. Kipnis. 2015. Structural e functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 523:337–341.
- Lu, D., C. D. Wolfgang, e T. Hai. 2006. Activating transcription factor 3, a stress-inducible gene, suppresses Ras-stimulated tumorigenesis. *J Biol Chem* 281:10473–10481.
- Lu, N., Y. Wang, F. Blecha, R. J. Fels, H. P. Hoch, e M. J. Kenney. 2003. Central interleukin-1beta antibody increases renal e splenic sympathetic nerve discharge. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:1536–1541.
- Luiten, P. G. M., G. J. ter Horst, H. Karst, e A. B. Steffens. 1985. The course of paraventricular hypothalamic efferents to autonomic structures in medulla e spinal cord. *Brain Research* 329:374–378.
- Luschka, H. V. 1867. *Anatomie des menschlichen Kopfes*. (H. L. Buchhandlung, Ed.). . Tubingen, H. Laupp'schen Buchhandlung.
- Lutz, P. L. 2002. *The Rise of Experimental Biology: An Illustrated History*. . Humana Press.
- MacGregor, A. J., H. Snieder, A. S. Rigby, M. Koskenvuo, J. Kaprio, K. Aho, e A. J. Silman. 2000. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 43:30–37.
- MacNeil, B. J., A. H. Jansen, A. H. Greenberg, e D. M. Nance. 1996. Activation e selectivity of splenic sympathetic nerve electrical activity response to bacterial endotoxin. *Am J Physiol* 270:264–270.
- MacNeil, B. J., A. H. Jansen, L. J. Janz, A. H. Greenberg, e D. M. Nance. 1997. Peripheral endotoxin increases splenic sympathetic nerve activity via central prostaglandin synthesis. *Am J Physiol* 273:609–614.
- Madden, K. S., S. Y. Felten, D. L. Felten, C. A. Hardy, e S. Livnat. 1994. Sympathetic nervous system modulation of the immune system. II. Induction of lymphocyte proliferation e migration in vivo by chemical sympathectomy. *Journal of Neuroimmunology* 49:67–75.
- Mallory, B., W. D. Steers, e W. C. De Groat. 1989. Electrophysiological study of micturition reflexes in rats. *Am J Physiol* 257:410–421.
- Maradit-Kremers, H., P. J. Nicola, C. S. Crowson, K. V. Ballman, e S. E. Gabriel. 2005. Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: A population-based study. *Arthritis Rheum* 52:722–732.

- Marques-Neto, J. F., E. T. Goncalves, L. F. O. B. Langen, M. F. L. Cunha, S. Radominski, S. M. Oliveira, S. E. Cury, F. Medeiros, e G. C. Sampaio. 1993. Multicentric study of the prevalence of adult rheumatoid arthritis in Brazilian population samples. *Rev Bras Reumatol* 33(5):169–173.
- Martelli, D., S. T. Yao, J. Mancera, M. J. McKinley, e R. M. McAllen. 2014a. Reflex control of inflammation by the splanchnic anti-inflammatory pathway is sustained e independent of anesthesia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 307:1085–1091.
- Martelli, D., S. T. Yao, M. J. McKinley, e M. R. McAllen. 2014b. Reflex control of inflammation by sympathetic nerves, not the vagus. *The Journal of Physiology* 592:1677–1686.
- März, P., R. A. Gadiant, e U. Otten. 1996. Expression of interleukin-6 receptor (IL-6R) e gp130 mRNA in PC12 cells e sympathetic neurons: modulation by tumor necrosis factor (TNF-). *Brain Research* 706:71–79.
- Masek, K., O. Kadlecov, e A. p. Petrovický. 1983. The Effect of Brain Stem Lesions on the Immune Response. Pages 443–450 *Advances in Immunopharmacology*. . Elsevier BV.
- Mason, M. R. J., A. R. Lieberman, e P. N. Anderson. 2003. Corticospinal neurons up-regulate a range of growth-associated genes following intracortical, but not spinal, axotomy. *European Journal of Neuroscience* 18:789–802.
- Mastorakos, G., e E. Zapanti. 2004. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in the Neuroendocrine Regulation of Food Intake e Obesity: The Role of Corticotropin Releasing Hormone. *Nutritional Neuroscience* 7:271–280.
- Matteoli, G., P. J. Gomez-Pinilla, A. Nemethova, M. D. Giovangiulio, C. Cailotto, S. H. van Bree, K. Michel, K. J. Tracey, M. Schemann, W. Boesmans, P. V. Berghe, e G. E. Boeckxstaens. 2013. A distinct vagal anti-inflammatory pathway modulates intestinal muscularis resident macrophages independent of the spleen. *Gut* 63:938–948.
- Maycock, W., e T. S. Heslop. 1939. An experimental investigation of the nerve supply of the adrenal medulla of the cat. *J Anat* 73:551–558.
- McAinsh, J., e J. M. Cruickshank. 1990. Beta-blockers e central nervous system side effects. *Pharmacology & Therapeutics* 46:163–197.
- McCrea, E. D. 1924. The Abdominal Distribution of the Vagus. *J Anat* 59:18–40.
- McDonald, H. S. 1974. Bradycardia during Death-Feigning of *Heterodon platyrhinos* Latreille (Serpentes). *Journal of Herpetology* 8:157.
- McInnes, I. B., e G. Schett. 2011. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine* 365:2205–2219.
- Meevissen, Y. M. C., M. L. Peters, e H. J. E. M. Alberts. 2011. Become more optimistic by imagining a best possible self: Effects of a two week intervention. *Journal of Behavior Therapy e Experimental Psychiatry* 42:371–378.
- Menkin, V. 1943. Studies on the isolation of the factor responsible for tissue injury in inflammation. *Science* 97:165–167.
- Micheletti, A., C. Costantini, F. Calzetti, D. Camuesco, S. Costa, N. Tamassia, e M. A. Cassatella. 2013. Neutrophils promote 6-sulfo LacNAc-mathplus dendritic cell (sIaDC) survival. *Journal of Leukocyte Biology* 94:705–710.

- Mihaylova, S., A. Killian, K. Mayer, S. S. Pullamsetti, R. Schermuly, e B. Rosengarten. 2012. Effects of anti-inflammatory vagus nerve stimulation on the cerebral microcirculation in endotoxinemic rats. *Journal of Neuroinflammation* 9:183.
- Mitchell, G. A. G. 1938. The nerve-supply of the gastro-oesophageal junction. *British Journal of Surgery* 26:333–345.
- Mivart, J. S. G. 1881. The cat; an introduction to the study of backboned animals, especially mammals. (J. Murray, Ed.). . London, Murray.
- Mizeres, N. J. 1955. The anatomy of the autonomic nervous system in the dog. *Am J Anat* 96:285–318.
- Mizukami, T., H. Yokoyama, Y. Okamura, H. Ohgo, M. Fukuda, Y. Kamegaya, S. Kato, e H. Ishii. 1999. Splenectomy attenuates superoxide anion release into the hepatic sinusoids after lipopolysaccharide challenge. *Journal of Hepatology* 31:235–241.
- Moeniralam, H. S., W. A. Bemelman, E. Endert, R. Koopmans, H. P. Sauerwein, e J. A. Romijn. 1997. The decrease in nonsplenic interleukin-6 (IL-6) production after splenectomy indicates the existence of a positive feedback loop of IL-6 production during endotoxemia in dogs. *Infect Immun* 65:2299–2305.
- Mohamed, A. A., T. L. Parker, e R. E. Coupland. 1988. The innervation of the adrenal gland. II. The source of spinal afferent nerve fibres to the guinea-pig adrenal gland. *J Anat* 160:51–58.
- Moore, M. A., e J. J. Owen. 1967. Experimental studies on the development of the thymus. *J Exp Med* 126:715–726.
- Moore, T. C. 1984. Modification of lymphocyte traffic by vasoactive neurotransmitter substances. *Immunology* 52:511–518.
- Mosimann, W. 1954. Systematisation des ramifications du nerf vague dans le plexus solaire chez la Rat blanc. *Revue Suisse De Zoologie* 61:323–334.
- Nance, D. M., e J. Burns. 1989. Innervation of the spleen in the rat: evidence for absence of afferent innervation. *Brain Behav Immun* 3:281–290.
- Nance, D. M., e V. M. Sanders. 2007. Autonomic innervation e regulation of the immune system (1987–2007). *Brain, Behavior, e Immunity* 21:736–745.
- Naritoku, D. K., W. J. Terry, e R. H. Helfert. 1995. Regional induction of fos immunoreactivity in the brain by anticonvulsant stimulation of the vagus nerve. *Epilepsy Res* 22:53–62.
- Naver, H. K., C. Blomstrand, e B. G. Wallin. 1996. Reduced Heart Rate Variability After Right-Sided Stroke. *Stroke* 27:247–251.
- Neal, T. M., M. C. Vissers, e C. C. Winterbourn. 1987. Inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs of superoxide production e granule enzyme release by polymorphonuclear leukocytes stimulated with immune complexes or formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Biochem Pharmacol* 36:2511–2517.
- Nemeth, E., S. Rivera, V. Gabayan, C. Keller, S. Taudorf, B. K. Pedersen, e T. Ganz. 2004. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *Journal of Clinical Investigation* 113:1271–1276.
- Nemeth, T., e A. Mocsai. 2012. The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunology Letters* 143:9–19.
- Netter, F. 2008. Atlas of human anatomy. . Saunders/Elsevier, Philadelphia, Pa.

- Neveu, P. J. 1992. Asymmetrical brain modulation of the immune response. *Brain Research Reviews* 17:101–107.
- Neveu, P. J., B. Deleplanque, S. Vitiello, F. Rouge-Pont, e M. L. Moal. 1992. Hemispheric Asymmetry in the Effects of Substantia Nigra Lesioning on Lymphocyte Reactivity in Mice. *International Journal of Neuroscience* 64:267–273.
- Nichol, F. E., e J. C. Woodrow. 1981. HLA DR antigens in Indian patients with rheumatoid arthritis. *Lancet* 1:220–221.
- Niederhausern, W. 1954. La question du parasymphatique rénal : recherches sur la limite inférieure du domaine du nerf vague. *Journal d'urologie* 56:565–577.
- Nijijima, A. 1992. Electrophysiological study on the vagal innervation of the adrenal gland in the rat. *J Auton Nerv Syst* 41:87–92.
- Nijijima, A., T. Hori, S. Aou, e Y. Oomura. 1991. The effects of interleukin-1 beta on the activity of adrenal, splenic e renal sympathetic nerves in the rat. *J Auton Nerv Syst* 36:183–192.
- Nikolić, V., K. Jovanova-Nesić, e B. D. Janković. 1993. Locus ceruleus e immunity. I. Suppression of plaque-forming cell response e antibody production in rats with lesioned locus ceruleus. *Int J Neurosci* 68:283–287.
- Nishimoto, N., N. Miyasaka, K. Yamamoto, S. Kawai, T. Takeuchi, e J. Azuma. 2008. Long-term safety e efficacy of tocilizumab, an anti-IL-6 receptor monoclonal antibody, in monotherapy, in patients with rheumatoid arthritis (the STREAM study): evidence of safety e efficacy in a 5-year extension study. *Annals of the Rheumatic Diseases* 68:1580–1584.
- Noguchi, T., K. Nakagome, T. Kobayashi, Y. Ueda, T. Soma, H. Nakamoto, e M. Nagata. 2015. Effect of beta2-adrenergic agonists on eosinophil adhesion, superoxide anion generation, e degranulation. *Allergology International* 64:S46–S53.
- Ogawa, M., Y. Fujita, e M. Ozaki. 1979. Experimental central hypertension produced by chemical degeneration of the locus coeruleus in the rat. *Jpn Circ J* 43:89–98.
- Ohashi, K., e T. Saigusa. 1997. Sympathetic nervous responses during cytokine-induced fever in conscious rabbits. *Pflugers Arch* 433:691–698.
- Ohta, N., Y. K. Nishimura, K. Tanimoto, Y. Horiuchi, C. Abe, Y. Shiokawa, T. Abe, M. Katagiri, T. Yoshiki, e T. Sasazuki. 1982. Association between HLA e Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 5:123–132.
- Ollier, W., e W. Thomson. 1992. Population genetics of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 18:741–759.
- Olofsson, P. S., M. Rosas-Ballina, Y. A. Levine, e K. J. Tracey. 2012. Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity. *Immunol Rev* 248:188–204.
- Onkka, P., W. Maskoun, K. S. Rhee, J. Hellyer, J. Patel, J. Tan, L. S. Chen, H. V. Vinters, M. C. Fishbein, e P. S. Chen. 2013. Sympathetic nerve fibers e ganglia in canine cervical vagus nerves: localization e quantitation. *Heart Rhythm* 10:585–591.
- Opp, M. R., e L. A. Toth. 1998. Somnogenic e pyrogenic effects of interleukin-1beta e lipopolysaccharide in intact e vagotomized rats. *Life Sci* 62:923–936.
- Ortiz-Pomales, Y. T., M. Krzyzaniak, R. Coimbra, A. Baird, e B. P. Eliceiri. 2013. Vagus nerve stimulation blocks vascular permeability following burn in both local e distal sites. *Burns* 39:68–75.

- Osharina, V., V. Bagaev, F. Wallois, e N. Larnicol. 2006. Autonomic response e Fos expression in the NTS following intermittent vagal stimulation: Importance of pulse frequency. *Autonomic Neuroscience* 126-127:72–80.
- OtextquotesingleSullivan, J. B., K. M. Ryan, A. Harkin, e T. J. Connor. 2010. Noradrenaline reuptake inhibitors inhibit expression of chemokines IP-10 e RANTES e cell adhesion molecules VCAM-1 e ICAM-1 in the CNS following a systemic inflammatory challenge. *Journal of Neuroimmunology* 220:34–42.
- Pacheco-López, G., H. Engler, M.-B. Niemi, e M. Schedlowski. 2006. Expectations e associations that heal: Immunomodulatory placebo effects e its neurobiology. *Brain, Behavior, e Immunity* 20:430–446.
- Padyukov, L., C. Silva, P. Stolt, L. Alfredsson, e L. Klareskog. 2004. A gene-environment interaction between smoking e shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 50:3085–3092.
- Palkovits, M., J. S. Baffi, e K. Pacak. 1997. Stress-induced Fos-like Immunoreactivity in the Pons e the Medulla Oblongata of Rats. *Stress* 1:155–168.
- Parker, T. L., W. K. Kesse, A. A. Mohamed, e M. Afework. 1993. The innervation of the mammalian adrenal gland. *J Anat* 183 (Pt 2):265–276.
- Parsonage, G., A. Filer, M. Bik, D. Hardie, S. Lax, K. Howlett, L. D. Church, K. Raza, S.-H. Wong, E. Trebilcock, D. Scheel-Toellner, M. Salmon, J. M. Lord, e C. D. Buckley. 2008. Prolonged, granulocyte–macrophage colony-stimulating factor-dependent, neutrophil survival following rheumatoid synovial fibroblast activation by IL-17 e TNFalpha. *Arthritis Res Ther* 10:R47.
- Pascalis, V. D., G. Cozzuto, G. V. Caprara, e G. Alessandri. 2013. Relations among EEG-alpha asymmetry, BIS/BAS, e dispositional optimism. *Biological Psychology* 94:198–209.
- Pascual, V., F. Allantaz, E. Arce, M. Punaro, e J. Banchereau. 2005. Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis e clinical response to IL-1 blockade. *J Exp Med* 201:1479–1486.
- Paulus, M. P., N. Hozack, L. Frank, e G. G. Brown. 2002. Error Rate e Outcome Predictability Affect Neural Activation in Prefrontal Cortex e Anterior Cingulate during Decision-Making. *NeuroImage* 15:836–846.
- Pelinka, L. E., A. Kroepfl, M. Leixnering, W. Buchinger, A. Raabe, e H. Redl. 2004. GFAP Versus S100B in Serum after Traumatic Brain Injury: Relationship to Brain Damage e Outcome. *Journal of Neurotrauma* 21:1553–1561.
- Peña, G., B. Cai, L. Ramos, G. Vida, E. A. Deitch, e L. Ulloa. 2011. Cholinergic regulatory lymphocytes re-establish neuromodulation of innate immune responses in sepsis. *J Immunol* 187:718–725.
- Perman, E. 1916. Über die Verteilung und den Verlauf der Vagus-äste in dem Menschlichen Magen. *Arkiv f Zool (Stockholm)* X(11):10.
- Phillips, L., e F. Elmadjian. 1947. A Rorschach Tension Score e the Diurnal Lymphocyte Curve in Psychotic Subjects. *Psychosomatic Medicine* 9:364–371.
- Phillips, R. J., e T. L. Powley. 2012. Macrophages Associated with the Intrinsic e Extrinsic Autonomic Innervation of the Rat Gastrointestinal Tract. *Autonomic Neuroscience* 169:12–27.
- Pile, K. D., M. Tikly, J. I. Bell, e B. P. Wordsworth. 1992. HLA-DR antigens e rheumatoid arthritis in black South Africans: a study of ethnic groups. *Tissue Antigens* 39:138–140.

- Pillinger, M. H., C. Capodici, P. Rosenthal, N. Kheterpal, S. Hanft, M. R. Philips, e G. Weissmann. 1998. Modes of action of aspirin-like drugs: salicylates inhibit erk activation e integrin-dependent neutrophil adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14540–14545.
- Pindjakova, J., e M. D. Griffin. 2011. Defective neutrophil rolling e transmigration in acute uremia. *Kidney International* 80:447–450.
- Porges, S. W. 1995. Orienting in a defensive world: Mammalian modifications of our evolutionary heritage. A Polyvagal Theory. *Psychophysiology* 32:301–318.
- Prechtl, J. C., e T. L. Powley. 1985. Organization e distribution of the rat subdiaphragmatic vagus e associated paranglia. *J Comp Neurol* 235:182–195.
- Prince, L. R., M. K. Whyte, I. Sabroe, e L. C. Parker. 2011. The role of TLRs in neutrophil activation. *Current Opinion in Pharmacology* 11:397–403.
- Proudfit, H. K., e F. M. Clark. 1991. The projections of locus coeruleus neurons to the spinal cord. *Prog Brain Res* 88:123–141.
- Rajakulendran, S., K. Gadsby, D. Allen, S. OtextquotesingleReilly, e C. Deighton. 2006. Neutropenia while receiving anti-tumour necrosis factor treatment for rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 65:1678–1679.
- Randall, W. C., e J. A. Armour. 1974. Regional vagosympathetic control of the heart. *Am J Physiol* 227:444–452.
- Randolph, T. G. 1950. Allergic factors in the etiology of certain mental symptoms. *J Lab Clin Med* 36:977–977.
- Rasmussen, H. N., M. F. Scheier, e J. B. Greenhouse. 2009. Optimism e Physical Health: A Meta-analytic Review. *Annals of Behavioral Medicine* 37:239–256.
- Rassnick, S., A. F. Sved, e B. S. Rabin. 1994. Locus coeruleus stimulation by corticotropin-releasing hormone suppresses in vitro cellular immune responses. *J Neurosci* 14:6033–6040.
- Raza, K., D. Scheel-Toellner, C.-Y. Lee, D. Pilling, S. J. Curnow, F. Falciani, V. Trevino, K. Kumar, L. K. Assi, J. M. Lord, C. Gordon, C. D. Buckley, e M. Salmon. 2006. *Arthritis Res Ther* 8:R120.
- Reilly, F. D., P. A. McCuskey, M. L. Miller, R. S. McCuskey, e H. A. Meineke. 1979. Innervation of the periarteriolar lymphatic sheath of the spleen. *Tissue Cell* 11:121–126.
- Reis, G. M., Q. M. Dias, J. W. S. Silveira, F. D. Vecchio, N. Garcia-Cairasco, e W. A. Prado. 2010. Antinociceptive Effect of Stimulating the Occipital or Retrosplenial Cortex in Rats. *The Journal of Pain* 11:1015–1026.
- Renaud, L. P., e C. W. Bourque. 1991. Neurophysiology e neuropharmacology of hypothalamic magnocellular neurons secreting vasopressin e oxytocin. *Prog Neurobiol* 36:131–169.
- Renoux, G., K. Biziere, M. Renoux, P. Bardos, e D. Degenne. 1987. Consequences of Bilateral Brain Neocortical Ablation on Imuthiol-Induced Immunostimulation in Mice. *Ann NY Acad Sci* 496:346–353.
- Renoux, G., K. Biziere, M. Renoux, J.-M. Guillaumin, e D. Degenne. 1983. A balanced brain asymmetry modulates T cell-mediated events. *Journal of Neuroimmunology* 5:227–238.
- Ricardo, J. A., e E. T. Koh. 1978. Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, e other forebrain structures in the rat. *Brain Res* 153:1–26.
- Ridet, J. L., G. Alonso, N. Chauvet, J. Chapron, J. Koenig, e A. Privat. 1996. Immunocytochemical characterization of a new marker of fibrous e reactive astrocytes. *Cell Tissue Res* 283:39–49.

- Rijkers, K., H. J. Majoie, M. W. Aalbers, M. Philippens, V. M. Doenni, J. S. Vles, H. M. Steinbusch, V. M. Moers-Hornikx, D. A. Hopkins, e G. Hoogland. 2012. Rat vagus nerve stimulation model of seizure suppression: nNOS e Δ Fos B changes in the brainstem. *J Chem Neuroanat* 46:1–9.
- Romanovsky, A. A., M. C. Almeida, D. M. Aronoff, A. I. Ivanov, J. P. Konsman, A. A. Steiner, e V. F. Turek. 2005. Fever e hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries e revisions. *Front Biosci* 10:2193–2216.
- Romanovsky, A. A., V. A. Kulchitsky, C. T. Simons, N. Sugimoto, e M. Székely. 1997a. Febrile responsiveness of vagotomized rats is suppressed even in the absence of malnutrition. *Am J Physiol* 273:777–783.
- Romanovsky, A. A., V. A. Kulchitsky, C. T. Simons, N. Sugimoto, e M. Székely. 1997b. Cold defense mechanisms in vagotomized rats. *Am J Physiol* 273:784–789.
- Rosas-Ballina, M., M. Ochani, W. R. Parrish, K. Ochani, Y. T. Harris, J. M. Huston, S. Chavan, e K. J. Tracey. 2008. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:11008–11013.
- Rosas-Ballina, M., P. S. Olofsson, M. Ochani, S. I. Valdes-Ferrer, Y. A. Levine, C. Reardon, M. W. Tusche, V. A. Pavlov, U. Andersson, S. Chavan, T. W. Mak, e K. J. Tracey. 2011. Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit. *Science* 334:98–101.
- Ruggiero, D. ., M. . Underwood, J. . Mann, M. Anwar, e V. Arango. 2000. The human nucleus of the solitary tract: visceral pathways revealed with an “in vitro” postmortem tracing method. *Journal of the Autonomic Nervous System* 79:181–190.
- Rutherford, S. D., R. E. Widdop, F. Sannajust, W. J. Louis, e A. L. Gundlach. 1992. Expression of c-fos e NGFI-A messenger RNA in the medulla oblongata of the anaesthetized rat following stimulation of vagal e cardiovascular afferents. *Molecular Brain Research* 13:301–312.
- Ryan, K. J., É. Griffin, J. D. Yssel, K. M. Ryan, E. N. McNamee, A. Harkin, e T. J. Connor. 2013. Stimulation of central 2-adrenoceptors suppresses NFB activity in rat brain: A role for IB. *Neurochemistry International* 63:368–378.
- Sagar, S. M., K. J. Price, N. W. Kasting, e F. R. Sharp. 1995. Anatomic patterns of {FOS} immunostaining in rat brain following systemic endotoxin administration. *Brain Research Bulletin* 36:381–392.
- Sagar, S., F. Sharp, e T. Curran. 1988. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240:1328–1331.
- Saigusa, T., C. Huang, e M. Iriki. 1989. Cord cooling e fever caused by LPS e PGE2. *Thermoregulation: Research e Clinical Application*. . Karger, Basel.
- Saindon, C. S., F. Blecha, T. I. Musch, D. A. Morgan, R. J. Fels, e M. J. Kenney. 2001. Effect of cervical vagotomy on sympathetic nerve responses to peripheral interleukin-1beta. *Auton Neurosci* 87:243–248.
- Samuels, E., e E. Szabadi. 2008. Functional Neuroanatomy of the Noradrenergic Locus Coeruleus: Its Roles in the Regulation of Arousal e Autonomic Function Part I: Principles of Functional Organisation. *Current Neuropharmacology* 6:235–253.
- Sanchez, B., I. Moreno, R. Magariño, M. Garzon, M. F. Gonzalez, A. Garcia, e A. Nuñez-Roldan. 1990. HLA-DRw10 confers the highest susceptibility to rheumatoid arthritis in a Spanish population. *Tissue Antigens* 36:174–176.

- Sant'Anna, M. B., R. Kusuda, T. A. Bozzo, G. S. Bassi, J. C. Alves-Filho, F. Q. Cunha, S. H. Ferreira, G. R. Souza, e T. M. Cunha. 2016. Medial plantar nerve ligation as a novel model of neuropathic pain in mice: pharmacological e molecular characterization. *Sci. Rep.* 6:26955.
- Saphier, D., O. Abramsky, G. Mor, e H. Ovadia. 1987. Multiunit electrical activity in conscious rats during an immune response. *Brain, Behavior, e Immunity* 1:40–51.
- Sawchenko, P. E., R. M. Gold, e J. Alexander. 1981. Effects of selective vagotomies on knife cut-induced hypothalamic obesity: differential results on lab chow vs high-fat diets. *Physiol Behav* 26:293–300.
- Schiff, B., Y. Mizrachi, S. Orgad, M. Yaron, e E. Gazit. 1982. Association of HLA-Aw31 e HLA-DR1 with adult rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 41:403–404.
- Schiff, M. H. 2004. Durability e rapidity of response to anakinra in patients with rheumatoid arthritis. *Drugs* 64:2493–2501.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, e A. Cardona. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9:676–682.
- Schmued, L. C., C. Albertson, e W. Slikker. 1997. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive e reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Research* 751:37–46.
- Schmued, L. C., e K. J. Hopkins. 2000. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Research* 874:123–130.
- Schmutz, C., A. Cartwright, H. Williams, O. Haworth, J. H. Williams, A. Filer, M. Salmon, C. D. Buckley, e J. Middleton. 2010. Monocytes/macrophages express chemokine receptor CCR9 in rheumatoid arthritis e CCL25 stimulates their differentiation. *Arthritis Res Ther* 12:R161.
- Schultzberg, M., S. B. Svenson, A. Unden, e T. Bartfai. 1987. Interleukin-1-like immunoreactivity in peripheral tissues. *J. Neurosci. Res.* 18:184–189.
- Schuster, S., B. Hurrell, e F. Tacchini-Cottier. 2012. Crosstalk between neutrophils e dendritic cells: a context-dependent process. *Journal of Leukocyte Biology* 94:671–675.
- Scott, R. B., D. T. M. Tan, M. Miampamba, e K. A. Sharkey. 1998. Anaphylaxis-induced alterations in intestinal motility: role of extrinsic neural pathways. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal e Liver Physiology* 275:G812–G821.
- Sehic, E., e C. M. Blatteis. 1996. Blockade of lipopolysaccharide-induced fever by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs. *Brain Res* 726:160–166.
- Selye, H. 1976. Stress without Distress. Pages 137–146 *Psychopathology of Human Adaptation*. . Springer Science mathplus Business Media.
- Shan, J., e T. L. Krukoff. 2000. Area Postrema Ablation Attenuates Activation of Neurones in the Paraventricular Nucleus in Response to Systemic Adrenomedullin. *Journal of Neuroendocrinology* 12:802–810.
- Sharp, F. R., M. F. Gonzalez, J. W. Sharp, e S. M. Sagar. 1989. c-fos expression e (14C) 2-deoxyglucose uptake in the caudal cerebellum of the rat during motor/sensory cortex stimulation. *The Journal of Comparative Neurology* 284:621–636.

- Sharpe, L., e L. Schrieber. 2012. A Blind Randomized Controlled Trial of Cognitive versus Behavioral versus Cognitive-Behavioral Therapy for Patients with Rheumatoid Arthritis. *Psychotherapy e Psychosomatics* 81:145–152.
- Shih-Ching, K., M. A. Choudhry, T. Matsutani, M. G. Schwacha, L. W. Rue, K. I. Bland, e I. H. Chaudry. 2004. Splenectomy differentially influences immune responses in various tissue compartments of the body. *Cytokine* 28:101–108.
- Shipley, M. T., L. Fu, M. Ennis, W. L. Liu, e G. Aston-Jones. 1996. Dendrites of locus coeruleus neurons extend preferentially into two pericoerulear zones. *J Comp Neurol* 365:56–68.
- Shrivastava, A. K., e A. Pandey. 2012. Inflammation e rheumatoid arthritis. *Journal of Physiology e Biochemistry* 69:335–347.
- Siemionow, K., A. Klimczak, G. Brzezicki, M. Siemionow, e R. F. McLain. 2009. The Effects of Inflammation on Glial Fibrillary Acidic Protein Expression in Satellite Cells of the Dorsal Root Ganglion. *Spine* 34:1631–1637.
- Siesjö, B. K. 1981. Cell Damage in the Brain: A Speculative Synthesis. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 1:155–185.
- Simons, C. T., V. A. Kulchitsky, N. Sugimoto, L. D. Homer, M. Székely, e A. A. Romanovsky. 1998. Signaling the brain in systemic inflammation: which vagal branch is involved in fever genesis? *Am J Physiol* 275:63–68.
- Singh, U. 1985a. Effect of Sympathectomy on the Maturation of Fetal Thymocytes Grown within the Anterior Eye Chambers in Mice. Pages 349–356 *Microenvironments in the Lymphoid System*. . Springer Science mathplus Business Media.
- Singh, U. 1985b. Lymphopoiesis in the nude fetal thymus following sympathectomy. *Cellular Immunology* 93:222–228.
- Singh, U., J. A. Fatani, e A. M. Mohajir. 1987. Ontogeny of cholinergic innervation of thymus in mouse. *Developmental & Comparative Immunology* 11:627–635.
- Sipka, S., E. Brath, F. F. Toth, A. Fabian, C. Krizsan, S. Barath, S. Sipka, N. Nemeth, A. Balint, I. Furka, e I. Miko. 2006. Distribution of peripheral blood cells in mice after splenectomy or autotransplantation. *Microsurgery* 26:43–49.
- Sobotta, R. 1911. *Atlas der descriptiven Anatomie des Menschen*. (J. Lehmann, Ed.). . Munchen: JF Lehmann.
- Solomon, D. H. 2003. Cardiovascular Morbidity e Mortality in Women Diagnosed With Rheumatoid Arthritis. *Circulation* 107:1303–1307.
- Solomon, G. F. 1964. Emotions, Immunity, And Disease. *Arch Gen Psychiatry* 11:657.
- Spalteholz, W. 1910. *Anatomie des Menschen*. (S. Hirzel, Ed.). . Leipzig, S Hirzel.
- Spector, T. D., L. A. Perry, G. Tubb, A. J. Silman, e E. C. Huskisson. 1988. Low free testosterone levels in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 47:65–68.
- Spiers, A. S., A. Liew, e A. G. Baikie. 1975. Neutrophil alkaline phosphatase score in chronic granulocytic leukaemia: effects of splenectomy e antileukaemic drugs. *J Clin Pathol* 28:517–523.
- Stastny, P. 1978. HLA-D e Ia antigens in rheumatoid arthritis e systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 21:139–143.
- Stensaas, S. S., C. Q. Edwards, e L. J. Stensaas. 1972. An experimental study of hyperchromic nerve cells in the cerebral cortex. *Experimental Neurology* 36:472–487.

- Stewart-Williams, S., e J. Podd. 2004. The Placebo Effect: Dissolving the Expectancy Versus Conditioning Debate. *Psychological Bulletin* 130:324–340.
- Stitt, J. T. 1985. Evidence for the involvement of the organum vasculosum laminae terminalis in the febrile response of rabbits e rats. *J Physiol* 368:501–511.
- Stock, G., U. Rupprecht, H. Stumpf, e K. H. Schlör. 1981. Cardiovascular changes during arousal elicited by stimulation of amygdala, hypothalamus e locus coeruleus. *J Auton Nerv Syst* 3:503–510.
- Stolt, P. 2003. Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases. *Annals of the Rheumatic Diseases* 62:835–841.
- Stolt, P., H. Källberg, I. Lundberg, B. Sjögren, L. Klareskog, L. Alfredsson, e E. study group. 2005. Silica exposure is associated with increased risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study. *Ann Rheum Dis* 64:582–586.
- Strack, A. M., W. B. Sawyer, L. M. Marubio, e A. D. Loewy. 1988. Spinal origin of sympathetic preganglionic neurons in the rat. *Brain Res* 455:187–191.
- Straub, R. H., F. S. Dhabhar, J. W. J. Bijlsma, e M. Cutolo. 2005. How psychological stress via hormones e nerve fibers may exacerbate rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 52:16–26.
- Svensson, T. H., e P. Thorén. 1979. Brain noradrenergic neurons in the locus coeruleus: inhibition by blood volume load through vagal afferents. *Brain Research* 172:174–178.
- Swan, J. 1834. *A Demonstration of the Nerves of the Human Body*. . Longman.
- Swanson, L. W., e P. E. Sawchenko. 1983. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular e supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci* 6:269–324.
- Swanson, L. W., P. E. Sawchenko, J. Rivier, e W. W. Vale. 1983. Organization of Ovine Corticotropin-Releasing Factor Immunoreactive Cells e Fibers in the Rat Brain: An Immunohistochemical Study. *Neuroendocrinology* 36:165–186.
- Symmons, D. P., E. M. Barrett, C. R. Bankhead, D. G. Scott, e A. J. Silman. 1994. The incidence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: results from the Norfolk Arthritis Register. *Br J Rheumatol* 33:735–739.
- Szabadi, E. 2013. Functional neuroanatomy of the central noradrenergic system. *Journal of Psychopharmacology* 27:659–693.
- Takahashi, H. K. 2003. Effect of beta 2-Adrenergic Receptor Stimulation on Interleukin-18-Induced Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression e Cytokine Production. *Journal of Pharmacology e Experimental Therapeutics* 304:634–642.
- Takeda, M., H. Kato, A. Takamiya, A. Yoshida, e H. Kiyama. 2000. Injury-specific expression of activating transcription factor-3 in retinal ganglion cells e its colocalized expression with phosphorylated c-Jun. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:2412–2421.
- Tanaka, M., M. J. McKinley, e R. M. McAllen. 2013. Role of an excitatory preoptic-raphé pathway in febrile vasoconstriction of the rat's tail. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 305:1479–1489.
- Tanaka, S., R. Kumashiro, e K. Tanikawa. 1992. Role of the spleen in endotoxin-induced hepatic injury in chronic alcohol-fed rats. *Liver* 12:306–310.
- Tankus, A., I. Fried, e S. Shoham. 2014. Cognitive-motor brain-machine interfaces. *J Physiol Paris* 108:38–44.

- Teitelbaum, H. A. 1933. The nature of the thoracic e abdominal distribution of the vagus nerves. *Anat. Rec.* 55:297–317.
- Teitelbaum, H. A. 1942. The Innervation of the Adrenal Gland. *The Quarterly Review of Biology* 17:135–148.
- Tkacs, N. ., e A. . Strack. 1995. Systemic endotoxin induces Fos-like immunoreactivity in rat spinal sympathetic regions. *Journal of the Autonomic Nervous System* 51:1–7.
- Torres-Rosas, R., G. Yehia, G. Peña, P. Mishra, M. del Rocio Thompson-Bonilla, M. A. Moreno-Eutimio, L. A. Arriaga-Pizano, A. Isibasi, e L. Ulloa. 2014. Dopamine mediates vagal modulation of the immune system by electroacupuncture. *Nat Med* 20:291–295.
- Tsujino, H., E. Kondo, T. Fukuoka, Y. Dai, A. Tokunaga, K. Miki, K. Yonenobu, T. Ochi, e K. Noguchi. 2000. Activating Transcription Factor 3 (ATF3) Induction by Axotomy in Sensory e Motoneurons: A Novel Neuronal Marker of Nerve Injury. *Molecular e Cellular Neuroscience* 15:170–182.
- Tyrey, L., e A. Nalbandov. 1972. Influence of anterior hypothalamic lesions on circulating antibody titers in the rat. *American Journal of Physiology – Legacy Content* 222:179–185.
- Upchurch, K. S., e J. Kay. 2012. Evolution of treatment for rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 51:vi28–vi36.
- Utterback, R. A. 1944. The innervation of the spleen. *J. Comp. Neurol.* 81:55–68.
- Veihelmann, A., G. Szczesny, D. Nolte, F. Krombach, H.-J. Refior, e K. Messmer. 1998. A novel model for the study of synovial microcirculation in the mouse knee joint in vivo. *Research in Experimental Medicine* 198:43–54.
- Verwoerdt, A., e R. H. Dovenmuehle. 1964. Heart Disease e Depression. *Geriatrics* 19:856–864.
- Vida, G., G. Peña, E. A. Deitch, e L. Ulloa. 2011. α 7-cholinergic receptor mediates vagal induction of splenic norepinephrine. *J Immunol* 186:4340–4346.
- Vilcek, J., e T. H. Lee. 1991. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 266:7313–7316.
- Wagner, R., e R. R. Myers. 1996. Schwann cells produce tumor necrosis factor alpha: expression in injured e non-injured nerves. *Neuroscience* 73:625–629.
- Wan, W., L. Wetmore, C. M. Sorensen, A. H. Greenberg, e D. M. Nance. 1994. Neural e biochemical mediators of endotoxin e stress-induced c-fos expression in the rat brain. *Brain Res Bull* 34:7–14.
- Wang, J., Y. Cao, e D. F. Steiner. 2003. Regulation of Proglucagon Transcription by Activated Transcription Factor (ATF) 3 e a Novel Isoform, ATF3b, through the cAMP-response Element/ATF Site of the Proglucagon Gene Promoter. *Journal of Biological Chemistry* 278:32899–32904.
- Ward, D. G., W. E. Grizzle, e D. S. Gann. 1976. Inhibitory e Facilitatory Areas of the Rostral Pons Mediating ACTH Release in the Cat. *Endocrinology* 99:1220–1228.
- Ward, D. G., e C. G. Gunn. 1976. Locus coeruleus complex: elicitation of a pressor response e a brain stem region necessary for its occurrence. *Brain Res* 107:401–406.
- Watkins, L. R., L. E. Goehler, J. K. Relton, N. Tartaglia, L. Silbert, D. Martin, e S. F. Maier. 1995. Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication. *Neurosci Lett* 183:27–31.
- Watkins, L. R., E. P. Wiertelak, L. E. Goehler, K. P. Smith, D. Martin, e S. F. Maier. 1994. Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. *Brain Research* 654:15–26.

- Weihe, E., S. Müller, T. Fink, e H. J. Zentel. 1989. Tachykinins, calcitonin gene-related peptide e neuropeptide Y in nerves of the mammalian thymus: interactions with mast cells in autonomic e sensory neuroimmunomodulation? *Neuroscience Letters* 100:77–82.
- Wesley, A., C. Bengtsson, A.-C. Elkan, L. Klareskog, L. Alfredsson, e S. Wedrén. 2012. Association between body mass index e anti-citrullinated protein antibody-positive e anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis: Results from a population-based case-control study. *Arthritis Care Res* 65:107–112.
- Westerloo, D. van, e T. van der Poll. 2005. Acute vagotomy activates the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:977–978.
- Westlund, K. N., R. M. Bowker, M. G. Ziegler, e J. D. Coulter. 1981. Origins of spinal noradrenergic pathways demonstrated by retrograde transport of antibody to dopamine-beta-hydroxylase. *Neurosci Lett* 25:243–249.
- Wexler, B. C., A. E. Dolgin, e E. W. Tryczynski. 1957. Effects of a bacterial polysaccharide (piromen®) on the pituitary-adrenal axis: adrenal ascorbic acid, cholesterol e histologic alterations. *Endocrinology* 61:300–308.
- Williams, J. M., e D. L. Felten. 1981. Sympathetic innervation of murine thymus e spleen: a comparative histofluorescence study. *Anat Rec* 199:531–542.
- Willkens, R. F., G. T. Nepom, C. R. Marks, J. W. Nettles, e B. S. Nepom. 1991. Association of HLA-Dw16 with rheumatoid arthritis in Yakima Indians. Further evidence for the “shared epitope” hypothesis. *Arthritis Rheum* 34:43–47.
- Wittkowski, H., D. Foell, E. a. Klint, L. D. Rycke, F. D. Keyser, M. Frosch, A.-K. Ulfgren, e J. Roth. 2007. Effects of intra-articular corticosteroids e anti-TNF therapy on neutrophil activation in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 66:1020–1025.
- Wright, H. L., R. J. Moots, e S. W. Edwards. 2014. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 10:593–601.
- Wu, K. H., M. C. Madigan, F. A. Billson, e P. L. Penfold. 2003. Differential expression of GFAP in early v late AMD: a quantitative analysis. *Br J Ophthalmol* 87:1159–1166.
- Yousfi-Malki, M., e J. J. Puizillout. 1994. Induction of Fos-like protein in neurons of the medulla oblongata after electrical stimulation of the vagus nerve in anesthetized rabbit. *Brain Res* 635:317–322.
- Youssef, P. P., J. Cormack, C. A. Evill, D. T. Peter, P. J. Roberts-Thomson, M. J. Ahern, e M. D. Smith. 1996. Neutrophil trafficking into inflamed joints in patients with rheumatoid arthritis, e the effects of methylprednisolone. *Arthritis Rheum* 39:216–225.
- Zandman-Goddard, G., E. Peeva, e Y. Shoenfeld. 2007. Gender e autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 6:366–372.
- Zhang, Y. H., J. Lu, J. K. Elmquist, e C. B. Saper. 2000. Lipopolysaccharide activates specific populations of hypothalamic e brainstem neurons that project to the spinal cord. *J Neurosci* 20:6578–6586.

ANEXOS