MILENA LOBÃO PINHEIRO

**Ativação de receptores nicotínicos modula a atividade
de células dendríticas OVA sensibilizadas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

Área de concentração:
Neurociências e Comportamento

Orientador:
Prof. Dr. João Palermo Neto

São Paulo

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Manipulações farmacológicas do sistema parassimpático: efeitos sobre a apresentação de células dendríticas OVA sensibilizadas", protocolado sob o nº1624/2009, utilizando 240 (duzentos e quarenta) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Palermo Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Pharmacological manipulations of the parasympathetic nervous system: effects on the presentation of OVA sensitized dendritic cells", protocol number 1624/2009, utilizing 240 (two hundred forty) mice, under the responsibility Prof. Dr. João Palermo Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum" meeting).

São Paulo, 09 de março de 2009

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

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

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

MILENA LOBAO PINHEIRO

Título: Ativação de receptores nicotínicos modula a atividade de células dendríticas OVA sensibilizadas.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

Área de concentração:
Neurociências e Comportamento

Aprovada em:

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A minha mãe, Vera. Que sempre me apoiou e sempre foi para mim o maior exemplo. Obrigada pelo apoio incondicional e por toda a nossa cumplicidade, não só nesta jornada, mas por toda a minha vida.

Te amo.

Ao Prof. Dr. João Palermo Neto, por todo o apoio, confiança e ensinamentos. Para mim, foi o melhor exemplo que se poderia ter sobre o que é ser um mestre. Foi um enorme privilégio ter sido sua aluna.

Obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Patologia e Toxicologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), local onde a maior parte deste trabalho foi realizado.

Ao Tytgat Institute do Academic Medical Center da Universidade de Amsterdam, local onde foi realizado o meu estágio sanduíche.

Ao Prof. Dr. Wouter de Jonge (Tytgat Institute), por me receber e colaborar com diversas sugestões neste trabalho.

Aos funcionários do Biotério (VPT-FMVZ-USP): Claudia, Idalina, Nelson, Luciana e Mauro por todo o apoio e dedicação.

Aos funcionários (atuais e os que não estão mais conosco) do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia (VPT-FMVZ-USP): Herculano, Vagner, Nicole, Ricardo e Priscila, vocês sempre foram sensacionais e sempre me ajudaram da melhor maneira possível.

Aos meus amigos Alison e Viviane. Obrigada por toda a ajuda, disposição e bom humor, não só no decorrer dessa tese, mas na minha vida pessoal. Vocês são os irmãos que eu escolhi ter.

Aos meus amigos de pós-graduação: Wanderley, Domenica, Monica e Denise. Vocês também sempre estiveram ao meu lado e ajudaram a transformar a pós-graduação em algo prazeroso. Obrigada por tudo.

Aos colegas do Tytgat Institute: José Duarte, Laurens, Brenda, Shobhit, Ronald, Francisca, Caroline, Lea, Sophie e Oana, que me ajudaram e me apoiaram durante o meu estágio.

Aos meus colegas de pós-graduação: Adriana Tiemi, Adriano Zager, Ana Paula Ligeiro, André Gomes, Atílio Calefi, Bruno Honda, Carolina Costola, Daniel Natô, Daniel Gimenes, Eduardo Zarzana, Eduardo Kenji, Emily Baskerville, Fernando Pípole, Glaucie Jussilane, João Gimenes, Lilian, Luciana Cunha, Luciana Lippi, Luciana

Vismari, Poliana Gomes, Renato Moraes, Rodrigo Vieira, Thalita Machado, Thiago Aloia, Thiago Kirsten, Thiago Marinho e Vinicius Izidio, pela agradável convivência.

A todos os membros do Grupo de Neuroimunomodulação. Conviver com vocês é estar em constante aprendizado.

A FAPESP pelo apoio financeiro concedido pela bolsa de estudos (08/54869-0) e pelo projeto temático (09/51886-3) do qual este trabalho faz parte.

Lista de Abreviaturas

ACh = Acetilcolina

ACTH = Hormônio adrenocorticotrófico

APC = Célula apresentadora de antígeno

DC = Célula dendrítica

DTH = Reação de hipersensibilidade do tipo tardia

GM-CSF = Fator estimulante de colônia de macrófagos e granulócitos

HPA = Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

IFN = Interferon

IL = Interleucina

LPS = Lipopolissacarídeo

MHC-II = Complexo maior de histocompatibilidade classe II

NK = Células natural killer

OVA = Ovalbumina

SNA = Sistema Nervoso Autônomo

SNC = Sistema Nervoso Central

SNP = Sistema Nervoso Autônomo Parassimpático

SNS = Sistema Nervoso Autônomo Simpático

TNF = Fator de necrose tumoral

Resumo

PINHEIRO, M. L. Ativação de receptores nicotínicos modula a atividade de células dendríticas OVA sensibilizadas [Nicotinic receptors activation modulates OVA sensitized dendritic cells activity] 2011. 105 f. Tese (Doutorado) Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2011.

A resposta imune pode ser regulada tanto pelo SNS quanto pelo SNP. Estudos recentes têm identificado uma via colinérgica anti-inflamatória entre as fibras eferentes do nervo vago e direcionadas ao sistema imune. Desta forma, tem-se postulado que esta conexão provê um controle neural da inflamação aguda de uma forma direta e reflexa, sendo então chamada de “reflexo inflamatório”. Assim, pareceu-nos relevante estudar as influências do SNP na função das DCs, o que foi feito na vigência de um processo inflamatório do tipo antígeno específico produzido por OVA. Para tanto utilizamos: o Betanecol (agonista muscarínico), a Atropina (antagonista muscarínico), a Anabasina (agonista nicotínico) e a Mecamilamina (antagonista nicotínico). No presente trabalho observou-se que: A Anabasina aumentou a porcentagem de células que expressam as moléculas co-estimulatórias B7.1 e B7.2 no baço de camundongos e diminuiu a produção de IL-12 no sobrenadante de co-cultura de células de baço, enquanto que o Betanecol não produziu qualquer efeito no fenótipo das DCs e na produção de citocinas; A Mecamilamina e a Atropina não foram capazes de alterar o fenótipo de DCs de baço e nem a produção de citocinas numa co-cultura de células de baço. A Anabasina, por sua vez: diminuiu a expressão das moléculas co-estimulatórias B7.1 e B7.2 nas DCs de linfonodo; diminuiu a expressão de MHC-II e aumentou a expressão das moléculas co-estimulatórias B7.1 e B7.2 em DCs de baço; diminuiu a expressão de IL-12 intracelular e aumentou a expressão de NF- κ B de DCs de cultura de hepatócitos; diminuiu os níveis séricos de TNF e MCP-1 e aumentou os níveis séricos de IL-6; diminuiu a resposta de

hipersensibilidade do tipo tardia; aumentou a expressão de MHC-II, diminuiu a expressão das moléculas co-estimulatórias B7.1 e B7.2; diminuiu a produção de IL-12 e aumentou a produção de IL-10 nas DCs de medula óssea; aumentou a expressão de *mNAChRa7* de DCs maduras provenientes de medula óssea. Os dados obtidos deste trabalho sugerem que o sistema colinérgico diminua a apresentação de antígenos específicos por DCs, atuando de forma anti-inflamatória e produzindo um *shift* da resposta Th1 para Th2; sugerem, ainda, que estes achados relacionam-se à estimulação da subunidade $\alpha 7$ do receptor nicotínico, com consequente aumento de atividade das DCs e subsequente aumento da expressão de *mNAChRa7*.

Abstract

PINHEIRO, M. L. Nicotinic receptors activation modulates OVA sensitized dendritic cells activity [Ativação de receptores nicotínicos modula a atividade de células dendríticas OVA sensibilizadas] 2011. 105 f. Tese (Doutorado) Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2011.

Immune responses might be regulated by the SNS and by PNS. Recently, it was shown the existence of a cholinergic anti-inflammatory pathway that connects vagus nerve afferent/efferent fibers to immune system cells within some organs. These connections make possible a neural control of the inflammatory response both through a direct and reflex mechanism; the so called “inflammatory reflex”. Therefore, we thought that it would be relevant to study the influences of PNS on DCs function in an antigen specific inflammatory process induced by OVA. As pharmacological tools: Bethanechol (muscarinic agonist), Atropine (muscarinic antagonist), Anabasine (nicotinic agonist) and Mecamylamine (nicotinic antagonist) were used. We showed that anabasine increased the percentage of splenocytes expressing co-stimulatory molecules (B7.1 and B7.2) and decreased IL-12p40 production in co-cultured (adherent:non-adherent) splenocytes supernatant. Bethanechol had no effects on DCs phenotype and cytokines production whatsoever. Mecamylamine and atropine also had no effects on DCs phenotype and on cytokines production, as well. Anabasine: decreased co-stimulatory molecules (B7.1 and B7.2) expression on DCs present in lymph nodes. Anabasine also decreased MHC-II expression, while increased the co-stimulatory molecules (B7.1 and B7.2) expression on DCs present in the spleen. Additionally, anabasine decreased intracellular IL-12 expression, while increased NF- κ B expression in splenocytes culture. Interestingly, anabasine decreased both TNF and MCP-1 and increased IL-6 serum levels. Anabasine also decreased a delayed type hypersensitivity (DTH) response in OVA-sensitized mice. Moreover, Anabasine increased both MHC-II expression and

IL-10 productions, while decreased both co-stimulatory molecules (B7.1 and B7.2) expression and IL-12 production in bone marrow derived DCs. Finally, anabasine increased *mNAChRa7* expression in mature bone marrow derived DCs. Taken together, these data suggest that the cholinergic system decreases antigen-specific presentation by DCs, leading to an anti-inflammatory effect, which in turn induces to a shift from Th1 to Th2 responses. Moreover, our data strongly suggest that nicotinic receptor $\alpha 7$ subunit is involved with PNS activity.

Lista de figuras

Figura 1 - Modelos neuronais para a modulação da produção de citonias pelo nervo vago (Rosas-Ballina e Tracey, 2009a).....	20
Figura 2 – Dot plot ilustrando a população de células dendríticas do baço no gate para a análise....	41
Figura 3 – Dot plots (FL-1 x FL-2) ilustrando as marcações de superfície de células dendríticas no baço.....	41
Figura 4 – Dot Plots utilizados para análise de proliferação linfocitária: A) Doto plot ilustrando a população de interesse; B) linfócitos não estimulados; C) linfócitos estimulados.....	43
Figura 5 – (A) Citograma representando o <i>gate</i> na população de células analisadas. (B) Histograma representando a viabilidade celular utilizando 7-AAD-PerCP. (C) Citograma representando a população de células que expressam CD-11c-FITC e que expressam NFκB p65-PE (Q2). (D) Histograma representando a intensidade de fluorescência produzida pela marcação de NFκB p65-PE.....	46
Figura 6 – (A) Citograma que ilustra as populações de <i>nanobeads</i> da curva padrão para as diferentes citocinas na concentração de 625 pg/mL. (B) Histograma que ilustra os picos de intensidade de fluorescência para os diferentes populações de <i>nanobeads</i> . Figura adaptada do manual do usuário do CBA mouse inflammation kit – BD Biosciences.....	47
Figura 7 - Porcentagem de células CD80 ⁺ CD86 ⁺ de camundongos que receberam agonistas nicotínicos e muscarínicos ou sua combinação. ^a p<0,05 em relação ao grupo salina; ^b p<0,05 em relação ao grupo anabasina; ^c p<0,01 em relação aos grupos salina e betanecol, teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, n=10 animais/grupo.....	53
Figura 8 - Expressão do marcador de MHC classe II (IA ^{b+}) nas células dendríticas de camundongos que receberam agonistas nicotínicos e muscarínicos e sua combinação. ^a p<0,05 em relação ao grupo anabasina, teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, n=10 animais/grupo.....	54
Figura 9 - Expressão do marcador CD11c nas células dendríticas de camundongos que receberam agonistas nicotínicos e muscarínicos e sua combinação. ^a p<0,05 em relação ao grupo anabasina; ^b p<0,001 em relação aos grupos salina, anabasina e betanecol, teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, n=10 animais/grupo.....	55
Figura 10 – Níveis de IL-12 produzidos pelas células dendríticas na presença de OVA no sobrenadante de cultura de camundongos que receberam agonistas nicotínicos e muscarínicos e sua combinação. ^a p<0,01 em relação ao grupo salina; ^b p<0,05 em relação ao grupo anabasina, teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, n=10 animais/grupo.....	57
Figura 11 - Porcentagem de células CD11c ⁺ IA ^{b+} de camundongos que receberam antagonistas nicotínicos e muscarínicos ou sua combinação. ^a p<0,01 em relação ao grupo atropina; ^b p<0,05 em relação ao grupo atropina, teste de Kruskal-Wallis, n=10 animais/grupo.....	59
Figura 12 - Expressão do marcador CD80 nas células dendríticas de linfonodo de camundongos 7 dias após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. *p<0,05 em relação ao grupo controle, Teste t de Student, n=10 animais/grupo.....	63
Figura 13 - Expressão do marcador CD86 nas células dendríticas de linfonodo de camundongos 7 dias após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. *p<0,05 em relação ao grupo controle, Teste t de Student, n=10 animais/grupo.....	64
Figura 14 - Expressão do marcador IAb nas células dendríticas de baço de camundongos 24 horas após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. *p<0,05 em relação ao grupo controle, Teste t de Student, n=10 animais/grupo.....	66
Figura 15 - Expressão do marcador CD80 nas células dendríticas de baço de camundongos 24 horas após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. *p<0,05 em relação ao grupo controle, Teste t de Student, n=10 animais/grupo.....	66
Figura 16 - Expressão do marcador CD86 nas células dendríticas de baço de camundongos 24	

horas após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, Teste t de Student, $n=10$ animais/grupo.....	67
Figura 17 - Intensidade de fluorescência relativa a produção de IL-12 intracelular das células dendríticas CD11c ⁺ de baço de camundongos 7 dias após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, Teste t de Student, $n=10$ animais/grupo.....	68
Figura 18 - Intensidade de fluorescência relativa a expressão da ativação do NF- κ B de células dendríticas CD11c ⁺ de baço de camundongos 7 dias após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, Teste t de Student, $n=10$ animais/grupo.....	70
Figura 19 - Dosagem de TNF no soro de camundongos 24 horas após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina; Teste t de Student, $n=10$ animais/grupo.....	71
Figura 20- Dosagem de MCP-1 no soro de camundongos 24 horas após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina; Teste t de Student, $n=10$ animais/grupo.....	72
Figura 21 - Dosagem de IL-6 no soro de camundongos 7 dias após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina; Teste t de Student, $n=10$ animais/grupo.....	73
Figura 22 - Efeitos da Anabasina numa reação de hipersensibilidade do tipo tardia. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina, ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey-Kramer, $n=12$ animais/grupo.....	74
Figura 23 - Efeitos da Anabasina <i>in vitro</i> na expressão de IAb na superfície de células dendríticas de uma cultura de medula óssea de camundongos. ^a $p < 0,001$ em relação aos grupos Veículo e Epinefrina, Teste de Tukey-Kramer, $n=8$ animais/grupo.....	78
Figura 24 - Efeitos da Anabasina <i>in vitro</i> na expressão de CD80 na superfície de células dendríticas de uma cultura de medula óssea de camundongos. ^b $p < 0,01$ em relação ao grupo Veículo e ^c $p < 0,001$ em relação ao grupo Epinefrina, Teste de Tukey-Kramer, $n=8$ animais/grupo.....	78
Figura 25 - Efeitos da Anabasina <i>in vitro</i> na expressão de CD86 na superfície de células dendríticas de uma cultura de medula óssea de camundongos. ^d $p < 0,05$ em relação ao grupo Veículo, Teste de Tukey-Kramer, $n=8$ animais/grupo.....	79
Figura 26 – Efeitos de diferentes concentrações de Anabasina <i>in vitro</i> na produção de IL-12 de uma cultura pura de células dendríticas de medula óssea. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo veículo, Teste de Dunnett, $n=8$ amostras/condição.....	81
Figura 27 – Efeitos de diferentes concentrações de Anabasina <i>in vitro</i> na produção de IL-10 de uma cultura pura de células dendríticas de medula óssea. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo veículo, Teste de Dunnett, $n=8$ amostras/condição.....	81
Figura 28 - Efeitos da Anabasiana na expressão de mRNA para o receptor $\alpha 7$ -nicotínico de células dendríticas provenientes de medula óssea avaliado por PCR convencional. A: cérebro de camundongo; B: Veículo sem LPS; C: Veículo+LPS; D: Anabasina+LPS.....	83

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Porcentagem de células dendríticas de camundongos que receberam agonistas nicotínicos e muscarínicos e sua combinação. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.....	53
Tabela 2 – Análise da expressão dos diferentes marcadores de superfície utilizados na fenotipagem das células dendríticas de camundongos que receberam agonistas nicotínicos e muscarínicos e sua combinação. Os dados referem-se à unidade de fluorescência e representam a média $\pm$ desvio padrão.....	54
Tabela 3 – Índice de proliferação de linfócitos estimulados pelas células dendríticas na presença de OVA. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.....	56
Tabela 4 – Perfil de citocinas Th1 (IFN γ e IL-12) e Th2 (IL-4) produzidos pelas células dendríticas na presença de OVA no sobrenadante de cultura. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.....	57
Tabela 5 – Porcentagem de células dendríticas de camundongos que receberam antagonistas nicotínicos e muscarínicos e sua combinação. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.....	59
Tabela 6 – Análise da expressão dos diferentes marcadores de superfície utilizados na fenotipagem das células dendríticas de camundongos que receberam antagonistas nicotínicos e muscarínicos e sua combinação. Os dados referem-se à unidade de fluorescência e representam a média $\pm$ desvio padrão.....	59
Tabela 7 – Índice de proliferação de linfócitos estimulados pelas células dendríticas na presença de OVA. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.....	60
Tabela 8 – Perfil de citocinas Th1 (IFN γ e IL-12) e Th2 (IL-4) produzidos pelas células dendríticas na presença de OVA no sobrenadante de cultura. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.....	61
Tabela 9 – Porcentagem de células dendríticas de linfonodo de camundongos 7 dias após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.....	62
Tabela 10 – Análise da expressão dos diferentes marcadores de superfície utilizados na fenotipagem das células dendríticas de linfonodo de camundongos 7 dias após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. Os dados referem-se à unidade de fluorescência e representam a média $\pm$ desvio padrão.....	63
Tabela 11 – Porcentagem de células dendríticas de baço de camundongos 24 horas após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.....	65
Tabela 12 – Análise da expressão dos diferentes marcadores de superfície utilizados na fenotipagem das células dendríticas de baço de camundongos 24 horas após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. Os dados referem-se à unidade de fluorescência e representam a média $\pm$ desvio padrão.....	65
Tabela 13 – Intensidade de fluorescência relativa a produção de IL-12 intracelular das células dendríticas CD11c ⁺ de baço de camundongos 7 dias após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.....	68
Tabela 14 – Intensidade de fluorescência relativa a expressão da ativação do NF- κ B de células dendríticas CD11c ⁺ de baço de camundongos 7 dias após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.....	69
Tabela 15 – Dosagem de citocinas e quimiocinas no soro de camundongos 24 horas após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.....	71
Tabela 16 – Dosagem de citocinas e quimiocinas no soro de camundongos 7 dias após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.....	72

Tabela 17 – Efeitos da Anabasina numa reação de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH).....	74
Tabela 18 - Avaliação dos efeitos da Anabasina (agonista nicotínico) nos níveis séricos de Adrenalina, 30 minutos e 1 hora após a administração. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.....	75
Tabela 19 - Avaliação dos efeitos da Anabasina (agonista nicotínico) nos níveis séricos de Noradrenalina, 30 minutos e 1 hora após a administração. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.....	76
Tabela 20 – Efeitos da Anabasina <i>in vitro</i> na porcentagem de células dendríticas de uma cultura de medula óssea de camundongos. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.....	77
Tabela 21 – Efeitos da Anabasina <i>in vitro</i> na expressão dos diferentes marcadores de superfície de células dendríticas de uma cultura de medula óssea de camundongos. Os dados referem-se à unidade de fluorescência e representam a média $\pm$ desvio padrão.....	77
Tabela 22 – Efeitos de diferentes concentrações de Anabasina <i>in vitro</i> na produção de IL-12 e IL-10 de uma cultura pura de células dendríticas de medula óssea.....	80

Sumario

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
SUMARIO	17
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1. NEUROIMUNOMODULAÇÃO	22
2.2. O SISTEMA NERVOSO PARASSIMPÁTICO E O SISTEMA IMUNE	26
2.3. CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	30
3. OBJETIVOS.....	33
3.1. OBJETIVO GERAL:	33
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	33
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
5.1. ANIMAIS	35
5.2. FÁRMACOS	36
5.3. FORMAÇÃO DOS GRUPOS.....	36
5.4. SENSIBILIZAÇÃO IMUNOGÊNICA COM OVALBUMINA (OVA)	38
5.5. EUTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	39
5.6. COLETA E CULTURA DAS CÉLULAS DO BAÇO E LINFONODO DOS CAMUNDONGOS	39
5.7. COLETA E CULTURA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PROVENIENTES DE MEDULA ÓSSEA	39
5.8. ANÁLISE FENOTÍPICA EM CITÔMETRO DE FLUXO	40
5.9. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO LINFOCITÁRIA.....	42
5.10. ANÁLISE DO PERFIL DE CITOCINAS	43
5.11. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-12 INTRACELULAR POR CÉLULAS DENDRÍTICAS DO BAÇO	44
5.12. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE NFκB DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DO BAÇO.....	45
5.13. DOSAGEM DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS	46
5.14. ESTABELECIMENTO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIA	48
5.15. DOSAGEM DE ADRENALINA E NORADRENALINA SÉRICA POR ELISA	49
5.16. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>MNACHRA7</i> PROVENIENTE DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DE MEDULA ÓSSEA POR PCR CONVENCIONAL	50
5.17. ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS.....	52
6.1. EXPERIMENTO 1 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DE UM AGONISTA NICOTÍNICO E MUSCARÍNICO E DE SUA COMBINAÇÃO, NA FENOTIPAGEM DE CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	52
6.2. EXPERIMENTO 2 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DE UM AGONISTA NICOTÍNICO E MUSCARÍNICO E DE SUA COMBINAÇÃO, NA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS ESTIMULADOS PELAS CÉLULAS DENDRÍTICAS NA PRESENÇA DE OVA.	55
6.3. EXPERIMENTO 3 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DE UM AGONISTA NICOTÍNICO E MUSCARÍNICO E DE SUA COMBINAÇÃO, NO PERFIL DE CITOCINAS TH1 (IFNγ E IL-12) E TH2 (IL-4).	56

6.4. EXPERIMENTO 4 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DE UM ANTAGONISTA NICOTÍNICO E MUSCARÍNICO E DE SUA COMBINAÇÃO, NA FENOTIPAGEM DE CÉLULAS DENDRÍTICAS.	58
6.5. EXPERIMENTO 5 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DE UM ANTAGONISTA NICOTÍNICO E MUSCARÍNICO E DE SUA COMBINAÇÃO, NA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS ESTIMULADOS PELAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.	60
6.6. EXPERIMENTO 6 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DE UM ANTAGONISTA NICOTÍNICO E MUSCARÍNICO E DE SUA COMBINAÇÃO, NO PERFIL DE CITOCINAS TH1 (IFN γ E IL-12) E TH2 (IL-4) PRODUZIDOS PELAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.	61
6.7. EXPERIMENTO 7 - AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ANABASINA (AGONISTA NICOTÍNICO) NA FENOTIPAGEM DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DE LINFONODO 7 DIAS APÓS A IMUNIZAÇÃO COM OVA.	62
6.8. EXPERIMENTO 8 - AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ANABASINA (AGONISTA NICOTÍNICO) NA FENOTIPAGEM DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DE BAÇO 24 HORAS APÓS A IMUNIZAÇÃO COM OVA.	64
6.9. EXPERIMENTO 9 - AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ANABASINA (AGONISTA NICOTÍNICO) NA PRODUÇÃO DE IL-12 INTRACELULAR DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DE BAÇO 7 DIAS APÓS A IMUNIZAÇÃO COM OVA.	67
6.10. EXPERIMENTO 10 - AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ANABASINA (AGONISTA NICOTÍNICO) NA EXPRESSÃO DE NF- κ B DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DE BAÇO 7 DIAS APÓS A IMUNIZAÇÃO COM OVA.	68
6.11. EXPERIMENTO 11 - AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ANABASINA (AGONISTA NICOTÍNICO) NA QUANTIDADE DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS NO SORO DOS ANIMAIS 24 HORAS E 7 DIAS APÓS A IMUNIZAÇÃO COM OVA.	70
6.12. EXPERIMENTO 12 - AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ANABASINA (AGONISTA NICOTÍNICO) NUMA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIA (DTH).	73
6.13. EXPERIMENTO 13 - AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ANABASINA (AGONISTA NICOTÍNICO) NOS NÍVEIS SÉRICOS DE ADRENALINA E NORADRENALINA.	75
6.14. EXPERIMENTO 14 - AVALIAÇÃO DOS EFEITOS <i>IN VITRO</i> DA ANABASINA (AGONISTA NICOTÍNICO) NA FENOTIPAGEM DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PROVENIENTES DE MEDULA ÓSSEA.	76
6.15. EXPERIMENTO 15 - AVALIAÇÃO DOS EFEITOS <i>IN VITRO</i> DA ANABASINA (AGONISTA NICOTÍNICO) NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PROVENIENTES DE MEDULA ÓSSEA.	79
6.16. EXPERIMENTO 16 - AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ANABASIANA (AGONISTA NICOTÍNICO) NA EXPRESSÃO DE MRNA PARA O RECEPTOR α 7-NICOTÍNICO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PROVENIENTES DE MEDULA ÓSSEA.	82
7. DISCUSSÃO.	84
8. CONCLUSÕES.	97
8.1. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS.	97
8.2. CONCLUSÃO GERAL.	99
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	100

1. INTRODUÇÃO¹

A idéia da existência de interações entre o sistema nervoso e o sistema imune é extremamente antiga e tem sido a base da medicina psicossomática. A neuroimunomodulação foi, inicialmente, conceituada como a área de estudo que avalia as influências do sistema nervoso sobre a resposta imune. Acreditava-se, naquela ocasião, que essa interação fosse unidirecional; sabe-se, hoje, que o sistema imune também influencia a atividade do sistema nervoso.

Assim, podemos citar como formas de ligação entre o Sistema Nervoso Central (SNC) e o sistema imune: o sistema endócrino, em especial, o eixo Hipotálamo Pituitária Adrenal (HPA); o Sistema Nervoso Autônomo (SNA); e a própria atividade neural uma vez que medicamentos de ação central também modificam a função imune.

Por outro lado, mostrou-se que substâncias liberadas por células do sistema imune são capazes de modular a atividade de neurônios em áreas específicas do SNC e, dessa forma, o comportamento animal. Neste sentido, a produção e liberação de citocinas provocam respostas neuroendócrinas e comportamentais desencadeadas pela ação direta e/ou indireta destas no SNC.

Apesar de existirem diversos trabalhos que mostram as diferentes formas de comunicação entre o sistema imune e o SNC, há uma crescente procura por um maior entendimento do papel exercido pelo Sistema Nervoso Periférico (SNP), em especial do SNA na regulação das respostas imunes. Estudos recentes têm identificado uma via colinérgica anti-inflamatória entre as fibras eferentes do nervo vago e as células do sistema imune. Desta forma, tem-se postulado que esta conexão provê um controle

¹ Todas as citações estão presentes na Revisão de Literatura.

neural da inflamação aguda de uma forma direta e reflexa, sendo então chamada de “reflexo inflamatório”.

O mecanismo molecular mais comumente proposto para explicar a inibição da síntese de citocinas pelo “reflexo inflamatório” refere-se à ação da Acetilcolina (ACh), o neurotransmissor vagal. Mostrou-se que tanto os macrófagos quanto outras células produtoras de citocinas expressam receptores para ACh que ativam sinais intracelulares que inibem a síntese de citocinas.

Portanto, pode-se dizer que o SNP possui um papel importante, sendo mais uma via de interação neuroimune. Parece, pois, ser relevante estudar os possíveis efeitos da manipulação farmacológica deste sistema sobre as células dendríticas (DCs), que são células de grande importância na resposta imune.

As DCs são chamadas de células apresentadoras de antígenos (APCs) profissionais, pois são mais potentes do que outras células (macrófagos e linfócitos B) e elas possuem alta capacidade estimulatória de linfócitos T.

Trabalhos já têm demonstrado que as DCs também estão envolvidas em processos neuroimunes, principalmente em relação à influência do eixo HPA e, conseqüentemente, dos glicocorticóides nos processos de maturação e função das DCs. Também já foi demonstrado que o SNS, principalmente por ação da noradrenalina, produz um efeito adjuvante na ativação das DCs, resultando este fato em um aumento de resposta primária e de memória de células T.

Poucos estudos foram realizados em relação às influências do SNP na atividade das DCs; porém, sabe-se que as DCs possuem receptores muscarínicos e nicotínicos e, que podem produzir acetilcolinesterase. Desta forma, pareceu-nos relevante estudar mais profundamente as influências do SNP na função das DCs, o que foi feito na

vigência de um processo inflamatório do tipo antígeno específico produzido por ovalbumina (OVA).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Neuroimunomodulação

A idéia da existência de interações entre o sistema nervoso e o sistema imune é extremamente antiga e tem sido a base da medicina psicossomática. Porém, somente nas últimas duas décadas é que se começou a dar maior importância a esse estudo já que, até então, prevalecia uma tendência de setorialização das abordagens experimentais que se faziam nestes sistemas (Conti, 2000). No entanto, lembra-se que Galeno, em 200 a.C., já descrevia serem mulheres “melancólicas” mais suscetíveis ao desenvolvimento de neoplasias mamárias que mulheres “sanguíneas” (Dunn, 1995). Aristóteles, afirmava que a “psique” e o corpo reagiam complementarmente um com o outro; para ele, uma mudança no estado da psique produzia uma mudança na estrutura do corpo e, inversamente, uma mudança na estrutura do corpo produzia uma mudança na estrutura da psique.

A neuroimunomodulação foi, inicialmente, conceituada como a área de estudo que avalia as influências do sistema nervoso sobre a resposta imune (Reichlin, 1993). Acreditava-se, naquela ocasião, que essa interação fosse unidirecional; sabe-se, hoje, que o sistema imune também influencia a atividade do sistema nervoso. Neste sentido, Blalock e Smith, em 1980, demonstraram que leucócitos produziam, juntamente com o interferon (IFN), um peptídeo, identificado posteriormente como sendo o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), com características semelhantes ao liberado pela hipófise. O fato de citocinas, hormônios, neurotransmissores e seus respectivos receptores serem comuns a estruturas presentes, tanto no sistema nervoso central (SNC),

como no endócrino e imune e, também, a constatação de que estes sistemas possuem uma linguagem bioquímica comum, reforçam a idéia da bidirecionalidade da neuroimunomodulação (Blalock e Smith, 1980).

Atualmente sabe-se que diversos estímulos provenientes do SNC, como lesões no córtex cerebral, estresse e variações psicológicas, são capazes de modular uma resposta imune. Desta forma, estados de ansiedade e depressão, levam a um déficit pronunciado na imunidade, em especial, no número de células esplênicas, na proliferação de linfócitos B, T, *T helper* e T citotóxico, na atividade e no número de células *natural killer* (NK) e na atividade de macrófagos (Alves *et al.*, 2006; Fonseca *et al.*, 2002; Massoco e Palermo-Neto, 2003; Palermo Neto *et al.*, 2001). Estas mesmas condições alteram a resposta imune interferindo com o crescimento neoplásico e com o desenvolvimento de infecções em animais (Ligeiro de Oliveira *et al.*, 2011; Palermo-Neto *et al.*, 2003; Palermo Neto *et al.*, 2001; Sakai *et al.*, 2006a; Sakai *et al.*, 2006b).

Desta forma, podemos citar algumas formas de ligação entre o SNC e o sistema imune como: o sistema endócrino, em especial, o eixo Hipotálamo Pituitária Adrenal (HPA) (Ader, 2007; Cohen e Herbert, 1996; Conti, 2000; Dunn, 1995); o Sistema Nervoso Autônomo (SNA) (Blalock, 1994); e também a própria atividade neural uma vez que medicamentos de ação central, como o diazepam (Lazzarini *et al.*, 2006; Lazzarini *et al.*, 2001; Sakai *et al.*, 2006a; Sakai *et al.*, 2006b), os endocanabinóides (Ribeiro *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2010) e psicoestimulantes, entre eles a anfetamina (Ligeiro-Oliveira *et al.*, 2004; Ligeiro de Oliveira *et al.*, 2008; Ligeiro de Oliveira *et al.*, 2011) e o MDMA (Ferah-de-Paula *et al.*, 2009; Ferraz-de-Paula *et al.*, 2011) modificam a função imune.

A ativação do eixo HPA, e a conseqüente produção dos glicocorticóides, durante o estresse é um dos principais mecanismos responsáveis pelas alterações encontradas no decorrer de uma resposta imune. Sabe-se serem os glicocorticóides capazes de: inibir a transcrição de genes para inúmeras citocinas, como aqueles para interleucina (IL) 1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-13, IL-16, fator de necrose tumoral (TNF), interferon γ (IFN- γ) (Ader, 2007); interferir negativamente com o desenvolvimento e migração de células T através de uma inibição da expressão de moléculas de adesão (Schoneveld, 2007); diminuir a atividade de macrófagos (Massoco e Palermo-Neto, 2003); e reduzir a atividade de neutrófilos (Alves et al., 2006).

Sabe-se, ainda, que os glicocorticóides podem levar a um desbalanço nas respostas Th1/Th2; eles inibem a produção de IL-12, IFN- γ e TNF- α por células apresentadoras de antígenos e células Th1, mas induzem a um aumento de produção de IL-4, IL-10 e IL-13 por células Th2. Em decorrência, pode-se dizer que os glicocorticóides podem suprimir uma resposta imune celular do tipo Th1 e aumentar uma resposta humoral mediada por células Th2 (Elenkov, 2004). Este desequilíbrio é de grande relevância, pois uma tendência à resposta imunológica do tipo Th2 já foi relatada como sendo capaz de tornar indivíduos mais susceptíveis a determinados tipos de doenças, como as alergias (Bashir et al., 2004).

Outra forma proposta para justificar a interação do SNC com o sistema imune, além daquela que envolve o eixo HPA, ocorre através do sistema nervoso autônomo simpático (SNS) e parassimpático (SNP). Besedovsky e Del Rey em 1979 e 1981 foram os primeiros a demonstrar que uma ativação do SNS regulava a resposta de anticorpos (Sanders e Kavelaars, 2007). De fato, sabe-se que tanto os órgãos linfóides primários quanto os secundários possuem inervação simpática; conseqüentemente, as células

desses órgãos, por possuírem adrenoceptores, são passíveis à ação das catecolaminas como a adrenalina e a noradrenalina. De fato, já foram identificados receptores adrenérgicos, α e β , em células imunes, como por exemplo, em linfócitos (Qiu *et al.*, 2005; Sanders e Kavelaars, 2007). Com relação à expressão de receptores α , foi demonstrado que monócitos e macrófagos expressam esse receptor (Kavelaars, 2002). Ainda, diversos estudos mostraram que tanto células T quanto células B expressam receptores β_2 adrenérgicos, assim como populações de células CD8⁺ e CD4⁺ e células Th1 naïve, enquanto que esses receptores não estão presentes em células Th2 (Nance e Sanders, 2007). O número de receptores β_2 adrenérgicos expressos nas células imunes é variável e pode ser regulado por diversos fatores, incluindo-se aqui a ativação celular, a presença de citocinas, hormônios e neurotransmissores. A estimulação de receptores β_2 adrenérgicos induz a um aumento de AMPc e subsequente ativação de proteína kinase A. Além disso, essa estimulação ativa outras vias de sinalização intermediárias, como a MAP kinase (Nance e Sanders, 2007).

Por outro lado, mostrou-se que substâncias liberadas por células do sistema imune são capazes de modular a atividade de áreas específicas do SNC e, dessa forma, o comportamento animal. Neste sentido, a produção e liberação de citocinas provocam uma resposta endócrina desencadeada pela ação direta e/ou indireta destas no SNC. As citocinas, de um modo geral, são mediadores solúveis produzidos por células imunes ativadas que servem de comunicação célula a célula no sistema imune. Durante o curso de uma infecção, a liberação de citocinas na periferia pode ter ações no sistema neuroendócrino e, no comportamento (Dantzer e Kelley, 2007). Nesta mesma linha de raciocínio, Basso e colaboradores (2003) mostraram em nossos laboratórios, que uma reação alérgica intestinal foi capaz de alterar tanto o comportamento de animais como a atividade de células do núcleo paraventricular do hipotálamo e do núcleo central da

amígdala. Outro trabalho interessante realizado por Costa-Pinto e colaboradores (2005), mostrou, em um modelo de asma alérgica por OVA, que durante as crises, há um aumento na atividade do núcleo paraventricular do hipotálamo e do núcleo central da amígdala, áreas do SNC que estão intimamente associadas com as respostas emocionais (Basso et al., 2003; Costa-Pinto et al., 2005).

Apesar de existirem diversos trabalhos que mostram as diferentes formas de comunicação entre os sistemas imune e o nervoso, há uma crescente procura por um maior entendimento do papel do SNP na regulação das respostas imunes.

2.2. O sistema nervoso parassimpático e o sistema imune

A sobrevivência de um organismo seria impossível sem uma defesa contra os diversos ataques e injúrias. No momento em que essas defesas são desencadeadas ocorre uma resposta inflamatória cuja magnitude é crucial para o sucesso: uma resposta insuficiente (imunodeficiência) pode propiciar o desenvolvimento de infecções e neoplasias; uma resposta excessiva pode resultar em diversas doenças, como artrite reumatóide e doença de Crohn (Tracey, 2002). Se uma grande quantidade de citocinas produzidas por uma resposta inflamatória exarcebada se espalhar pela corrente sanguínea, como ocorre na síndrome do choque séptico e sepsis, pode-se tornar, então, mais perigosa que o estímulo inicial, ou seja, as citocinas produzidas pelo sistema imune podem causar sinais, sintomas e danos que podem ser piores que os efeitos da doença inicial (Tracey, 2007).

Muitos mediadores anti-inflamatórios previnem os efeitos das citocinas pró-inflamatórias. Durante os estágios iniciais de uma infecção, estas citocinas começam a

se acumular no sítio inflamatório e/ou no sangue. Quando atingem determinadas concentrações, citocinas pró-inflamatórias são inibidas, sendo a magnitude da resposta inflamatória atenuada e o dano tecidual prevenido (Nathan, 2002). Neste sentido, modelos de experimentação animal de choque séptico mostraram que altos níveis de IL-6 e, principalmente, de TNF- α , foram associados a uma extensa injúria tecidual e a uma alta mortalidade, enquanto que a sobrevivência foi associada a uma elevação nos níveis de IL-10 (Dinarello, 1997).

A resposta imune inata pode ser regulada tanto pelo SNS quanto pelo SNP. Estudos recentes têm identificado uma via colinérgica anti-inflamatória entre as fibras eferentes do nervo vago e direcionadas ao sistema imune (Bernik et al., 2002; Borovikova et al., 2000b; Fuentes et al., 2008; Huston et al., 2006; Nizri et al., 2006; Pavlov et al., 2006). Desta forma, tem-se postulado que esta conexão provê um controle neural da inflamação aguda de uma forma direta e reflexa, sendo então chamada de “reflexo inflamatório” (Tracey, 2002) ou de “via colinérgica anti-inflamatória” (Gallowitsch-Puerta e Pavlov, 2007).

Patógenos e danos teciduais induzem a liberação de citocinas no sítio inflamatório. Essas citocinas ativam fibras aferentes do nervo vago que atingem o núcleo do trato solitário no cérebro. Sinais compensatórios são transmitidos via nervo vago eferente até o sítio inflamatório onde ocorre a liberação de neurotransmissores, como a Acetilcolina (ACh), que vão agir nos macrófagos e demais células imunes atenuando, assim, a resposta inflamatória (Rosas-Ballina e Tracey, 2009a). Vale ressaltar, que a forma como ocorre esse reflexo inflamatório pelo braço eferente do nervo vago ainda não foi totalmente elucidado. Estimulações elétricas do nervo vago atenuam a liberação sistêmica de TNF através de uma via dependente da subunidade $\alpha 7$

do receptor nicotínico. A administração de agonistas $\alpha 7$ ou a ativação da via colinérgica neuronal que depende de receptores muscarínicos e que aumentam a atividade vagal, atenuam os níveis sistêmicos de TNF. Assim, foram propostos dois modelos neuronais para a modulação da produção de citonias pelo nervo vago. O primeiro envolve o neurônio pós-ganglionar localizado no gânglio do plexo mesentérico celíaco superior, que atinge o baço através do nervo esplênico. Neste modelo, a estimulação elétrica do nervo vago cervical atenua os níveis sistêmicos de TNF através de uma via dependente da subunidade $\alpha 7$ do receptor nicotínico, do nervo esplênico e de catecolaminas. A estimulação do nervo vago pode modular a liberação de norepinefrina pelo nervo esplênico. Neste cenário, essa norepinefrina liberada pelo nervo esplênico pode agir nos receptores $\beta 2$ adrenérgicos expressos nos macrófagos atenuando assim, a liberação de TNF. Ainda, a subunidade $\alpha 7$ do receptor nicotínico presente nos neurônios do plexo mesentérico celíaco superior são responsáveis pelo sinal entre o vago e o nervo esplênico. Uma segunda alternativa, propõe que a norepinefrina originada nos terminais do nervo esplênico induziriam a liberação de ACh proveniente de células não neurais (por exemplo, linfócitos) que agindo na subunidade $\alpha 7$ do receptor nicotínico presente nos macrófagos, atenua a liberação de TNF (Rosas-Ballina e Tracey, 2009a) (**Figura 1**).

Figura 1 - Modelos neuronais para a modulação da produção de citonias pelo nervo vago (Rosas-Ballina e Tracey, 2009a)

Um estudo revelou que estimulações elétricas desta via colinérgica (1) diminuíram a síntese e a liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos estimulados por LPS *in vivo* e *ex vivo* e (2) previniram o desenvolvimento de choque séptico (Borovikova et al., 2000a). Outro estudo revelou que a administração de CNI-1493 (um inibidor de TNF- α) produziu um aumento da atividade nas eferências do nervo vago e uma inibição de inflamação em sítios localizados fora do SNC (Bernik et al., 2002).

O mecanismo molecular mais comumente proposto para explicar a inibição da síntese de citocinas pelo “reflexo inflamatório” refere-se à ação da ACh, o principal neurotransmissor vagal. Mostrou-se que tanto macrófagos quanto outras células

produtoras de citocinas expressam receptores para ACh que ativam sinais intracelulares que inibem a síntese de citocinas (Wang et al., 2004a; Wang et al., 2003).

Alguns trabalhos têm demonstrado que células imunes possuem um sistema colinérgico completo, com receptores muscarínicos e nicotínicos, colina acetiltransferase e acetilcolinesterase (Kawashima e Fujii, 2003a; Tayebati *et al.*, 2002). Ainda neste sentido, demonstrou-se que células T estimuladas por fitohemaglutinina aumentam a síntese de ACh e a expressão de colina acetiltransferase e de receptores muscarínicos (Kawashima e Fujii, 2003b) e também que a ACh sintetizada e liberada pelas células T, durante a apresentação antigênica, atua nos receptores muscarínicos e nicotínicos de uma forma autócrina e/ou parácrina para regular a função imune (Kawashima et al., 2007).

Por tudo quanto exposto, pode-se dizer que o SNP possui um papel importante, sendo mais uma forma indicativa de interação neuroimune. Assim, parece ser relevante estudar os possíveis efeitos da manipulação farmacológica do SNAP sobre as células dendríticas, que são células de grande importância na resposta imune.

2.3. Células dendríticas

Na maioria dos casos, os antígenos antes de serem reconhecidos pelas células efetoras precisam ser “processados” e “apresentados” por células apresentadoras de antígenos (APCs). Qualquer célula que expressa um complexo maior de histocompatibilidade (MHC) e outras moléculas relacionadas e que “carregam” elementos antigênicos que são reconhecidos por linfócitos podem ser chamadas de APC. As células dendríticas (DCs) são chamadas de APCs profissionais, pois são mais

potentes do que outras células (macrófagos e linfócitos B) e elas possuem alta capacidade estimulatória de linfócitos T (Chung, 2004). É estimado que uma DC pode ativar cerca de 100 a 3000 células T, além de também ter capacidade de ativar células B e NK (Banchereau e Steinman, 1998).

As DCs presentes em tecidos periféricos encontram-se em forma imatura, porque ainda não expressam na sua superfície moléculas co-estimulatórias essenciais para a estimulação de células T, como as moléculas B7.1, B7.2 e MHC classe II. Porém, as DCs imaturas possuem alta capacidade para capturar antígenos (fagocitose ou pinocitose) na periferia. Após a captura do antígeno, as DCs migram pelos vasos linfáticos em resposta a vários estímulos quimiotáticos em direção aos linfonodos drenantes ou, via vasos sanguíneos até o baço. Ao chegarem às áreas mais ricas em células T dos linfonodos e do baço, as DCs passam para a sua forma madura. O processo de maturação das DCs envolve um aumento na expressão de MHC classe II e de moléculas co-estimulatórias, uma diminuição na capacidade de captura de antígenos e uma total capacidade de iniciar uma resposta de células T. Então, as DCs maduras passam a ser aptas para ativar células T *naïve* e induzir a resposta imune primária, promovendo, conseqüentemente o estabelecimento da memória imunológica (Banchereau et al., 2000a; Chung, 2004; Elftman et al., 2007; Lange et al., 2007).

Trabalhos têm mostrado que as DCs também estão envolvidas em processos neuroimunes, principalmente em relação à influencia do eixo HPA e, conseqüentemente, dos glicocorticóides nos processos de sua maturação e função. Nestes trabalhos, mostrou-se que as DCs possuem receptores para glicocorticóides que estimulados, em especial pela corticosterona, foram capazes de diminuir a maturação

das DCs, a produção de citocinas e a ativação de células T (Elftman et al., 2007; Truckenmiller et al., 2006).

Também já foi demonstrado que o SNS, principalmente por ação da noradrenalina, produz um efeito adjuvante na ativação de DCs, resultando em um aumento de resposta imune primária e de memória de células T. Ainda neste trabalho, os autores levantaram a hipótese de que os receptores α -adrenérgicos das DCs imaturas tenham um papel relevante na migração dessas células até os linfonodos (Saint-Mezard et al., 2003).

Poucos estudos foram realizados em relação às influências do SNP sobre as DCs; porém, sabe-se que as DCs possuem receptores muscarínicos e nicotínicos e, que podem produzir acetilcolinesterase (Kawashima et al., 2007). Desta forma, pareceu-nos relevante estudar mais profundamente as influências do SNP na função das DCs, o que foi feito através de ferramentas farmacológicas na vigência de um processo inflamatório do tipo antígeno específico produzido por ovalbumina (OVA).

3. OBJETIVOS

Serão apresentados em dois itens: geral e específicos.

3.1. Objetivo geral:

Avaliar os efeitos de manipulações farmacológicas do sistema nervoso autônomo parassimpático, na apresentação de células dendríticas ativadas por OVA.

3.2. Objetivos específicos:

Em animais OVA sensibilizados:

- Avaliar os efeitos de agonistas e antagonistas, nicotínicos e muscarínicos, na fenotipagem de células dendríticas após um desafio com OVA;
- Avaliar os efeitos de agonistas e antagonistas, nicotínicos e muscarínicos, na proliferação de linfócitos estimulados pelas células dendríticas após um desafio com OVA;
- Avaliar os efeitos de agonistas e antagonistas, nicotínicos e muscarínicos, no perfil de citocinas (IFN- γ , IL-12 e IL-4) produzidos no sobrenadante de cultura de células dendríticas após um desafio com OVA;
- Avaliar dos efeitos da Anabasina (agonista nicotínico) na fenotipagem de células dendríticas de linfonodo 7 dias após a imunização;

- Avaliar dos efeitos da Anabasina (agonista nicotínico) na fenotipagem de células dendríticas de linfonodo e baço 24 horas após a imunização;
- Avaliar dos efeitos da Anabasina (agonista nicotínico) na produção de IL-12 intracelular de células dendríticas de baço 7 dias após a imunização;
- Avaliar dos efeitos da Anabasina (agonista nicotínico) na expressão de NF- κ B de células dendríticas de baço 7 dias após a imunização;
- Avaliar dos efeitos da Anabasina (agonista nicotínico) na quantidade de citocinas e quimiocinas no soro dos animais 24 horas e 7 dias após a imunização;
- Avaliar dos efeitos da Anabasina (agonista nicotínico) numa reação de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH);
- Avaliar dos efeitos da Anabasina (agonista nicotínico) na produção de Adrenalina e Noradrenalina;
- Avaliar dos efeitos da Anabasina (agonista nicotínico) na fenotipagem de células dendríticas provenientes de medula óssea;
- Avaliar dos efeitos da Anabasiana (agonista nicotínico) na produção de citocinas (IL-12 e IL-10) por células dendríticas provenientes de medula óssea;
- Avaliar dos efeitos da Anabasiana (agonista nicotínico) na expressão de mRNA para o receptor $\alpha 7$ -nicotínico de células dendríticas provenientes de medula óssea.

5. MATERIAL E MÉTODOS

A maior parte dos experimentos foi realizada no Laboratório de Neuroimunomodulação do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Os experimentos que envolveram o uso de células de medula óssea foram conduzidos nas dependências do Tytgat Institute for Liver and Intestinal Research no Academic Medical Center da Universidade de Amsterdam.

5.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos adultos da linhagem C57BL/6 e camundongos OT-II, com 6 a 10 semanas de idade, provenientes de proles obtidas no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ - USP). Os animais foram utilizados segundo as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório do Comitê de Ética da FMVZ – USP (Protocolo de aprovação – nº1624/2009).

Antes do início dos experimentos, os camundongos foram alojados, por um período de 5 dias, em gaiolas de propileno (28 x 17 x 12cm) em número de 4 animais por gaiola para adaptação às condições do biotério experimental. Estas gaiolas foram devidamente acondicionadas em salas cuja temperatura ambiente (24 a 26°C) e umidade (65 a 70%) foram mantidas por meio de aparelhos de ar condicionado central, com ventilação, exaustão e luminosidade controladas, obedecendo-se a um ciclo claro – escuro de 12 horas, com início da fase clara às 7:00 horas. Os animais foram

alimentados com ração balanceada para roedores NUTRILABOR GUABI®. Ração e água foram fornecidas aos animais *ad libitum* durante todos os experimentos. Os experimentos descritos abaixo foram realizados após um período de adaptação de no mínimo 7 dias.

5.2. Fármacos

- Betanecol: agonista muscarínico
- Atropina: antagonista muscarínico
- Anabasina: agonista nicotínico
- Mecamilamina: antagonista nicotínico
- Epinefrina: agonista adrenérgico

5.3. Formação dos grupos

Para a avaliação da influência do tratamento com fármacos agonistas dos receptores nicotínicos e muscarínicos, os animais foram divididos nos seguintes grupos (n=10):

- **Controle** – salina 0,9%
- **Anabasina** (4 mg/Kg)
- **Betanecol** (20 mg/Kg)
- **Combinação** - Anabasina + Betanecol (nas mesmas doses)

Para a avaliação da influência de fármacos antagonistas dos receptores nicotínicos e muscarínicos, os animais foram divididos nos seguintes grupos (n=10):

- **Controle** – salina 0,9%
- **Mecamilamina** (1 mg/Kg)
- **Atropina** (1 mg/Kg)
- **Combinação** – Mecamilamina + Atropina (nas mesmas doses)

Para a avaliação da influência do tratamento com Anabasina na fenotipagem de células de linfonodo e baço, na produção de IL-12 intracelular, na expressão de NF- κ B de células de baço e para a avaliação do DTH, os animais foram divididos nos seguintes grupos (n=10):

- **Controle** – salina 0,9%
- **Anabasina** (4 mg/Kg)

Todos os fármacos foram administrados 30 minutos antes da sensibilização imunogênica. As doses e os tempos para a elaboração dos experimentos foram escolhidos em função de dados obtidos em literatura (Choi et al., 2007; Fuentes et al., 2008; Giebelen et al., 2007; Martinez-Ferrer et al., 2008).

Para a avaliação *in vitro* da Anabasina sobre as células dendríticas provenientes da medula óssea, foram utilizadas 7 condições (n=8):

- **Controle** – Veículo
- **Epinefrina (10^{-6} M)** – Como controle positivo
- **C1: Anabasina (10^{-4} M)**
- **C2: Anabasina (10^{-5} M)**

- **C3: Anabasina (10^{-6}M)**
- **C4: Anabasina (10^{-7}M)**
- **C5: Anabasina (10^{-8}M)**

Já foi demonstrado que a Epinefrina pode ter efeitos na produção de citocinas pelas células dendríticas (Nijhuis et al., 2010) assim, ela foi utilizada para avaliar se os testes empregados estavam funcionando e para validar os resultados obtidos com o uso da Anabasina.

Para a avaliação da expressão de mRNA para o receptor $\alpha 7$ -nicotínico de células dendríticas provenientes da medula óssea, foram utilizadas 3 condições (n=8):

- **C1: Veículo sem LPS**
- **C2: Veículo + LPS**
- **C3: Anabasina (10^{-4}M) + LPS**

5.4. Sensibilização imunogênica com ovalbumina (OVA)

Para o preparo da solução de OVA, diluiu-se 10 μg de OVA grau V (Sigma) em 1,0ml de PBS. Após isso, retirou-se 200 μl desta solução e misturou-se com 3800 μl de adjuvante completo de Freund (Sigma). Os camundongos foram imunizados no dia 0 com injeção subcutânea com volume total de 100 μl .

Após sete dias os camundongos foram eutanaziados para a coleta de sangue e baço.

5.5. Eutanásia dos animais

Os animais foram eutanasiados após anestesia profunda com xilazina e quetamina na proporção de 1:1 para a coleta do sangue, do baço e dos linfonodos.

5.6. Coleta e cultura das células do baço e linfonodo dos camundongos

Foi utilizado um protocolo (Bjork, 2001) no qual, os baços e os linfonodos inguinais dos animais foram removidos cirurgicamente e mantidos em solução de RPMI estéril e gelado. Estes órgãos foram, então, lavados três vezes em RPMI estéril e macerados. Após este processo, seguiu-se então a lise de eritrócitos do baço, o que foi feito através de uma solução de Cloreto de Amônio (0,16M). Após contagem das células, estas foram ajustadas para serem plaqueadas em 1×10^6 células em triplicata (placas de 24 poços) com 1mg de OVA por um período de 12 horas em estufa (37° , 5% CO_2) para a imunofenotipagem das células dendríticas e coleta de sobrenadante para a análise de citocinas. Também foram realizados experimentos utilizando-se como estímulo 100 μg de OVA mais 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LPS. Os resultados obtidos foram semelhantes aos obtidos com o uso de 1mg de OVA (dados não mostrados).

5.7. Coleta e cultura de células dendríticas provenientes de medula óssea

Para a produção de células dendríticas a partir de células de medula óssea coletasse os 2 fêmures e as 2 tíbias dos camundongos. Após uma rápida lavagem dos ossos com álcool 70% e PBS dentro de um fluxo laminar, cortou-se as epífises e utilizando-se

de uma seringa com agulha injetou-se 5 ml de RPMI para extrair a medula óssea. A medula foi filtrada em filtro de nylon de 40µm (Cell Strainer, BD). Após este processo, contaram-se as células. As células foram, então, plaqueadas em placas plásticas de Petry na concentração de 5×10^6 células em 10 ml de RPMI com 10% de soro fetal bovino e 2µl/ml de GM-CSF (20ng/ml). Após 3 dias de cultura, acrescentou-se mais 10 ml de RPMI com 10% de soro fetal bovino e 1µl/ml de GM-CSF (10ng/ml) em cada placa. No sexto dia de cultura o meio foi substituído por 10 ml de RPMI com 10% de soro fetal bovino e 1µl/ml de GM-CSF (10ng/ml) em cada placa. Após 24 horas obtiveram-se as células dendríticas imaturas.

Para torná-las maduras, as células foram plaqueadas com 1µl/ml de LPS (1µg/ml) em placas de 24 poços.

5.8. Análise fenotípica em citômetro de fluxo

As células foram lavadas (290g, 10 min) e ressuspensas em 100µl de PBS em tubos de citometria. Após este processo foram adicionados os marcadores específicos.

Após incubação por 60 minutos à temperatura ambiente e no escuro, as células foram lavadas duas vezes em PBS (100 µl/tubo) e ressuspensas em 150 µL de PBS. A seguir, as amostras foram submetidas a uma leitura em citômetro de fluxo, analisando-se 5.000 eventos do gate (**figura 2**). Para a aquisição dos resultados foi utilizado o “software” CellQuest Pro (BD). Para a análise dos resultados foi utilizado o “software” FlowJo (Tree Star).

Figura 2 – Dot plot ilustrando a população de células dendríticas do baço no gate para a análise.

A imunofenotipagem das células isoladas do baço (item 5.5) foi realizada analisando-se a frequência e a intensidade de fluorescência dos marcadores CD80-PE, CD86-FITC, I-A^b-PE e CD11c-FITC (**figura 3**).

Figura 3 – Dot plots (FL-1 x FL-2) ilustrando as marcações de superfície de células dendríticas no baço.

5.9. Ensaio de proliferação linfocitária

Após a lise de eritrócitos e contagem das células, estas foram coradas com CFSE (5mM, Molecular Probes) durante 20 minutos e em temperatura ambiente. Após incubação, as células foram lavadas com RPMI (suplementado com HEPES 10mM, NaHCO₃ 24mM, 10U/ml de penicilina, 10µg/ml de estreptomicina e 0,5µg/ml de anfotericina B) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (400g por 8 minutos a 20° C) e quantificadas. Após contagem e avaliação da viabilidade com Azul de Tripán, as células foram ajustadas para uma concentração de 5×10^5 células/ml em meio RPMI 10% SFB. 5×10^5 células/poço foram plaqueadas em triplicata (placas de 96 poços) com 1mg de OVA.

As células foram, então, incubadas por sete dias em estufa de cultura de células, a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, as células foram coletadas, lavadas e analisadas quanto à perda de fluorescência em citômetro de fluxo. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Para a análise dos dados de proliferação, foi criado um índice de proliferação (IP), calculado da seguinte maneira: média geométrica das células sem estímulo / média geométrica das células receberam o estímulo.

Este índice permite mensurar a queda na intensidade de fluorescência das células marcadas, que foi tanto maior, quanto maior foi o número de divisões. Na **figura 4** podemos observar os dot plots utilizados para a leitura e proliferação linfocitária.

Figura 4 – Dot Plots utilizados para análise de proliferação linfocitária: A) Doto plot ilustrando a população de interesse; B) linfócitos não estimulados; C) linfócitos estimulados.

5.10. Análise do perfil de citocinas

O sobrenadante das culturas estabelecidas no item 5.6 foi coletado e armazenado para posterior quantificação das seguintes citocinas:

- perfil Th1: IFN γ e IL-12
- perfil Th2: IL-4

O sobrenadante das culturas estabelecidas no item 5.7 foi coletado e armazenado para posterior quantificação das seguintes citocinas: IL-12 e IL-10.

As dosagens de citocinas foram realizadas por ELISA, utilizando-se os kits ELISAMax (BioLegend). Neste método, em placas de 96 poços foram colocados 100 μ L de anticorpo de captura diluído em tampão PBS por poço, sendo incubado por uma noite. Após 3 lavagens com 400 μ L/poço de tampão de lavagem para ELISA, os anticorpos das placas foram bloqueados com 300 μ L/poço de tampão de bloqueio por 2 horas a temperatura ambiente. Após 3 lavagens das placas, acrescentaram-se as amostras e estas foram incubadas por um período de 2 horas em temperatura ambiente. Para fazer a curva padrão da citocina, foram incubadas duplicatas de 50 μ L/poço das

diluições seriadas das citocinas recombinantes, também por 2 horas, conforme recomendações do fabricante. Após três lavagens foram adicionados 50 µL/poço do anticorpo de detecção, com incubação por 2 horas à temperatura ambiente. Novamente, a placa foi lavada três vezes. Após esta lavagem, foi adicionada 50 µL/poço de estreptoavidina seguindo-se por incubação por 20 min, no escuro e em temperatura ambiente. Por fim, 50 µL/poço de H₂SO₄ (2N) foram adicionados para interromper a reação e a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro com filtro de 450 nm.

5.11. Determinação da produção de IL-12 intracelular por células dendríticas do baço

Após a coleta das células do baço e posterior lise das hemácias, as células foram contadas e ajustadas em tubos de citometria em 1×10^6 células. As amostras foram incubadas com 7-AAD-PerCP (para avaliação de viabilidade celular) e com os anticorpos anti-CD11c-FITC e anti- I-A^b-PE (para marcação de superfície) por 30 minutos. Após o período de incubação as amostras foram estimuladas com 1mg de OVA por 6 horas em estufa a 37°C a 5% CO₂. Após esta incubação, as células foram fixadas, permeabilizadas e incubadas com anticorpo anti-IL-12-APC por 30 minutos no escuro para marcação intracelular da citocina IL-12. Por fim, as células foram lavadas e submetidas a centrifugação, sendo ressuspendidas para leitura no citômetro de fluxo para determinação da intensidade de fluorescência de APC (detector FL4). Para a aquisição dos resultados foi utilizado o “software” CellQuest Pro (BD). Para a análise dos resultados foi utilizado o “software” FlowJo (Tree Star).

5.12. Determinação da expressão de NFκB de células dendríticas do baço

Após a coleta das células do baço e posterior lise das hemácias, as células foram contadas e ajustadas em tubos de citometria em 1×10^6 células. As amostras foram incubadas 7-AAD-PerCP (para avaliação de viabilidade celular) e com anticorpo anti-CD11c-FITC (para marcação de superfície) por 30 minutos, como ilustram as **figuras 5 B e C**. Após o período de incubação as amostras foram estimuladas com 1mg de OVA por 15 min em estufa a 37°C a 5% CO₂. Após a marcação da membrana as células foram fixadas, permeabilizadas e incubadas com anticorpo anti-NFκB p65-PE por 30 minutos no escuro para marcação intracelular do fator de transcrição NFκB p65 fosforilado, como ilustrado nas **figuras 5 C e D**. Por fim, as células foram lavadas e submetidas a centrifugação e ressuspensas para leitura no citômetro de fluxo, para determinação da intensidade de fluorescência de PE (detector FL2). Para a aquisição dos resultados foi utilizado o “software” CellQuest Pro (BD). Para a análise dos resultados foi utilizado o “software” FlowJo (Tree Star).

Figura 5 – (A) Citograma representando o *gate* na população de células analisadas. (B) Histograma representando a viabilidade celular utilizando 7-AAD-PerCP. (C) Citograma representando a população de células que expressam CD-11c-FITC e que expressam NFκB p65-PE (Q2). (D) Histograma representando a intensidade de fluorescência produzida pela marcação de NFκB p65-PE.

5.13. Dosagem de citocinas e quimiocinas

Os animais foram eutanaziados e o sangue foi coletado em tubos *ependorfs* de 1,5 mL. O sangue foi centrifugado a 1000g por 20 minutos e o soro coletado e armazenado em freezer -80°C até o momento das análises. A dosagem de citocinas e quimiocinas foi realizada utilizando-se CBA *mouse inflammation kit* que é utilizado para medir quantitativamente TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-12 p70, IL-10 e MCP-1 em uma

única amostra de plasma ou sobrenadante de cultura. O CBA pode ser comparado ao método de ELISA sanduíche; o protocolo de análise foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. De forma resumida, os *nanobeads* de captura, de detecção e as citocinas recombinantes da curva padrão específicas para cada citocina foram diluídas nas concentrações recomendadas. Cada *nanobead* está ligado a anticorpos específicos para a citocina/quimiocina a ser quantificada e apresenta tamanhos diferentes, o que permite a diferenciação de cada citocina, em diferentes picos de intensidade de fluorescência, como demonstrado na **figura 6**.

Os reagentes foram adicionados aos tubos de citometria relativos aos padrões e as amostras na seguinte ordem: suspensão de *nanobeads* de captura (50µL), padrões nas diferentes diluições e amostras (50µL) e os *nanobeads* de detecção (50µL); essa mistura ficou sob incubação por 2 horas em temperatura ambiente no escuro. Após o período de incubação os tubos contendo os padrões e as amostras foram centrifugados a 250 x g por 5 minutos sendo estes, lavados, centrifugados novamente e ressuspensos para leitura no citômetro de fluxo, e determinação da intensidade de fluorescência de PE (detector FL3).

Figura 6 – (A) Citograma que ilustra as populações de *nanobeads* da curva padrão para as diferentes citocinas na concentração de 625 pg/mL. (B) Histograma que ilustra os picos de intensidade de fluorescência para os diferentes populações de *nanobeads*. Figura adaptada do manual do usuário do CBA mouse inflammation kit – BD Biosciences.

O **quadro 1** mostra os limites de detecção em pg/mL.

Citocina	Limite de detecção (pg/ml)
IL-2	0.1
IL-4	0.03
IL-6	1.4
IFN- γ	0.5
TNF	0.9
IL-17	0.8
IL-10	16.8

5.14. Estabelecimento de hipersensibilidade do tipo tardia

Os animais foram inoculados subcutaneamente com 50 μ g de OVA (albumina de ovo – Sigma®, St Louis, MO, USA) emulsificada em 0,1mL de adjuvante completo de Freund (Sigma®, St Louis, MO, USA). Decorridos sete dias da data de sensibilização com OVA, os animais foram desafiados também s.c. no coxim plantar com uma solução a 4% de OVA agregada. O crescimento na espessura da pata foi medido utilizando-se um paquímetro digital em momentos estipulados (1h, 4h, 6h, 12h, 24h e 48h), para verificação do processo inflamatório inicial e do estabelecimento de uma hipersensibilidade do tipo tardia. Para avaliar o crescimento da pata, os dados de cada momento foram subtraídos do valor inicial de cada coxim plantar. Ao final das 48 horas, os animais foram submetidos à eutanásia e suas patas foram coletadas para posterior análise histopatológica.

5.15. Dosagem de Adrenalina e Noradrenalina sérica por ELISA

A quantificação de adrenalina e noradrenalina sérica foi realizada com o kit 2-CAT (A-N) Research ELISA (Labor Diagnostika Nord) e os procedimentos foram realizados conforme as instruções do fabricante. O teste baseia-se em três etapas: a extração, a conversão enzimática e o ELISA. A primeira etapa do teste é a da extração. Para isso, foi utilizado 25µL de amostra que foram pipetadas numa placa de extração. Nesta placa também foram pipetados os padrões. Depois, deve-se completar para 100µL com água destilada. Após isso, deve-se pipetar 25µL de TE Buffer e deixar a placa selada, no escuro e em agitação por 60 minutos. Após esse período de incubação, deve-se esvaziar a placa e lavar duas vezes com um tampão para lavagem. Após a lavagem, deve-se acrescentar o tampão de acetilação e o reagente de acetilação. Após 20 minutos de incubação, deve-se lavar novamente a placa. Depois, deve-se pipetar Ácido clorídrico e incubar por mais 10 minutos. Apenas 140µL desse sobrenadante é utilizado para a etapa de conversão enzimática. Então, acrescentou-se 140µL do sobrenadante na placa de conversão com mais 50µL de solução de enzima e incubou por 2 horas. Tanto para adrenalina quanto para noradrenalina foram utilizados 90 µL do sobrenadante da conversão enzimática para fazer o ELISA que teve sua leitura realizada em 450nm. o limite de detecção para a Adrenalina foi de 0.2ng/ml e para Noradrenalina foi de 0.08ng/ml.

5.16. Análise da expressão do gene *mNACHRa7* proveniente de células dendríticas de medula óssea por PCR convencional

Realizou-se, primeiramente a coleta das células dendríticas da medula óssea que estavam em cultura como descrito no item 5.7; deste material foi realizada a extração de RNA total pelo método do TRIZOL[®], seguindo-se as instruções do fabricante (Invitrogen[®]). Posteriormente, foi feita a quantificação do RNA total presente na amostra em Nanodrop (Thermo Scientific).

Para a obtenção do DNA correspondente (cDNA) ao RNAm presente nas amostras de células dendríticas, foi empregado o ensaio de transcrição reversa (RT) com 2µg de RNA, utilizando-se Oligo DT[®] e a enzima Superscript II[®] (Invitrogen[®]), conforme instruções do fabricante.

Realizada a transcrição reversa (RT), efetuou-se o PCR convencional. Os “primers” específicos para os genes *mNACHRa7* e *beta2-m* (β 2-microglobulina – B2m) foram confeccionados pela empresa Applied Biosystems[®], tendo como base as seqüências depositadas no banco público do NIH (<http://mouseprimerdepot.nci.nih.gov>).

5.17. Análise estatística

Os dados foram avaliados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se as amostras apresentavam uma distribuição normal e pelo teste de Bartlett para determinação da homogeneidade das variâncias. Os dados paramétricos foram analisados através de uma análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste

de Tukey-Kramer de comparações múltiplas. Os resultados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. No experimento onde se avaliou a produção de citocinas após diferentes concentrações da Anabasina *in vitro*, foi utilizado o teste de Dunnett para comparar as diferentes concentrações empregadas com o controle. Para a análise do DTH foi utilizada ANOVA de 2 vias seguida do Teste de Tukey-Kramer de Comparações Múltiplas para analisar os fatores determinantes dos resultados e as possíveis interações dos tratamentos. Foram considerados significantes resultados onde o nível de significância foi menor ou igual a 5%.

Todas as análises estatísticas foram feitas com o auxílio de programa estatístico denominado GraphPad InStat.

6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

6.1. Experimento 1 - Avaliação do efeito de um agonista nicotínico e muscarínico e de sua combinação, na fenotipagem de células dendríticas

Os animais foram divididos em grupos (n=10), conforme mostrado no item 5.3, tendo recebido os respectivos fármacos 30 minutos antes da administração subcutânea da OVA, conforme descrito no item 5.4. No dia 7 seguiu-se a coleta dos baços e a cultura dos esplenócitos para a posterior fenotipagem das células dendríticas, conforme descrito nos itens 5.6 e 5.8.

RESULTADO

A **tabela 1** mostra e a **figura 7** ilustra a porcentagem de células que apresentaram os fenótipos analisados. A análise estatística mostrou que, em relação à marcação CD11c⁺IAb⁺ não houve diferença significativa entre as porcentagens de células dos grupos analisados. Em relação à marcação CD80⁺CD86⁺, a análise estatística mostrou uma maior porcentagem desta população de células no grupo Anabasina (p<0,05) e da combinação de agonistas (p<0,01) em relação ao grupo Salina. Ainda em relação a esta análise, observamos uma diminuição da porcentagem de células do grupo Betanecol em relação ao grupo Anabasina (p<0,05) e em relação ao grupo que recebeu a combinação das drogas (p<0,01). Não se observaram diferenças estatísticas entre os grupos Salina x Betanecol e também entre os grupos Anabasina x Combinação (teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas).

Tabela 18 – Porcentagem de células dendríticas de camundongos que receberam agonistas nicotínicos e muscarínicos e sua combinação. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.

Fenótipo	Salina	Anabasina	Betanecol	Combinação
CD11c⁺IA^{b+}	29,21 $\pm$ 2,4	31,93 $\pm$ 1,8	30,62 $\pm$ 2,9	28,89 $\pm$ 2,3
CD80⁺CD86⁺	20,73 $\pm$ 3,5	27,26 $\pm$ 4,8 ^a	20,94 $\pm$ 5,7 ^b	29,66 $\pm$ 2,0 ^c

^a p<0,05 em relação ao grupo salina; ^b p<0,05 em relação ao grupo anabasina; ^c p<0,01 em relação aos grupos salina e betanecol. Teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas

Figura 7 - Porcentagem de células CD80⁺CD86⁺ de camundongos que receberam agonistas nicotínicos e muscarínicos ou sua combinação. ^a p<0,05 em relação ao grupo salina; ^b p<0,05 em relação ao grupo anabasina; ^c p<0,01 em relação aos grupos salina e betanecol, teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, n=10 animais/grupo.

A **tabela 2** mostra e as **figuras 8 e 9** ilustram os resultados referentes à análise da expressão dos diferentes marcadores de superfície utilizados na fenotipagem das células dendríticas. A análise estatística mostrou uma diminuição na expressão de IA^b (referente ao MHC classe II) e de CD11c no grupo Betanecol em relação ao grupo Anabasina (p<0,05), e um aumento na expressão de CD11c no grupo que recebeu a

combinação das drogas em relação a todos os outros grupos ($p < 0,001$). Em relação aos marcadores CD80 e CD86, não houve diferença de expressão entre os grupos analisados (teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas).

Tabela 19 – Análise da expressão dos diferentes marcadores de superfície utilizados na fenotipagem das células dendríticas de camundongos que receberam agonistas nicotínicos e muscarínicos e sua combinação. Os dados referem-se à unidade de fluorescência e representam a média $\pm$ desvio padrão.

Marcador	Salina	Anabasina	Betanecol	Combinação
IA ^b	363,04 $\pm$ 69,6	421,92 $\pm$ 32,5	333,72 $\pm$ 42,5 ^a	377,13 $\pm$ 69,89
CD11c	70,28 $\pm$ 2,6	72,08 $\pm$ 2,9	66,27 $\pm$ 3,9 ^a	81,95 $\pm$ 4,7 ^b
CD80	80,34 $\pm$ 7,2	72,64 $\pm$ 5,6	75,13 $\pm$ 8,7	76,15 $\pm$ 6,6
CD86	53,50 $\pm$ 6,9	48,82 $\pm$ 7,9	50,08 $\pm$ 5,8	47,40 $\pm$ 4,1

^a $p < 0,05$ em relação ao grupo anabasina; ^b $p < 0,001$ em relação aos grupos salina, anabasina e betanecol. Teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas

Figura 8 - Expressão do marcador de MHC classe II (IA^{b+}) nas células dendríticas de camundongos que receberam agonistas nicotínicos e muscarínicos e sua combinação. ^a $p < 0,05$ em relação ao grupo anabasina, teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, $n = 10$ animais/grupo.

Figura 9 - Expressão do marcador CD11c nas células dendríticas de camundongos que receberam agonistas nicotínicos e muscarínicos e sua combinação. ^a $p < 0,05$ em relação ao grupo anabasina; ^b $p < 0,001$ em relação aos grupos salina, anabasina e betanecol, teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, $n=10$ animais/grupo.

6.2. Experimento 2 - Avaliação do efeito de um agonista nicotínico e muscarínico e de sua combinação, na proliferação de linfócitos estimulados pelas células dendríticas na presença de OVA.

Os animais foram divididos em grupos ($n=10$), conforme mostrado no item 5.3 e receberam os respectivos fármacos 30 minutos antes da administração subcutânea da OVA, conforme descrito no item 5.4. No dia 7 seguiu-se a coleta dos baços e a cultura dos esplenócitos para a avaliação da proliferação linfocitária, conforme descrito nos itens 5.6 e 5.9.

RESULTADOS

A **tabela 3** mostra a análise do índice de proliferação de linfócitos estimulados pelas células dendríticas na presença de OVA. A análise estatística dos dados mostrou ausência de diferenças significantes entre os grupos avaliados (teste de Kruskal-Wallis).

Tabela 3 – Índice de proliferação de linfócitos estimulados pelas células dendríticas na presença de OVA. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.

Grupos	Índice de proliferação
Salina	9,22 $\pm$ 4,2
Anabasina	7,47 $\pm$ 1,6
Betanecol	8,10 $\pm$ 1,5
Combinação	8,00 $\pm$ 1,0

Teste de Kruskal-Wallis, n=10 animais/grupo.

6.3. Experimento 3 - Avaliação do efeito de um agonista nicotínico e muscarínico e de sua combinação, no perfil de citocinas Th1 (IFN γ e IL-12) e Th2 (IL-4).

Os animais foram divididos em grupos (n=10), conforme mostrado no item 5.3, tendo recebido os respectivos fármacos 30 minutos antes da administração subcutânea da OVA, conforme descrito no item 5.4. No dia 7 seguiu-se a coleta dos baços e a cultura dos esplenócitos para a posterior avaliação do perfil de citocinas no sobrenadante de cultura, conforme descrito nos itens 5.6 e 5.10.

RESULTADOS

A **tabela 4** mostra e a **figura 10** ilustra a avaliação do perfil de citocinas Th1 (IFN γ e IL-12) e Th2 (IL-4) produzidos pelas células dendríticas no sobrenadante de cultura. A análise estatística revelou uma diminuição nos níveis de IL-12 no grupo Anabasina em relação ao grupo Salina ($p < 0,01$); mostrou, ainda que o grupo Betanecol apresentou um nível de IL-12 maior que o grupo Anabasina ($p < 0,05$), porém os dados dos grupos Salina e Betanecol não diferiram estatisticamente entre si. Em relação aos

níveis de IFN- γ não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas). Já a quantificação de IL-4 apontou níveis não detectáveis em todos os grupos.

Tabela 4 – Perfil de citocinas Th1(IFN γ e IL-12) e Th2 (IL-4) produzidos pelas células dendríticas na presença de OVA no sobrenadante de cultura. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.

Citocina	Salina	Anabasina	Betanecol	Combinação
IL-12	74,65 $\pm$ 14,1	51,53 $\pm$ 7,5 ^a	69,49 $\pm$ 14,5 ^b	60,02 $\pm$ 9,3
IFNγ	64,68 $\pm$ 21,4	53,21 $\pm$ 26,1	40,10 $\pm$ 12,0	37,45 $\pm$ 19,1
IL-4	ND	ND	ND	ND

ND: níveis não detectáveis. ^a p<0,01 em relação ao grupo salina; ^b p<0,05 em relação ao grupo anabasina. Teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas.

Figura 10 – Níveis de IL-12 produzidos pelas células dendríticas na presença de OVA no sobrenadante de cultura de camundongos que receberam agonistas nicotínicos e muscarínicos e sua combinação. ^a p<0,01 em relação ao grupo salina; ^b p<0,05 em relação ao grupo anabasina, teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, n=10 animais/grupo.

6.4. Experimento 4 - Avaliação do efeito de um antagonista nicotínico e muscarínico e de sua combinação, na fenotipagem de células dendríticas.

Os animais foram divididos em grupos (n=10), conforme mostrado no item 5.3, tendo recebido os respectivos fármacos 30 minutos antes da administração subcutânea da OVA, conforme descrito no item 5.4. No dia 7 seguiu-se a coleta dos baços e a cultura dos esplenócitos para a posterior fenotipagem das células dendríticas, conforme descrito nos itens 5.6 e 5.8.

RESULTADOS

As **tabelas 5 e 6** mostram e a **figura 11** ilustra a porcentagem de células que apresentaram os fenótipos analisados e a expressão dos marcadores. A análise estatística mostrou que em relação à marcação CD80⁺CD86⁺ não houve diferença significativa entre as porcentagens de células e nem da expressão desses marcadores entre os grupos analisados (teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas). Em relação à marcação CD11c⁺IAb⁺, a análise estatística mostrou que os grupos Mecamilamina e Combinação apresentaram uma menor porcentagem do fenótipo CD11c⁺IA^{b+} em relação ao grupo Atropina (p< 0,01 e p<0,05, respectivamente) (teste de Kruskal-Wallis). Já em relação à expressão dos seus marcadores, não se observaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos analisados (teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas).

Tabela 5 – Porcentagem de células dendríticas de camundongos que receberam antagonistas nicotínicos e muscarínicos e sua combinação. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.

Fenótipo	Salina	Atropina	Mecamilamina	Combinação
CD11c⁺IA^{b+}	22,32 $\pm$ 1,6	24,23 $\pm$ 3,5	20,10 $\pm$ 2,0 ^a	20,33 $\pm$ 1,4 ^b
CD80⁺CD86⁺	70,99 $\pm$ 2,8	72,01 $\pm$ 2,4	69,87 $\pm$ 3,1	69,88 $\pm$ 2,6

^a p<0,01 em relação ao grupo atropina; ^b p<0,05 em relação ao grupo atropina.

Figura 11 - Porcentagem de células CD11c⁺IA^{b+} de camundongos que receberam antagonistas nicotínicos e muscarínicos ou sua combinação. ^a p<0,01 em relação ao grupo atropina; ^b p<0,05 em relação ao grupo atropina, teste de Kruskal-Wallis, n=10 animais/grupo.

Tabela 6 – Análise da expressão dos diferentes marcadores de superfície utilizados na fenotipagem das células dendríticas de camundongos que receberam antagonistas nicotínicos e muscarínicos e sua combinação. Os dados referem-se à unidade de fluorescência e representam a média $\pm$ desvio padrão.

Marcador	Salina	Atropina	Mecamilamina	Combinação
IAb	96,87 $\pm$ 13,1	112,93 $\pm$ 23,6	106,74 $\pm$ 11,0	106,60 $\pm$ 16,3
CD11c	15,61 $\pm$ 0,9	15,96 $\pm$ 1,1	15,74 $\pm$ 1,3	15,49 $\pm$ 0,9
CD80	79,92 $\pm$ 9,3	76,43 $\pm$ 8,3	74,53 $\pm$ 7,4	72,94 $\pm$ 8,9
CD86	52,85 $\pm$ 3,2	51,46 $\pm$ 5,6	55,36 $\pm$ 4,2	50,41 $\pm$ 4,7

Teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, n=10 animais/grupo.

6.5. Experimento 5 - Avaliação do efeito de um antagonista nicotínico e muscarínico e de sua combinação, na proliferação de linfócitos estimulados pelas células dendríticas.

Os animais foram divididos em grupos (n=10), conforme mostrado no item 5.3, tendo recebido os respectivos fármacos 30 minutos antes da administração subcutânea da OVA, conforme descrito no item 5.4. No dia 7 seguiu-se a coleta dos baços e a cultura dos esplenócitos para a avaliação da proliferação linfocitária, conforme descrito nos itens 5.6 e 5.9.

RESULTADOS

A **tabela 7** mostra dados de análise do índice de proliferação de linfócitos estimulados pelas células dendríticas na presença de OVA. A análise estatística desses dados não revelou diferenças estatísticas significantes entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis).

Tabela 7 – Índice de proliferação de linfócitos estimulados pelas células dendríticas na presença de OVA. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.

Grupos	Índice de proliferação
Salina	1,05 $\pm$ 0,2
Atropina	1,07 $\pm$ 0,1
Mecamilamina	1,06 $\pm$ 0,2
Combinação	1,08 $\pm$ 0,1

Teste de Kruskal-Wallis, n=10 animais/grupo.

6.6. Experimento 6 - Avaliação do efeito de um antagonista nicotínico e muscarínico e de sua combinação, no perfil de citocinas Th1 (IFN γ e IL-12) e Th2 (IL-4) produzidos pelas células dendríticas.

Os animais foram divididos em grupos (n=10), conforme mostrado no item 5.3 tendo recebido os respectivos fármacos 30 minutos antes da administração subcutânea da OVA, conforme descrito no item 5.4. No dia 7 seguiu-se a coleta dos baços e a cultura dos esplenócitos para a posterior avaliação do perfil de citocinas no sobrenadante de cultura, conforme descrito nos itens 5.6 e 5.10.

RESULTADOS

A **tabela 8** mostra a avaliação do perfil de citocinas Th1 (IFN γ e IL-12) e Th2 (IL-4) produzidos pelas células dendríticas no sobrenadante de cultura. As quantificações de IFN γ e IL-4 apontaram níveis não detectáveis dessas citocinas em todos os grupos. Já em relação à dosagem de IL-12, foi possível a sua quantificação, porém não se observaram diferenças significantes entre os dados dos grupos analisados (teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas).

Tabela 8 – Perfil de citocinas Th1(IFN γ e IL-12) e Th2 (IL-4) produzidos pelas células dendríticas na presença de OVA no sobrenadante de cultura. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.

Citocina	Salina	Atropina	Mecamilamina	Combinação
IL-12	99,80 $\pm$ 17,3	111,25 $\pm$ 38,5	119,52 $\pm$ 27,5	121,74 $\pm$ 38,0
IFNγ	ND	ND	ND	ND
IL-4	ND	ND	ND	ND

ND: níveis não detectáveis. Teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas.

6.7. Experimento 7 - Avaliação dos efeitos da Anabasina (agonista nicotínico) na fenotipagem de células dendríticas de linfonodo 7 dias após a imunização com OVA.

Os animais foram divididos em grupos (n=10), conforme mostrado no item 5.3, tendo recebido a Anabasina 30 minutos antes da administração subcutânea da OVA, conforme descrito no item 5.4. Após 7 dias, seguiu-se a coleta dos linfonodos inguinais e a cultura de suas respectivas células para a posterior fenotipagem das células dendríticas, conforme descrito nos itens 5.6 e 5.8.

RESULTADO

A **tabela 9** mostra a porcentagem de células que apresentaram os fenótipos analisados. A análise estatística revelou que a Anabasina foi incapaz de alterar significativamente as porcentagens de células ($CD11c^{+}IAb^{+}$ e $CD80^{+}CD86^{+}$) em relação aos dados do grupo controle (Teste t de Student, $p < 0,05$).

Tabela 9 – Porcentagem de células dendríticas de linfonodo de camundongos 7 dias após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.

Fenótipo	Salina	Anabasina
$CD11c^{+}IAb^{+}$	$30,73 \pm 8,2$	$31,56 \pm 4,8$
$CD80^{+}CD86^{+}$	$72,47 \pm 5,9$	$72,35 \pm 3,3$

Teste t de Student , n=10 animais/grupo.

A **tabela 10** mostra e as **figuras 12 e 13** ilustram os resultados referentes a análise da expressão dos diferentes marcadores de superfície utilizados na fenotipagem

das células dendríticas. A análise estatística mostrou que a Anabasina diminuiu a expressão de CD80 e de CD86 ($p < 0,05$). Porém, em relação à expressão de IAb (marcador para MHC classe II), não se observaram diferenças entre os grupos analisados ($p > 0,05$, Teste t de Student).

Tabela 10 – Análise da expressão dos diferentes marcadores de superfície utilizados na fenotipagem das células dendríticas de linfonodo de camundongos 7 dias após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. Os dados referem-se à unidade de fluorescência e representam a média $\pm$ desvio padrão.

Marcador	Salina	Anabasina
IAb	673,25 $\pm$ 183,4	701,17 $\pm$ 246,8
CD80	379,17 $\pm$ 62,3	326,00 $\pm$ 36,9 *
CD86	481,50 $\pm$ 129,3	335,38 $\pm$ 55,6 *

* $p < 0,05$ em relação ao grupo anabasina. Teste t de Student.

Figura 12 - Expressão do marcador CD80 nas células dendríticas de linfonodo de camundongos 7 dias após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, Teste t de Student, $n = 10$ animais/grupo.

Figura 13 - Expressão do marcador CD86 nas células dendríticas de linfonodo de camundongos 7 dias após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, Teste t de Student, $n = 10$ animais/grupo.

6.8. Experimento 8 - Avaliação dos efeitos da Anabasina (agonista nicotínico) na fenotipagem de células dendríticas de baço 24 horas após a imunização com OVA.

Os animais foram divididos em grupos ($n = 10$), conforme mostrado no item 5.3, tendo recebido a Anabasina 30 minutos antes da administração subcutânea da OVA, conforme descrito no item 5.4. Após 24 horas, seguiu-se a coleta dos baços e a cultura de suas respectivas células para a posterior fenotipagem das células dendríticas, conforme descrito nos itens 5.6 e 5.8.

RESULTADO

A **tabela 11** mostra a porcentagem de células que apresentaram os fenótipos analisados. A análise estatística mostrou que a Anabasina não foi capaz de alterar

significativamente as porcentagens de células ($CD11c^{+}IAb^{+}$ e $CD80^{+}CD86^{+}$) em relação às medidas no grupo controle (Teste t de Student, $p>0,05$).

Tabela 11 – Porcentagem de células dendríticas de baço de camundongos 24 horas após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.

Fenótipo	Salina	Anabasina
$CD11c^{+}IAb^{+}$	$11,47 \pm 1,2$	$11,40 \pm 1,4$
$CD80^{+}CD86^{+}$	$31,27 \pm 4,5$	$33,31 \pm 2,9$

Teste t de Student , n=10 animais/grupo.

A **tabela 12** mostra e as **figuras 14 a 16** ilustram os resultados referentes a análise da expressão dos diferentes marcadores de superfície utilizados na fenotipagem das células dendríticas. A análise estatística mostrou que a Anabasina diminuiu a expressão de IAb ($p<0,05$). Porém, em relação à expressão CD80 e de CD86 a Anabasina produziu um efeito contrário, ou seja, ela aumentou a expressão desses marcadores analisados ($p<0,05$; Teste t de Student).

Tabela 12 – Análise da expressão dos diferentes marcadores de superfície utilizados na fenotipagem das células dendríticas de baço de camundongos 24 horas após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. Os dados referem-se à unidade de fluorescência e representam a média $\pm$ desvio padrão.

Marcador	Salina	Anabasina
IAb	$136,20 \pm 11,9$	$117,5 \pm 8,5 *$
CD80	$90,30 \pm 9,0$	$101,59 \pm 8,7 *$
CD86	$75,13 \pm 5,1$	$83,60 \pm 8,3 *$

* $p<0,05$ em relação ao grupo controle, Teste t de Student, n=10 animais/grupo.

Figura 14 - Expressão do marcador IAb nas células dendríticas de baço de camundongos 24 horas após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, Teste t de Student, $n=10$ animais/grupo.

Figura 15 - Expressão do marcador CD80 nas células dendríticas de baço de camundongos 24 horas após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, Teste t de Student, $n=10$ animais/grupo.

Figura 16 - Expressão do marcador CD86 nas células dendríticas de baço de camundongos 24 horas após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, Teste t de Student, $n=10$ animais/grupo.

6.9. Experimento 9 - Avaliação dos efeitos da Anabasina (agonista nicotínico) na produção de IL-12 intracelular de células dendríticas de baço 7 dias após a imunização com OVA.

Os animais foram divididos em grupos ($n=10$), conforme mostrado no item 5.3, tendo recebido a Anabasina 30 minutos antes da administração subcutânea da OVA, conforme descrito no item 5.4. Após 7 dias, seguiu-se a coleta dos baços e a cultura de suas respectivas células para a posterior avaliação da produção de IL-12 intracelular das células dendríticas, conforme descrito nos itens 5.6 e 5.11.

RESULTADO

A **tabela 13** mostra e a **figura 17** ilustra a intensidade de fluorescência relativa à produção de IL-12 intracelular em células dendríticas CD11c⁺. A Análise estatística

mostrou que o tratamento com a Anabasina diminuiu a produção de IL-12 intracelular quando comparado ao grupo salina (Teste t de Student, $p < 0,05$).

Tabela 13 – Intensidade de fluorescência relativa a produção de IL-12 intracelular das células dendríticas CD11c⁺ de baço de camundongos 7 dias após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.

Tratamento	IL-12 intracelular
Salina	$37,26 \pm 4,3$
Anabasina	$33,89 \pm 3,3^*$

Teste t de Student, n=10 animais/grupo.

Figura 17 - Intensidade de fluorescência relativa a produção de IL-12 intracelular das células dendríticas CD11c⁺ de baço de camundongos 7 dias após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, Teste t de Student, n=10 animais/grupo.

6.10. Experimento 10 - Avaliação dos efeitos da Anabasina (agonista nicotínico) na expressão de NF- κ B de células dendríticas de baço 7 dias após a imunização com OVA.

Os animais foram divididos em grupos (n=10), conforme mostrado no item 5.3, tendo recebido a Anabasina 30 minutos antes da administração subcutânea da OVA,

conforme descrito no item 5.4. Após 24 horas, seguiu-se a coleta dos baços e a cultura de suas respectivas células para a posterior avaliação da expressão de NF- κ B das células dendríticas, conforme descrito nos itens 5.6 e 5.12.

RESULTADO

A **tabela 14** mostra a **figura 18** ilustra a intensidade de fluorescência relativa a expressão da ativação do NF- κ B de células dendríticas CD11c⁺. A análise estatística mostrou que a Anabasina produziu um aumento de ativação de NF- κ B em relação ao grupo controle (Teste t de Student, $p < 0,05$).

Tabela 14 – Intensidade de fluorescência relativa a expressão da ativação do NF- κ B de células dendríticas CD11c⁺ de baço de camundongos 7 dias após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.

Tratamento	Expressão de NF- κ B
Salina	69,87 $\pm$ 5,8
Anabasina	77,85 $\pm$ 9,4*

Teste t de Student, n=10 animais/grupo.

Figura 18 - Intensidade de fluorescência relativa a expressão da ativação do NF-κB de células dendríticas CD11c⁺ de baço de camundongos 7 dias após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. *p<0,05 em relação ao grupo controle, Teste t de Student, n=10 animais/grupo.

6.11. Experimento 11 - Avaliação dos efeitos da Anabasina (agonista nicotínico) na quantidade de citocinas e quimiocinas no soro dos animais 24 horas e 7 dias após a imunização com OVA

Os animais foram divididos em grupos (n=10), conforme mostrado no item 5.3, tendo recebido a Anabasina 30 minutos antes da administração subcutânea da OVA, conforme descrito no item 5.4. Após 24 horas e 7 dias. O soro foi coletado para posterior avaliação da produção de citocinas e quimiocinas, conforme descrito no item 5.13.

RESULTADO

A **tabela 15** mostra e as **figuras 19 e 20** ilustram os resultados obtidos quando da análise do soro dos camundongos 24 horas após a imunização com OVA. A análise estatística dos dados obtidos demonstrou que os animais tratados com Anabasina apresentaram menos TNF (p<0,05) e menos MCP-1 (p<0,05) que os animais tratados

apenas com salina. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando se avaliou a IL-10 e a IL-6 (Teste t de Student). Não foram encontrados níveis detectáveis de IFN- γ em ambos os grupos.

Tabela 15 – Dosagem de citocinas e quimiocinas no soro de camundongos 24 horas após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.

Citocinas	Salina	Anabasina
TNF	18,88 $\pm$ 2,4	13,93 $\pm$ 3,4 *
IFN-γ	ND	ND
MCP-1	75,80 $\pm$ 6,3	55,95 $\pm$ 15,5 *
IL-10	5,45 $\pm$ 0,9	7,59 $\pm$ 3,4
IL-6	8,93 $\pm$ 4,7	8,52 $\pm$ 3,0

ND: não detectável. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina; Teste t de Student, $n=10$ animais/grupo.

Figura 19 - Dosagem de TNF no soro de camundongos 24 horas após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina; Teste t de Student, $n=10$ animais/grupo.

Figura 20- Dosagem de MCP-1 no soro de camundongos 24 horas após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina; Teste t de Student, $n=10$ animais/grupo.

Em relação às dosagens realizadas de soro coletado 7 dias após a imunização, a **tabela 16** mostra e a **figura 21** ilustra o aumento produzido pela Anabasina nos níveis séricos de IL-6 em relação ao grupo salina ($p < 0,05$). Com relação ao TNF e ao MCP-1, não observamos diferenças significantes entre os dados dos diferentes grupos. Não foram encontrados níveis detectáveis de IFN- γ e IL-10 em ambos os grupos.

Tabela 16 – Dosagem de citocinas e quimiocinas no soro de camundongos 7 dias após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.

Citocinas	Salina	Anabasina
TNF	15,75 $\pm$ 1,2	15,55 $\pm$ 3,5
IFN-γ	ND	ND
MCP-1	102,19 $\pm$ 36,9	99,09 $\pm$ 32,0
IL-10	ND	ND
IL-6	19,45 $\pm$ 7,2	28,75 $\pm$ 8,9 *

ND: não detectável. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina; Teste t de Student, $n=10$ animais/grupo.

Figura 21 - Dosagem de IL-6 no soro de camundongos 7 dias após a imunização com OVA e que receberam Anabasina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina; Teste t de Student, $n=10$ animais/grupo.

6.12. Experimento 12 - Avaliação dos efeitos da Anabasina (agonista nicotínico) numa reação de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH).

Os animais foram divididos em grupos ($n=12$), conforme mostrado no item 5.3, tendo recebido a Anabasina 30 minutos antes da administração subcutânea da OVA, conforme descrito no item 5.4. Decorridos sete dias da data de sensibilização com OVA, os animais foram desafiados também s.c. no coxim plantar com uma solução de OVA agregada a 4% e o crescimento na espessura da pata foi medida em momentos estipulados (1h, 4h, 6h, 12h, 24h e 48h) conforme descrito no item 5.14.

RESULTADO

A **tabela 17** mostra e a **figura 22** ilustra os efeitos da Anabasina numa reação de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH). A ANOVA de duas vias seguida pelo teste de

Tukey-Kramer mostrou que tanto o tratamento com Anabasina quanto o tempo influenciaram a espessura das patas dos camundongos avaliados ($p < 0,001$). No entanto, o fator tempo não foi capaz de modificar os efeitos do tratamento com Anabasina ($p > 0,05$). Ainda, podemos verificar que a partir do momento 12h houveram diferenças significantes entre os dados do grupo Salina e do grupo Anabasina ($p < 0,05$).

Tabela 17 – Efeitos da Anabasina numa reação de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH).

Tempos	Salina	Anabasina
1 h	$0,573 \pm 0,20$	$0,631 \pm 0,22$
4 h	$1,145 \pm 0,24$	$1,034 \pm 0,21$
6 h	$1,357 \pm 0,26$	$1,326 \pm 0,26$
12 h	$1,217 \pm 0,17$	$0,983 \pm 0,18^*$
24 h	$1,372 \pm 0,30$	$1,095 \pm 0,22^*$
48 h	$1,483 \pm 0,24$	$1,268 \pm 0,15^*$

* $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina, ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey-Kramer, $n=12$ animais/grupo.

Figura 22 - Efeitos da Anabasina numa reação de hipersensibilidade do tipo tardia. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina, ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey-Kramer, $n=12$ animais/grupo.

6.13. Experimento 13 - Avaliação dos efeitos da Anabasina (agonista nicotínico) nos níveis séricos de Adrenalina e Noradrenalina

Para a avaliação in vivo dos efeitos da Anabasina na produção de Adrenalina e Noradrenalina os camundongos foram divididos em dois grupos: um que recebeu salina e outro que recebeu Anabasina. Uma parte deles foi eutanaziada após meia hora da administração e outra parte, após uma hora da administração. O soro foi coletado e a quantificação foi realizada conforme descrito no item 5.15.

RESULTADO

Análise estatística mostrou que a Anabasina não foi capaz de modificar os níveis séricos de Adrenalina e Noradrenalina nos tempos 30 minutos e uma hora, como pode ser observado nas **tabelas 18 e 19** (ANOVA de duas vias, $p < 0,05$).

Tabela 18 - Avaliação dos efeitos da Anabasina (agonista nicotínico) nos níveis séricos de Adrenalina, 30 minutos e 1 hora após a administração. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.

Tratamento	30 minutos	1 hora
Salina	$6,43 \pm 1,7$	$7,79 \pm 2,9$
Anabasina	$7,41 \pm 2,0$	$6,53 \pm 1,8$

ANOVA de duas vias. n=10 animais/grupo

Tabela 19 - Avaliação dos efeitos da Anabasina (agonista nicotínico) nos níveis séricos de Noradrenalina, 30 minutos e 1 hora após a administração. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.

Tratamento	30 minutos	1 hora
Salina	10,22 $\pm$ 3,3	7,91 $\pm$ 2,0
Anabasina	8,00 $\pm$ 3,6	7,48 $\pm$ 3,1

ANOVA de duas vias. n=10 animais/grupo

6.14. Experimento 14 - Avaliação dos efeitos *in vitro* da Anabasina (agonista nicotínico) na fenotipagem de células dendríticas provenientes de medula óssea.

Para a avaliação *in vitro* dos efeitos da Anabasina em uma cultura de células dendríticas provenientes de medula óssea os fêmures e a tíbias de camundongos foram coletados e a medula óssea desses ossos foi colocada em cultura conforme descrito no item 5.7. Após os sete dias de cultura, as células dendríticas imaturas foram incubadas com Veículo, Epinefrina (10^{-6} M) e Anabasina (10^{-4} M) e após 30 minutos foi administrado LPS conforme descrito, também, no item 5.7. Após 24 horas as células foram coletadas para posterior fenotipagem das células dendríticas, conforme descrito no item 5.8.

RESULTADO

A **tabela 20** mostra a porcentagem de células que apresentaram os fenótipos analisados. A análise estatística mostrou que a Anabasina foi incapaz de produzir diferenças significantes nas porcentagens de células ($CD11c^{+}IAb^{+}$ e $CD80^{+}CD86^{+}$) em relação àquela medida no grupo controle (Teste Tukey-Kramer, $p < 0,05$).

Tabela 20 – Efeitos da Anabasina *in vitro* na porcentagem de células dendríticas de uma cultura de medula óssea de camundongos. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.

Fenótipo	Veículo	Epinefrina	Anabasina
CD11c⁺IAb⁺	99,10 $\pm$ 0,3	99,48 $\pm$ 0,2	99,20 $\pm$ 0,1
CD80⁺CD86⁺	96,30 $\pm$ 0,4	96,00 $\pm$ 0,7	95,65 $\pm$ 0,7

Teste de Tukey-Kramer, n=8 animais/grupo.

A **tabela 21** mostra e as **figuras 23 a 25** ilustram os resultados referentes à análise da expressão dos diferentes marcadores de superfície utilizados na fenotipagem das células dendríticas. Verificamos que a Anabasina aumentou a expressão de MHC classe II em relação ao grupo Veículo e em relação ao grupo Epinefrina ($p < 0,001$), diminuiu a expressão de CD80 em relação ao Veículo ($p < 0,01$) e em relação à Epinefrina ($p < 0,001$). Tanto a Anabasina como a Epinefrina, diminuíram a expressão de CD86 em relação ao grupo Veículo ($p < 0,05$)(Teste Tukey-Kramer).

Tabela 21 – Efeitos da Anabasina *in vitro* na expressão dos diferentes marcadores de superfície de células dendríticas de uma cultura de medula óssea de camundongos. Os dados referem-se à unidade de fluorescência e representam a média $\pm$ desvio padrão.

Marcador	Veículo	Epinefrina	Anabasina
IAb	394,50 $\pm$ 14,0	396,75 $\pm$ 22,5	456,25 $\pm$ 12,4 ^a
CD80	110,50 $\pm$ 1,8	112,50 $\pm$ 3,4	102,47 $\pm$ 5,1 ^{b,c}
CD86	493,75 $\pm$ 42,0	443,75 $\pm$ 45,2 ^d	439,50 $\pm$ 28,5 ^d

^a $p < 0,001$ em relação aos grupos Veículo e Epinefrina, ^b $p < 0,01$ em relação ao grupo Veículo, ^c $p < 0,001$ em relação ao grupo Epinefrina, ^d $p < 0,05$ em relação ao grupo Veículo; Teste de Tukey-Kramer, n=8 animais/grupo.

Figura 23 - Efeitos da Anabasina *in vitro* na expressão de IAb na superfície de células dendríticas de uma cultura de medula óssea de camundongos. ^a $p < 0,001$ em relação aos grupos Veículo e Epinefrina, Teste de Tukey-Kramer, $n=8$ animais/grupo.

Figura 24 - Efeitos da Anabasina *in vitro* na expressão de CD80 na superfície de células dendríticas de uma cultura de medula óssea de camundongos. ^b $p < 0,01$ em relação ao grupo Veículo e ^c $p < 0,001$ em relação ao grupo Epinefrina, Teste de Tukey-Kramer, $n=8$ animais/grupo.

Figura 25 - Efeitos da Anabasina *in vitro* na expressão de CD86 na superfície de células dendríticas de uma cultura de medula óssea de camundongos. ^d $p < 0,05$ em relação ao grupo Veículo, Teste de Tukey-Kramer, $n = 8$ animais/grupo.

6.15. Experimento 15 - Avaliação dos efeitos *in vitro* da Anabasina (agonista nicotínico) na produção de citocinas de células dendríticas provenientes de medula óssea.

Para a avaliação *in vitro* dos efeitos da Anabasina em uma cultura de células dendríticas provenientes de medula óssea os fêmures e a tíbias de camundongos foram coletados e a medula óssea desses ossos foi colocada em cultura conforme descrito no item 5.7. Após sete dias de cultura, as células dendríticas imaturas foram incubadas de acordo com as sete situações propostas no item 5.3; após 30 minutos foi administrado LPS conforme descrito, também, no item 5.7. Após 24 horas o sobrenadante foi coletado para posterior quantificação de IL-12 e IL-10 por ELISA conforme descrito no item 5.10.

RESULTADO

A **tabela 22** mostra e as **figuras 26 e 27** ilustram os efeitos *in vitro* de diferentes concentrações de Anabasina na produção de IL-12 e IL-10 em uma cultura pura de células dendríticas de medula óssea.

Podemos observar que a Anabasina diminuiu de forma dose-dependente a produção de IL-12 em relação ao controle, sendo que as concentrações 10^{-4} M, 10^{-5} M e 10^{-6} M produziram resultados estatisticamente diferentes em relação ao grupo veículo (teste de Dunnett, $p<0,01$).

Em relação à produção de IL-10, verificamos que a Anabasina aumentou a sua produção em relação ao grupo veículo, sendo que nas concentrações 10^{-4} M e 10^{-5} M essa diferença foi estatisticamente significativa (teste de Dunnett, $p<0,01$).

Vale ainda ressaltar que as concentrações 10^{-4} M, 10^{-5} M e 10^{-6} M de Anabasina apresentaram efeitos estatisticamente semelhantes ao nosso controle positivo Epinefrina 10^{-6} M.

Tabela 22 – Efeitos de diferentes concentrações de Anabasina *in vitro* na produção de IL-12 e IL-10 de uma cultura pura de células dendríticas de medula óssea.

Condições	IL-12	IL-10
Veículo	95,591 ± 23,89	169,733 ± 26,26
Epinefrina (10^{-6}M)	8,238 ± 3,16 **	378,547 ± 61,23 **
C1 (Anabasina 10^{-4}M)	18,140 ± 8,13 **	251,469 ± 46,36 **
C2 (Anabasina 10^{-5}M)	34,332 ± 11,58 **	242,473 ± 44,08 **
C3 (Anabasina 10^{-6}M)	56,868 ± 17,23 **	193,514 ± 17,38
C4 (Anabasina 10^{-7}M)	87,659 ± 17,50	177,118 ± 8,87
C5 (Anabasina 10^{-8}M)	115,374 ± 20,50	198,386 ± 27,59

** $p<0,01$ em relação ao grupo veículo, Teste de Dunnett, $n=8$ amostras/condição.

Figura 26 – Efeitos de diferentes concentrações de Anabasina *in vitro* na produção de IL-12 de uma cultura pura de células dendríticas de medula óssea. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo veículo, Teste de Dunnett, $n=8$ amostras/condição.

Figura 27 – Efeitos de diferentes concentrações de Anabasina *in vitro* na produção de IL-10 de uma cultura pura de células dendríticas de medula óssea. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo veículo, Teste de Dunnett, $n=8$ amostras/condição.

6.16. Experimento 16 - Avaliação dos efeitos da Anabasina (agonista nicotínico) na expressão de mRNA para o receptor $\alpha 7$ -nicotínico de células dendríticas provenientes de medula óssea.

Para a avaliação *in vitro* dos efeitos da Anabasina na expressão de mRNA para o receptor $\alpha 7$ -nicotínico de células dendríticas provenientes de medula óssea os fêmures e a tíbias de camundongos foram coletados e a medula óssea de ambos os ossos foi colocada em cultura conforme descrito no item 5.7. Após os sete dias de cultura, as células dendríticas imaturas foram incubadas de acordo com as situações propostas no item 5.3 e após 30 minutos foi administrado LPS conforme descrito, também, no item 5.7. Após as células foram coletadas para a posterior extração do mRNA e para a realização do PCR convencional conforme descrito no item 5.15.

RESULTADO

A **figura 28** ilustra as bandas obtidas no PCR convencional. Na linha de cima observamos a expressão do *housekeeping gene beta2-m* ($\beta 2$ -microglobulina – B2m) e na linha abaixo a expressão do gene investigado *mNACHRa7* (receptor colinérgico nicotínico- $\alpha 7$). Pela intensidade das bandas observadas, podemos inferir que as células que foram tratadas só com o veículo e não receberam o LPS (portanto células dendríticas imaturas) apresentaram uma alta expressão do *mNACHRa7*. No entanto, as células tratadas com veículo e que receberam LPS (sendo desta forma células dendríticas maduras) apresentaram uma menor expressão deste receptor. Porém, quando se tratou as células com Anabasina 30 minutos do LPS, a expressão do *mNACHRa7* aumentou.

Figura 28 - Efeitos da Anabasiana na expressão de mRNA para o receptor $\alpha 7$ -nicotínico de células dendríticas provenientes de medula óssea avaliado por PCR convencional. A: cérebro de camundongo; B: Veículo sem LPS; C: Veículo+LPS; D: Anabasina+LPS.

7. DISCUSSÃO

A resposta imune durante o estresse vem sendo amplamente estudada no contexto de ativação do eixo HPA e/ou do Sistema Nervoso Simpático (Ader, 2007). Sabe-se que existe um controle exercido pelo nervo vago na produção de citocinas e no tráfego de leucócitos, indicando estes fatos que o sistema colinérgico contribui de alguma forma para a manutenção da homeostase (Tracey, 2007). Sabe-se, também, que estados mentais alterados (como depressão e ansiedade) podem levar a uma disfunção do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) resultando na perda da homeostase e, conseqüentemente, no desbalanço do processo inflamatório (Elenkov, 2004). Neste sentido, o restabelecimento da homeostase é muito importante para uma adequada resposta do organismo frente aos desafios por doenças inflamatórias. Por tudo isso, pareceu-nos relevante estudar alguns aspectos das influências do Sistema Nervoso Autônomo Parassimpático (SNP) na função das células dendríticas (DC).

Neste contexto, ao avaliarmos a ação de agonistas nicotínicos e muscarínicos e de sua combinação, observamos que: a administração do agonista nicotínico Anabasina (1) aumentou a porcentagem de células CD80+CD86+, (2) aumentou a expressão de MHC classe II e (3) diminuiu a concentração de IL-12 no sobrenadante de cultura. No grupo tratado com o agonista muscarínico Betanecol não se observaram alterações significantes nas porcentagens de células e expressão de moléculas co-estimulatórias em relação ao controle. A combinação de ambos os fármacos, por sua vez, produziu efeitos semelhantes aos observados no grupo que só recebeu Anabasina. Assim, pode-se dizer que a modulação colinérgica das células dendríticas está muito provavelmente, relacionada à ação em receptores nicotínicos, pois apenas a estimulação nicotínica (Anabasina) produziu efeitos nas células dendríticas.

As DCs são células apresentadoras de antígenos que possuem como característica uma forte capacidade de estimular a proliferação de células T (Arima et al., 2010). Ainda que esteja bem definido que subpopulações distintas de DCs exibam funções distintas, cabe ressaltar que as DCs possuem alta plasticidade em sua capacidade de modulação das respostas de células T, ou seja, DCs que normalmente induzem perfis do tipo Th1 podem converter sua resposta para induzir células com perfil Th2 quando tratadas com citocinas antiinflamatórias (Banchereau et al., 2000a).

Vale ressaltar que em nosso trabalho não foi observada qualquer alteração na proliferação linfocitária. Poder-se ia levantar a possibilidade de que a concentração de OVA utilizada (1mg/ml) tenha sido muito alta; porém, somente empregamos em nossos estudos amostras com mais de 95% de viabilidade celular. Vale ressaltar que outros experimentos foram realizados em nosso laboratório utilizando-se a mesma dose de OVA e neles não observamos aumento significativo de morte celular (Ribeiro et al., 2010; Tomiyoshi *et al.*, 2009). Por outro lado, realizamos outros experimentos neste trabalho empregando concentrações menores de OVA (100µg/mL) e LPS (1ng/mL) e não encontramos diferenças estatísticas entre os grupos tratados e não tratados, o que nos levou a manter a dose de 1mg/mL.

Diversos trabalhos têm demonstrado que a exposição à nicotina ou à acetilcolina modifica a função das DCs (Aicher et al., 2003; Guinet et al., 2004). Neste sentido, já foi demonstrado que a ativação *in vitro* da subunidade $\alpha 7$ de macrófagos atenuou a liberação de citocinas pró-inflamatórias através da inibição da ativação de NF- κ B e sinalização de Jak/STAT (de Jonge et al., 2005).

Vale ressaltar que as DCs de camundongos expressam as subunidades de receptores nicotínicos $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 2$ e $\beta 4$ (Kawashima et al., 2007). Porém, existem

trabalhos bastante controversos no que diz respeito aos efeitos da exposição a agonistas nicotínicos em DCs. Assim, no trabalho de Guinet e colaboradores (2004) mostrou-se que DCs maduras expostas à nicotina manifestaram uma diminuição na atividade endocítica e fagocítica, assim como uma diminuição na produção de IL-12 (Guinet et al., 2004). Por outro lado, Aicher e colaboradores mostraram que esta exposição, quando feita com doses menores, aumentou a expressão de moléculas co-estimulatórias, como CD86 e, também a produção de IL-12 (Aicher et al., 2003). Em nosso trabalho observamos que a estimulação do receptor nicotínico com o agonista anabasina aumentou a porcentagem de células $CD80^+CD86^+$, assim como a expressão de MHC classe II; no entanto, esta mesma estimulação foi capaz de diminuir a produção de IL-12. Acreditamos que estes resultados contraditórios aos de literatura e também a outros obtidos no presente trabalho, se devam aos diferentes estados de maturação das DCs e ao tempo de cultura; mais que isto, os trabalhos citados acima foram feitos com exposição *in vitro* e não *in vivo* como o nosso. Sugerimos, desta maneira que outros mecanismos e outras citocinas possam estar envolvidos neste processo, um fato que procuramos investigar nos experimentos subsequentes.

As citocinas são essenciais para a interação entre as células efectoras e as células acessórias durante a defesa do organismo a patógenos. A IL-12 possui um papel central na resposta imune, em especial no processo de transição de uma resposta inata para uma resposta adaptativa (Louis et al., 2010). A produção de IL-12 pelas DCs é realizada tanto por uma via independente de células T (induzida por produtos microbianos e $IFN\gamma$) como por outra dependente de células T (induzida pela ligação de CD40) (Arima et al., 2010; Romani et al., 1997). Neste sentido, um trabalho de Louis e colaboradores (2010) mostrou a existência de uma correlação positiva entre as produções de $IFN\gamma$ e de IL-12 em DCs. Neste trabalho, apesar de não termos encontrado uma diminuição

estatisticamente significativa nos níveis de $\text{IFN}\gamma$, observamos uma tendência de diminuição da produção desta citocina. Assim, podemos sugerir que a diminuição da produção de IL-12 seria consequência da diminuição de $\text{IFN}\gamma$. Já em relação a não detecção de IL-4, quer nos parecer seja possível sugerir que a estimulação utilizada não mimetizou um processo alérgico, não se reproduzindo, desta forma um perfil do tipo Th2 (Louis et al., 2010; Soroosh e Doherty, 2009).

Com relação às avaliações da ação de antagonistas nicotínicos e muscarínicos e sua combinação não obtivemos resultados tão robustos quanto aqueles relativos às avaliações com os agonistas. Observamos que apenas o grupo que recebeu a atropina (antagonista nicotínico) mostrou uma tendência a um aumento de porcentagem de células $\text{CD11c}^+\text{IAb}^+$. Observou-se após o uso do antagonista muscarínico mecamilamina, assim como após a combinação dos dois fármacos, uma menor porcentagem dessas células em relação ao grupo que recebeu atropina e, estes valores de porcentagem, eram semelhantes aos do grupo controle.

Ainda que os receptores muscarínicos estejam presentes nas células imunes, a injeção intravenosa de muscarina não foi capaz de inibir os níveis séricos de TNF no modelo de endotoxemia em ratos (Pavlov et al., 2006). Este fato indica que, provavelmente, a via colinérgica anti-inflamatória não utiliza a sinalização muscarínica periférica e que esses receptores não estejam envolvidos com a modulação de citocinas (Johnston e Webster, 2009) explicando-se, assim, a ausência de resultados nestes experimentos.

Porém, enquanto a sinalização muscarínica periférica não está relacionada ao controle da inflamação, a transmissão muscarínica central é importante para a atenuação de respostas inflamatórias (Rosas-Ballina e Tracey, 2009b). Um trabalho de Pavlov e

colaboradores (2006) mostrou que a injeção intracerebroventricular de ligantes do receptor muscarínico M_1 e M_2 inibiu significativamente a produção de TNF sistêmico em ratos com endotoxemia, e também ativou fibras eferentes do nervo vago.

Assim, acreditamos seja possível dizer que a ação do SNP nas DCs esteja relacionada à estimulação de receptores nicotínicos e, ainda, que esta ação produz DCs com um fenótipo mais modulatório e não especificadamente com perfil Th1 ou Th2. Desta forma, escolhemos a Anabasina para dar continuidade aos nossos estudos. A Anabasina é um alcalóide encontrado no tabaco, quimicamente similar à nicotina (Mastropaolo et al., 2004). Sabe-se, ainda, ser ela um agonista seletivo para a subunidade $\alpha 7$ do receptor nicotínico. Diversos trabalhos têm demonstrado que a exposição à nicotina ou à acetilcolina *in vitro* modifica a função das DCs (Aicher et al., 2003; Guinet et al., 2004). Neste sentido, já foi demonstrado que a ativação *in vitro* e *in vivo* da subunidade $\alpha 7$ de macrófagos atenuou a liberação de citocinas pró-inflamatórias através da inibição da ativação de NF- κ B e sinalização de Jak/STAT (de Jonge e Ulloa, 2007). Vale ressaltar que as DCs de camundongos expressam as subunidades de receptores nicotínicos $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 2$ e $\beta 4$ (Kawashima et al., 2007).

Deste modo, ao se utilizar a Anabasina como ferramenta de estudo, observou-se:

- 1) diminuição na expressão das moléculas co-estimulatórias B7.1 (CD80+) e B7.2 (CD86+) nas células dendríticas de linfonodo (sete dias após a imunização) e também nas células dendríticas de medula óssea, 2) diminuição na expressão de MHC classe II em células dendríticas de baço (24 horas após a imunização), 3) aumento na expressão das moléculas co-estimulatórias B7.1 e B7.2 nas células dendríticas de baço (24 horas após a imunização), 3) aumento de expressão de MHC classe II nas células dendríticas de medula óssea, 4) diminuição na produção de IL-12 por células dendríticas de medula

óssea, 5) aumento na produção de IL-10 por células dendríticas de medula óssea e, 6) diminuição na resposta de hipersensibilidade do tipo tardia.

Sabe-se que as células dendríticas migram para o sítio inflamatório e que fagocitam patógenos e debris celulares. Após essa fagocitose, o material é processado e transportado para os tecidos linfóides para a apresentação de antígenos (Banchereau et al., 2000a; Banchereau et al., 2000b; Banchereau, 2000). Esta migração é acompanhada da maturação e diferenciação das células dendríticas imaturas em maduras (Banchereau e Steinman, 1998). Esta maturação envolve o aumento da expressão de moléculas como as de MHC classe II, moléculas de adesão celular (CD54 e CD58 e moléculas co-estimulatórias B7.1 e B7.2 (CD80 e CD86); estas últimas, estão envolvidas com a ativação de células do sistema imune adaptativo (Saalmuller, 2006; Shortman e Liu, 2002). Após a maturação, as células dendríticas estão aptas a interagir, nos linfonodos, com linfócitos antígeno-específicos (Saalmuller, 2006). Assim, a expressão de MHC classe II, assim como aquela de moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 são cruciais para que a célula dendrítica passe o sinal via CD28 do linfócito, iniciando seus processos de sobrevivência, competência metabólica, ciclo celular e estabilização do RNAm para IL-12 (Reis e Sousa, 2006).

Desta forma, parece-nos possível sugerir que uma vez que a expressão destas moléculas encontra-se alterada, a apresentação antigênica também estaria afetada. Assim, como a Anabasina diminuiu a expressão de CD80 e CD86 nas células dendríticas de linfonodo (sete dias após a imunização) e de medula óssea, e diminuiu, também, a expressão de MHC classe II em células dendríticas de baço (24 horas após a imunização) parece-nos razoável afirmar que o uso de um agonista nicotínico modifica a maturação das células dendríticas podendo assim, diminuir a apresentação de antígenos por essas células.

Outro aspecto que deve ser levado em consideração ao se estudar a função das células dendríticas é a produção de citocinas, especialmente de IL-12. Numa resposta aos sinais de perigo, por exemplo, na presença de produtos microbianos ou de dano tecidual as células dendríticas aumentam a expressão de moléculas co-estimulatórias e de apresentação antigênica e, em seu processo de maturação também produzem grandes quantidades de citocinas próinflamatórias, como a IL-12 (Nouri-Shirazi *et al.*, 2007; Trinchieri, 2003). A IL-12 produzida durante as primeiras fases de uma infecção ou inflamação é fundamental para iniciar uma resposta imune do tipo antígeno específica, favorecendo assim, a diferenciação e a função de linfócitos do tipo Th1 e também o tipo de imunidade que se apóia nas células Th1 (imunidade mediada por células, geração de células T citotóxicas, produção e opsonização de anticorpos e ativação de células fagocíticas) (Trinchieri, 1998). Assim, a IL-12 não é só uma potente citocina pró-inflamatória, mas é também, uma molécula chave para a regulação de uma resposta do tipo Th1 (Banchereau e Steinman, 1998; Nouri-Shirazi *et al.*, 2007; Trinchieri, 1998, 2003). Para testar os efeitos da Anabasina na responsividade das células dendríticas frente a um estímulo de maturação, colocamos as células dendríticas de medula óssea em cultura com um antígeno bacteriológico, o lipopolissacarídeo (LPS) na presença de Anabasina. Após 24 horas, verificamos que a Anabasina diminuiu de forma dose dependente a produção de IL-12 e aumentou a produção de IL-10.

Estudos têm demonstrado que a inibição da produção de citocinas por uma via colinérgica anti-inflamatória ocorre via subunidade $\alpha 7$ do receptor nicotínico (Wang *et al.*, 2003). Experimentos que utilizaram animais *knockout* de $\alpha 7$ mostraram, nestes animais, que a estimulação colinérgica não inibia a produção de TNF, indicando este achado, que a subunidade $\alpha 7$ do receptor possui um papel importante na interação do nervo vago com a produção de citocinas pelo sistema imune (Wang *et al.*, 2003). Uma

maior resposta de TNF à endotoxina foi observado nestes camundongos *knockout* quando comparada àquela de camundongos *wild-type*, salientando este achado, a importância da atividade do nervo vago como um sistema regulador/protetor (Wang et al., 2003). Neste sentido, agonistas da subunidade $\alpha 7$ diminuíram a ativação do fator nuclear kappa B (NF κ B) em macrófagos, um fator de transcrição que regula a liberação de citocinas (Wang et al., 2004a; Wang et al., 2004b). A ligação da nicotina ao receptor $\alpha 7$ também ativou o recrutamento e a fosforilação do receptor JAK2 com subsequente fosforilação e translocação de Stat3 para o núcleo com uma associação de diminuição de resposta de TNF, MIP-2 e IL-6 (Gallowitsch-Puerta e Tracey, 2005). Desta forma, acetilcolina, nicotina e outros agonistas colinérgicos que se ligam à subunidade $\alpha 7$ em macrófagos podem tanto prevenir a translocação de NF κ B para o núcleo, ativando a via JAK/STAT, como reduzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (de Jonge et al., 2005). Portanto, acreditamos que, assim como ocorre com os macrófagos, o uso de agonistas dos receptores $\alpha 7$ pode diminuir a liberação de IL-12 pelas células dendríticas e, conseqüentemente, pode levar a uma diminuição na resposta do tipo Th1.

Em relação a IL-10, sabe-se ser ela um fator crucial no balanço entre a efetiva resistência aos patógenos em detrimento de uma inflamação sistêmica e ainda, ser ela um importante inibidor da produção de IL-12 através do bloqueio de sua transcrição (Aste-Amezaga et al., 1998; D'Andrea et al., 1993). Em muitas condições, já foi demonstrado que a produção de IL-12 é inibida quando a produção de IL-10 é induzida (Ma e Trinchieri, 2001; Trinchieri, 2003). Desta forma, ao observarmos um aumento da produção de IL-10 ao mesmo tempo em que observamos uma diminuição da produção de IL-12, parece-nos possível inferir que o sistema colinérgico, de alguma forma, através do receptor $\alpha 7$ nicotínico, atue na regulação cruzada entre a IL-10 e IL-12 nas células dendríticas.

Outro resultado bastante interessante obtido no presente trabalho foi em relação à análise do estabelecimento de uma resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH). A DTH é uma reação inflamatória mediada por células T de memória que se infiltram num local onde se injetou um antígeno (que no caso de nosso trabalho foi a OVA); ali, o sistema imune é ativado através da apresentação do antígeno (Kobayashi et al., 2001). Para que se estabeleça uma DTH é necessário, entre tantos processos, que haja a apresentação do antígeno por uma célula apresentadora a um linfócito T CD4 *naive* e a produção de IL-12 por essas mesmas células apresentadoras, formando-se, assim, uma típica resposta do tipo Th1 antígeno-específica (Kobayashi et al., 2001). Assim, como nos questionamos se o sistema colinérgico poderia interferir com a apresentação de antígenos específicos, pareceu-nos relevante analisar a DTH por ser ela um modelo eficaz para este tipo de estudo *in vivo*. Desta forma, verificamos que os camundongos tratados com a Anabasina apresentaram um menor edema da pata nos tempos 12, 24 e 48 horas de análise, ou seja, nos momentos de estabelecimento da DTH.

Estes dados de DTH concordam com aqueles por nós obtidos com as dosagens de citocinas e com a diminuição observada na expressão das moléculas co-estimulatórias. Sabe-se que tanto a diminuição da expressão de moléculas co-estimulatórias como a diminuição da produção de IL-12 levam a uma diminuição na resposta Th1 antígeno específica (Coquerelle e Moser, 2008). Assim, como as células dendríticas imaturas podem iniciar a diferenciação de células T naive para células T regulatórias (Belkaid e Chen, 2010; Dhodapkar *et al.*, 2001), um aumento na produção de IL-10 por células dendríticas poderia, apresentar o mesmo efeito (Ito et al., 2007). Desta forma, as células T regulatórias induzidas por IL-10 poderiam atuar de forma antiinflamatória, através de uma diminuição na apresentação de antígenos para células T (Dhodapkar et al., 2001; Jonuleit et al., 2000a; Jonuleit et al., 2000b; Levings et al., 2005).

Ainda neste trabalho, observou-se que a anabasina: 1) diminuiu os níveis séricos de TNF e MCP-1, 24 horas após a imunização, 2) aumentou os níveis séricos de IL-6, 7 dias após a imunização, 3) diminuiu a expressão de IL-12 intracelular de células dendríticas de cultura de hepatócitos e 4) aumentou a expressão de NF- κ B de células dendríticas de cultura de hepatócitos, ainda não alterou os níveis séricos de adrenalina e noradrenalina.

Durante uma infecção ou injúria o TNF é a um dos primeiros e mais potentes mediadores da inflamação. Ele é sintetizado principalmente por monócitos/macrófagos e células T e sua meia vida na circulação é de aproximadamente 20 minutos. O TNF tem um importante papel no direcionamento da resposta inflamatória e na ativação de mediadores pertencentes à cascata de citocinas. É, também, um potente indutor de citocinas pró-inflamatórias (Johnston e Webster, 2009). Nossos achados mostrando uma diminuição dos níveis de TNF circulantes nos animais tratados com Anabasina apoiam ainda mais a hipótese de que o uso de um agonista nicotínico atue de forma anti-inflamatória.

Com relação a IL-6, sabe-se ser sua síntese induzida por TNF e IL-1 a partir de diversos tipos celulares incluindo linfócitos e monócitos. Os níveis circulantes destas citocinas podem ser detectados 7 a 10 dias após uma injúria e, como amplamente salientado, elas podem produzir vários efeitos incluindo-se aqui, ativação neutrofílica, indução de resposta hepática de fase aguda e ativação da coagulação (Johnston e Webster, 2009). Em especial, a IL-6 pode controlar a proliferação de células T e a apoptose induzida por IL-2, pode ativar a produção de citocinas Th2, regular o balanço entre células T regulatórias e células Th17 juntamente com o TGF- β , inibir a diferenciação de células T regulatórias e manter a secreção de IL-17 nos tecidos inflamados (Neurath e Finotto, 2011). Vale ressaltar, que já foi descrito que pacientes

com artrite reumatóide e asma apresentam uma grande quantidade de IL-6 circulante (Swaak *et al.*, 1988; Wong *et al.*, 2001; Yue *et al.*, 2010) o que nos leva a sugerir que, na vigência de uma mudança de uma resposta do tipo Th1 para o tipo Th2, possa ocorrer um aumento na produção de IL-6 (Neurath e Finotto, 2011).

O balanço Th1/Th2 pode ser direcionado de um lado para outro em diversas enfermidades como, por exemplo, em infecções agudas e crônicas, doenças autoimunes e alergias (Elenkov, 2004). Primariamente, as células Th1 secretam IFN- γ , IL-2 e TNF, enquanto que as células do tipo Th2 secretam IL-4, IL-10 e IL-23 (Fearon e Locksley, 1996; Mosmann e Sad, 1996; Trinchieri, 2003). Células naive CD4⁺ Th0 podem ser precursoras tanto para perfil Th1 como Th2. A produção de IL-12 por APCs (como os monócitos, macrófagos e células dendríticas) é um dos maiores indutores para a diferenciação de uma resposta para o tipo Th1 (Jones e Vignali, 2011). Sabe-se, serem as respostas do tipo Th1 e Th2 mutualmente inibitórias; assim, a IL-12 e o IFN- γ inibem a atividade de células Th2 enquanto que a IL-4 e a IL-10 inibem a resposta Th1 (Elenkov, 2004; Fearon e Locksley, 1996; Mosmann e Sad, 1996; Trinchieri, 2003). Desta forma, ao observarmos que a anabasina (1) diminuiu a produção de TNF, (2) aumentou a de IL-6, (3) diminuiu a produção de IL-12 por células dendríticas (confirmado pela marcação intracelular desta citocina), (4) diminuiu a produção de IL-12 e (5) aumentou a de IL-10, parece-nos possível sugerir que o uso de um agonista do receptor nicotínico atuou como um agente anti-inflamatório e, também, desencadeou uma mudança de resposta do tipo Th1 para o tipo Th2.

Com relação à produção de catecolaminas achamos relevante avaliar se a anabasina poderia induzir a produção de adrenalina e norepinefrina. A estimulação do nervo vago pode modular a liberação de norepinefrina pelo nervo esplênico. Neste cenário, essa norepinefrina liberada pelo nervo esplênico por atuar nos receptores β_2

adrenérgicos expressos nos macrófagos atenuaria a liberação de TNF. Sabe-se, neste sentido que a subunidade $\alpha 7$ do receptor nicotínico, presente nos neurônios do plexo mesentérico celíaco superior, são responsáveis pela sinalização entre o vago e o nervo esplênico. Uma segunda alternativa, propõe que a norepinefrina originada nos terminais do nervo esplênico induziriam a liberação de ACh proveniente de células não neurais (por exemplo, linfócitos) que agindo na subunidade $\alpha 7$ do receptor nicotínico presente nos macrófagos, atenuaria a liberação de TNF (Rosas-Ballina e Tracey, 2009a). Em nosso trabalho não observamos alterações nos níveis séricos de adrenalina e noradrenalina. Assim, acreditamos que os efeitos observados sejam, realmente, consequentes a uma estimulação nicotínica direta em receptores $\alpha 7$ nicotínicos presentes nas células dendríticas.

Com relação ao NF- κ B, pode-se dizer que ele pertence a uma família de fatores de transcrição (usualmente RelA/p65:p50) que regula a divisão celular, a apoptose e a inflamação sendo que se encontra presente na maior parte das células de mamíferos; sabe-se que centenas de genes são induzidos por ele (Baltimore, 2011; Nelson et al., 2004). Os dímeros de NF- κ B em células não ativadas, são sequestrados no citoplasma pela ligação das proteínas I κ B. Um estímulo de ativação de NF- κ B ativa o inibidor *kappa B kinase* (IKK) que fosforila I κ B e NF- κ B. As proteínas de I κ B fosforiladas são, então, ubiquitinadas e degradadas pelos proteossomas, liberando os dímeros de NF- κ B para se translocarem ao núcleo celular e, desta forma, regular a transcrição de genes alvo (Nelson et al., 2004).

A indução de NF- κ B não é apenas um processo de ativação/inibição, visto que envolve a modificação de diversas vias celulares secundárias (Baltimore, 2011). Quando ocorre a ativação do NF- κ B, induz-se uma grande quantidade de genes. Estes genes antes da indução apresentavam uma baixa ou indetectável expressão, ou seja,

encontravam-se em um estado latente. De fato, quando presentes em níveis basais, eles apresentaram baixa capacidade de transcrição (Baltimore, 2011). Existem diversos indutores de NF- κ B; cada um deles é reconhecido por ser um receptor de superfície ou intracelular e sua ativação sinaliza o processo de transdução. Esses indutores incluem citocinas pró-inflamatórias como o TNF e IL-1 para macrófagos e fibroblastos, antígenos para células B ou T, glutamato para células nervosas e partículas químicas de dano ao DNA ou radiação (Oeckinghaus et al., 2011).

Assim, ao se utilizar a anabasina observou-se que as células dendríticas apresentavam uma maior expressão de NF- κ B, o que refletiria um aumento na ativação dessas células. Vale ressaltar um importante achado deste trabalho: observou-se que as células dendríticas no seu estado imaturo apresentavam uma alta expressão do receptor *mNACHRa7* mas quando elas se encontram maduras esta expressão se reduz, o que nos permite inferir que a transcrição deste gene se encontrava no seu nível basal (latente) antes do uso da anabasina. De fato, ao se estimular as células dendríticas maduras com anabasina, observou-se que a expressão de *mNACHRa7* aumentou, o que concorda com o aumento de expressão de NF- κ B.

Por tudo quanto o exposto, sugerimos que o sistema colinérgico possa diminuir a apresentação de antígenos específicos pelas células dendríticas, atuando de forma anti-inflamatória e produzindo um *shift* de resposta Th1 para Th2. Pode-se dizer ainda, que estes resultados se relacionam à estimulação direta da subunidade $\alpha 7$ do receptor nicotínico, com subsequente aumento de atividade da célula dendrítica e aumento da expressão de *mNACHRa7* nestas células.

8. CONCLUSÕES

Serão apresentadas em dois itens: específicas e geral

8.1. Conclusões específicas

No presente trabalho observou-se que:

1. O agonista nicotínico aumentou a porcentagem de células que expressam as moléculas co-estimulatórias B7.1 (CD80+) e B7.2 (CD86+) no baço de camundongos 7 dias após a imunização, enquanto que o agonista muscarínico não produziu nenhum efeito,
2. O agonista nicotínico diminuiu a produção de IL-12 no sobrenadante de co-cultura de células de baço, enquanto que o agonista muscarínico não apresentou nenhum efeito na produção de citocinas,
3. O antagonismo nicotínico e muscarínico não foi capaz de alterar o fenótipo de células dendríticas de baço 7 dias após a imunização,
4. O antagonismo nicotínico e muscarínico não foi capaz de alterar a produção de citocinas numa co-cultura de células de baço e,
5. Tanto agonistas quanto antagonistas nicotínicos e muscarínicos não alteraram a proliferação linfocitária.

A Anabasina, por sua vez:

1. Diminuiu a expressão das moléculas co-estimulatórias B7.1 (CD80+) e B7.2 (CD86+) nas células dendríticas de linfonodo (sete dias após a imunização),
2. Diminuiu a expressão de MHC classe II e aumento na expressão das moléculas co-estimulatórias B7.1 e B7.2 em células dendríticas de baço (24 horas após a imunização),
3. Não produziu efeitos no fenótipo de células dendríticas de linfonodo (24 horas após a imunização),
4. Diminuiu a expressão de IL-12 intracelular de células dendríticas de cultura de hepatócitos,
5. Aumentou a expressão de NF- κ B de células dendríticas de cultura de hepatócitos,
6. Diminuiu os níveis séricos de TNF e MCP-1, 24 horas após a imunização e, aumentou os níveis séricos de IL-6, 7 dias após a imunização,
7. Diminuiu a resposta de hipersensibilidade do tipo tardia,
8. Não alterou os níveis séricos de adrenalina e noradrenalina,
9. Aumentou a expressão de MHC classe II e diminuiu a expressão das moléculas co-estimulatórias B7.1 e B7.2 nas células dendríticas de medula óssea,
10. Diminuiu a produção de IL-12 e aumentou a produção de IL-10 por células dendríticas de medula óssea,
11. Aumentou a expressão de *mNACHRa7* de células dendríticas maduras provenientes de medula óssea.

8.2. Conclusão geral

Os dados obtidos deste trabalho sugerem que o sistema colinérgico diminua a apresentação de antígenos específicos por células dendríticas, atuando de forma anti-inflamatória e produzindo um *shift* da resposta Th1 para Th2; sugerem, ainda, que estes achados relacionam-se à estimulação direta da subunidade $\alpha 7$ do receptor nicotínico, com subsequente aumento de atividade das células dendríticas via aumento da expressão de *mNAChRa7* nestas células.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ader, R., 2007. **Psychoneuroimmunology: Fourth Edition**. Elsevier Academic Press.
- Aicher, A., Heeschen, C., Mohaupt, M., Cooke, J.P., Zeiher, A.M., Dimmeler, S., 2003. Nicotine strongly activates dendritic cell-mediated adaptive immunity: potential role for progression of atherosclerotic lesions. **Circulation** 107, 604-611.
- Alves, G.J., Vismari, L., Florio, J.C., Palermo-Neto, J., 2006. Cohabitation with a sick cage mate: Effects on noradrenaline turnover and neutrophil activity. **Neurosci Res** 56, 172-179.
- Arima, K., Watanabe, N., Hanabuchi, S., Chang, M., Sun, S.C., Liu, Y.J., 2010. Distinct signal codes generate dendritic cell functional plasticity. **Sci Signal** 3, ra4.
- Aste-Amezaga, M., Ma, X., Sartori, A., Trinchieri, G., 1998. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. **J Immunol** 160, 5936-5944.
- Baltimore, D., 2011. NF-kappaB is 25. **Nat Immunol** 12, 683-685.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., Palucka, K., 2000a. Immunobiology of dendritic cells. **Annu Rev Immunol** 18, 767-811.
- Banchereau, J., Pulendran, B., Steinman, R., Palucka, K., 2000b. Will the making of plasmacytoid dendritic cells in vitro help unravel their mysteries? **J Exp Med** 192, F39-44.
- Banchereau, J., Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature** 392, 245-252.
- Banchereau, J.B., F.; Caux, C.; Davoust, J.; Lebecque, S.; Liu, Y. J., 2000. Immunology of dendritic cells. **Annual Review of immunology** 18, 767-811.
- Bashir, M.E., Louie, S., Shi, H.N., Nagler-Anderson, C., 2004. Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. **J Immunol** 172, 6978-6987.
- Basso, A.S., Pinto, F.A., Russo, M., Britto, L.R., de Sa-Rocha, L.C., Palermo Neto, J., 2003. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **J Neuroimmunol** 140, 69-77.
- Belkaid, Y., Chen, W., 2010. Regulatory ripples. **Nat Immunol** 11, 1077-1078.
- Bernik, T.R., Friedman, S.G., Ochani, M., DiRaimo, R., Ulloa, L., Yang, H., Sudan, S., Czura, C.J., Ivanova, S.M., Tracey, K.J., 2002. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. **J Exp Med** 195, 781-788.
- Bjork, P., 2001. Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor-treated mice. **Blood** 98, 3520-3526.
- Blalock, J.E., 1994. The syntax of immune-neuroendocrine communication. **Immunol Today** 15, 504-511.
- Blalock, J.E., Smith, E.M., 1980. Human leukocyte interferon: structural and biological relatedness to adrenocorticotrophic hormone and endorphins. **Proc Natl Acad Sci U S A** 77, 5972-5974.
- Borovikova, L.V., Ivanova, S., Nardi, D., Zhang, M., Yang, H., Ombrellino, M., Tracey, K.J., 2000a. Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. **Auton Neurosci** 85, 141-147.
- Borovikova, L.V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W., Tracey, K.J., 2000b. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature** 405, 458-462.
- Choi, K.M., Zhu, J., Stoltz, G.J., Vernino, S., Camilleri, M., Szurszewski, J.H., Gibbons, S.J., Farrugia, G., 2007. Determination of gastric emptying in nonobese diabetic mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 293, G1039-1045.
- Chung, N.P.Y.C., Y.; Chan, V. S. F.; Tan, P. K. H.; Lin, C. L. S., 2004. Dendritic cells: sentinels against pathogens. **Histology and Histopathology** 19, 317-324.

- Cohen, S., Herbert, T.B., 1996. Health psychology: psychological factors and physical disease from the perspective of human psychoneuroimmunology. **Annu Rev Psychol** 47, 113-142.
- Conti, A., 2000. Oncology in neuroimmunomodulation. What progress has been made? **Ann N Y Acad Sci** 917, 68-83.
- Coquerelle, C., Moser, M., 2008. Are dendritic cells central to regulatory T cell function? **Immunol Lett** 119, 12-16.
- Costa-Pinto, F.A., Basso, A.S., Britto, L.R., Malucelli, B.E., Russo, M., 2005. Avoidance behavior and neural correlates of allergen exposure in a murine model of asthma. **Brain Behav Immun** 19, 52-60.
- D'Andrea, A., Aste-Amezaga, M., Valiante, N.M., Ma, X., Kubin, M., Trinchieri, G., 1993. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. **J Exp Med** 178, 1041-1048.
- Dantzer, R., Kelley, K.W., 2007. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. **Brain Behav Immun** 21, 153-160.
- de Jonge, W.J., Ulloa, L., 2007. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. **Br J Pharmacol** 151, 915-929.
- de Jonge, W.J., van der Zanden, E.P., The, F.O., Bijlsma, M.F., van Westerloo, D.J., Bennink, R.J., Berthoud, H.R., Uematsu, S., Akira, S., van den Wijngaard, R.M., Boeckxstaens, G.E., 2005. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. **Nat Immunol** 6, 844-851.
- Dhodapkar, M.V., Steinman, R.M., Krasovsky, J., Munz, C., Bhardwaj, N., 2001. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. **J Exp Med** 193, 233-238.
- Dinarello, C.A., 1997. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Chest** 112, 321S-329S.
- Dunn, A.J., 1995. Interactions between the nervous system and the immune system: implications for psychopharmacology. In: BLOOM, F.E.K., D. J. (Ed.), **Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress**. Raven-Press, New York, pp. 719-731.
- Elenkov, I.J., 2004. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. **Ann N Y Acad Sci** 1024, 138-146.
- Elftman, M.D., Norbury, C.C., Bonneau, R.H., Truckenmiller, M.E., 2007. Corticosterone impairs dendritic cell maturation and function. **Immunology** 122, 279-290.
- Fearon, D.T., Locksley, R.M., 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. **Science** 272, 50-53.
- Feraz-de-Paula, V., Ribeiro, A., Pinheiro, M.L., Sakai, M., Lacava, M.C., Lapachinske, S.F., Moreau, R.L., Palermo-Neto, J., 2009. Methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy) decreases neutrophil activity and alters leukocyte distribution in bone marrow, spleen and blood. **Neuroimmunomodulation** 16, 191-200.
- Ferraz-de-Paula, V., Stankevicius, D., Ribeiro, A., Pinheiro, M.L., Rodrigues-Costa, E.C., Florio, J.C., Lapachinske, S.F., Moreau, R.L., Palermo-Neto, J., 2011. Differential behavioral outcomes of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA-ecstasy) in anxiety-like responses in mice. **Braz J Med Biol Res** 44, 428-437.
- Fonseca, E.S., Massoco, C.O., Palermo-Neto, J., 2002. Effects of prenatal stress on stress-induced changes in behavior and macrophage activity of mice. **Physiol Behav** 77, 205-215.
- Fuentes, J.M., Fulton, W.B., Nino, D., Talamini, M.A., Maio, A.D., 2008. Atropine treatment modifies LPS-induced inflammatory response and increases survival. **Inflamm Res** 57, 111-117.
- Gallowitsch-Puerta, M., Pavlov, V.A., 2007. Neuro-immune interactions via the cholinergic anti-inflammatory pathway. **Life Sci** 80, 2325-2329.

- Gallowitsch-Puerta, M., Tracey, K.J., 2005. Immunologic role of the cholinergic anti-inflammatory pathway and the nicotinic acetylcholine alpha 7 receptor. **Ann N Y Acad Sci** 1062, 209-219.
- Giebelen, I.A., van Westerloo, D.J., LaRosa, G.J., de Vos, A.F., van der Poll, T., 2007. Stimulation of alpha 7 cholinergic receptors inhibits lipopolysaccharide-induced neutrophil recruitment by a tumor necrosis factor alpha-independent mechanism. **Shock** 27, 443-447.
- Guinet, E., Yoshida, K., Nouri-Shirazi, M., 2004. Nicotinic environment affects the differentiation and functional maturation of monocytes derived dendritic cells (DCs). **Immunol Lett** 95, 45-55.
- Huston, J.M., Ochani, M., Rosas-Ballina, M., Liao, H., Ochani, K., Pavlov, V.A., Gallowitsch-Puerta, M., Ashok, M., Czura, C.J., Foxwell, B., Tracey, K.J., Ulloa, L., 2006. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. **J Exp Med** 203, 1623-1628.
- Ito, T., Yang, M., Wang, Y.H., Lande, R., Gregorio, J., Perng, O.A., Qin, X.F., Liu, Y.J., Gillet, M., 2007. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. **J Exp Med** 204, 105-115.
- Johnston, G.R., Webster, N.R., 2009. Cytokines and the immunomodulatory function of the vagus nerve. **Br J Anaesth** 102, 453-462.
- Jones, L.L., Vignali, D.A., 2011. Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily. **Immunol Res**.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., Enk, A.H., 2000a. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. **J Exp Med** 192, 1213-1222.
- Jonuleit, H., Tuting, T., Steitz, J., Bruck, J., Giesecke, A., Steinbrink, K., Knop, J., Enk, A.H., 2000b. Efficient transduction of mature CD83+ dendritic cells using recombinant adenovirus suppressed T cell stimulatory capacity. **Gene Ther** 7, 249-254.
- Kavelaars, A., 2002. Regulated expression of alpha-1 adrenergic receptors in the immune system. **Brain Behav Immun** 16, 799-807.
- Kawashima, K., Fujii, T., 2003a. The lymphocytic cholinergic system and its biological function. **Life Sci** 72, 2101-2109.
- Kawashima, K., Fujii, T., 2003b. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. **Life Sci** 74, 675-696.
- Kawashima, K., Yoshikawa, K., Fujii, Y.X., Moriwaki, Y., Misawa, H., 2007. Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells. **Life Sci** 80, 2314-2319.
- Kobayashi, K., Kaneda, K., Kasama, T., 2001. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. **Microsc Res Tech** 53, 241-245.
- Lange, C., Durr, M., Doster, H., Melms, A., Bischof, F., 2007. Dendritic cell-regulatory T-cell interactions control self-directed immunity. **Immunol Cell Biol** 85, 575-581.
- Lazzarini, R., Maiorka, P.C., Liu, J., Papadopoulos, V., Palermo-Neto, J., 2006. Diazepam effects on carrageenan-induced inflammatory paw edema in rats: role of nitric oxide. **Life Sci** 78, 3027-3034.
- Lazzarini, R., Malucelli, B.E., Palermo-Neto, J., 2001. Reduction of acute inflammation in rats by diazepam: role of peripheral benzodiazepine receptors and corticosterone. **Immunopharmacol Immunotoxicol** 23, 253-265.
- Levings, M.K., Gregori, S., Tresoldi, E., Cazzaniga, S., Bonini, C., Roncarolo, M.G., 2005. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ T cells. **Blood** 105, 1162-1169.

- Ligeiro-Oliveira, A.P., Fialho de Araujo, A.M., Lazzarini, R., Silva, Z.L., De Nucci, G., Muscara, M.N., Tavares de Lima, W., Palermo-Neto, J., 2004. Effects of amphetamine on immune-mediated lung inflammatory response in rats. **Neuroimmunomodulation** 11, 181-190.
- Ligeiro de Oliveira, A.P., Lazzarini, R., Cavriani, G., Quinteiro-Filho, W.M., Tavares de Lima, W., Palermo-Neto, J., 2008. Effects of single or repeated amphetamine treatment and withdrawal on lung allergic inflammation in rats. **Int Immunopharmacol** 8, 1164-1171.
- Ligeiro de Oliveira, A.P., Lino-Dos-Santos-Franco, A., Hamasato, E.K., Quinteiro-Filho, W., Hebeda, C.B., Damazo, A.S., Farsky, S.H., Tavares-de-Lima, W., Palermo-Neto, J., 2011. Amphetamine modulates cellular recruitment and airway reactivity in a rat model of allergic lung inflammation. **Toxicol Lett** 200, 117-123.
- Louis, S., Dutertre, C.A., Vimeux, L., Fery, L., Henno, L., Diocou, S., Kahi, S., Deveau, C., Meyer, L., Goujard, C., Hosmalin, A., 2010. IL-23 and IL-12p70 production by monocytes and dendritic cells in primary HIV-1 infection. **J Leukoc Biol** 87, 645-653.
- Ma, X., Trinchieri, G., 2001. Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells. **Adv Immunol** 79, 55-92.
- Martinez-Ferrer, M., Iturregui, J.M., Uwamariya, C., Starkman, J., Sharif-Afshar, A.R., Suzuki, K., Visedsindh, W., Matusik, R.J., Dmochowski, R.R., Bhowmick, N.A., 2008. Role of nicotinic and estrogen signaling during experimental acute and chronic bladder inflammation. **Am J Pathol** 172, 59-67.
- Massoco, C., Palermo-Neto, J., 2003. Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study. **Vet Immunol Immunopathol** 95, 11-19.
- Mastropaolo, J., Rosse, R.B., Deutsch, S.I., 2004. Anabasine, a selective nicotinic acetylcholine receptor agonist, antagonizes MK-801-elicited mouse popping behavior, an animal model of schizophrenia. **Behav Brain Res** 153, 419-422.
- Mosmann, T.R., Sad, S., 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol Today** 17, 138-146.
- Nance, D.M., Sanders, V.M., 2007. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). **Brain Behav Immun** 21, 736-745.
- Nathan, C., 2002. Points of control in inflammation. **Nature** 420, 846-852.
- Nelson, D.E., Ihekweba, A.E., Elliott, M., Johnson, J.R., Gibney, C.A., Foreman, B.E., Nelson, G., See, V., Horton, C.A., Spiller, D.G., Edwards, S.W., McDowell, H.P., Unitt, J.F., Sullivan, E., Grimley, R., Benson, N., Broomhead, D., Kell, D.B., White, M.R., 2004. Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. **Science** 306, 704-708.
- Neurath, M.F., Finotto, S., 2011. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. **Cytokine Growth Factor Rev** 22, 83-89.
- Nijhuis, L.E., Olivier, B.J., de Jonge, W.J., 2010. Neurogenic regulation of dendritic cells in the intestine. **Biochem Pharmacol** 80, 2002-2008.
- Nizri, E., Hamra-Amitay, Y., Sicsic, C., Lavon, I., Brenner, T., 2006. Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation: A new role for acetylcholinesterase inhibitors. **Neuropharmacology** 50, 540-547.
- Nouri-Shirazi, M., Tinajero, R., Guinet, E., 2007. Nicotine alters the biological activities of developing mouse bone marrow-derived dendritic cells (DCs). **Immunol Lett** 109, 155-164.
- Oeckinghaus, A., Hayden, M.S., Ghosh, S., 2011. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. **Nat Immunol** 12, 695-708.
- Palermo-Neto, J., de Oliveira Massoco, C., Robespierre de Souza, W., 2003. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain Behav Immun** 17, 43-54.
- Palermo Neto, J., Massoco, C.O., Favare, R.C., 2001. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Neurotoxicol Teratol** 23, 497-507.

- Pavlov, V.A., Ochani, M., Gallowitsch-Puerta, M., Ochani, K., Huston, J.M., Czura, C.J., Al-Abed, Y., Tracey, K.J., 2006. Central muscarinic cholinergic regulation of the systemic inflammatory response during endotoxemia. **Proc Natl Acad Sci U S A** 103, 5219-5223.
- Qiu, Y.H., Cheng, C., Dai, L., Peng, Y.P., 2005. Effect of endogenous catecholamines in lymphocytes on lymphocyte function. **J Neuroimmunol** 167, 45-52.
- Reichlin, S., 1993. Neuroendocrine-immune interactions. **N Engl J Med** 329, 1246-1253.
- Reis e Sousa, C., 2006. Dendritic cells in a mature age. **Nature Reviews Immunology** 6, 476-483.
- Ribeiro, A., Ferraz-de-Paula, V., Pinheiro, M.L., Palermo-Neto, J., 2009. Dose-response effects of systemic anandamide administration in mice sequentially submitted to the open field and elevated plus-maze tests. **Braz J Med Biol Res** 42, 556-560.
- Ribeiro, A., Ferraz-de-Paula, V., Pinheiro, M.L., Sakai, M., Costa-Pinto, F.A., Palermo-Neto, J., 2010. Anandamide prior to sensitization increases cell-mediated immunity in mice. **Int Immunopharmacol**.
- Romani, L., Puccetti, P., Bistoni, F., 1997. Interleukin-12 in infectious diseases. **Clin Microbiol Rev** 10, 611-636.
- Rosas-Ballina, M., Tracey, K.J., 2009a. Cholinergic control of inflammation. **J Intern Med** 265, 663-679.
- Rosas-Ballina, M., Tracey, K.J., 2009b. The neurology of the immune system: neural reflexes regulate immunity. **Neuron** 64, 28-32.
- Saalmuller, A., 2006. New understanding of immunological mechanisms. **Vet Microbiol** 117, 32-38.
- Saint-Mezard, P., Chavagnac, C., Bosset, S., Ionescu, M., Peyron, E., Kaiserlian, D., Nicolas, J.F., Berard, F., 2003. Psychological stress exerts an adjuvant effect on skin dendritic cell functions in vivo. **J Immunol** 171, 4073-4080.
- Sakai, M., Fonseca, E.S., Dagli, M.L., Palermo-Neto, J., 2006a. Diazepam effects on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. **Life Sci** 78, 1777-1783.
- Sakai, M., Fonseca, E.S., Oloris, S.C., Matsuzaki, P., Otake, A.H., Leite, K.R., Massoco, C.O., Dagli, M.L., Palermo-Neto, J., 2006b. Effects of peripheral-type benzodiazepine receptor ligands on Ehrlich tumor cell proliferation. **Eur J Pharmacol** 550, 8-14.
- Sanders, V.M., Kavelaars, A., 2007. Adrenergic regulation of immunity. In: Ader, R. (Ed.), **Psychoneuroimmunology: Fourth Edition**. Elsevier Academic Press, pp. 63-84.
- Schoneveld, O.J.L.M.C., J. A., 2007. Glucocorticoids and immunity: mechanisms of regulation. In: Ader, R. (Ed.), **Psychoneuroimmunology: Fourth Edition**. Elsevier Academic Press, pp. 45-62.
- Shortman, K., Liu, Y.J., 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nat Rev Immunol** 2, 151-161.
- Soroosh, P., Doherty, T.A., 2009. Th9 and allergic disease. **Immunology** 127, 450-458.
- Swaak, A.J., van Rooyen, A., Nieuwenhuis, E., Aarden, L.A., 1988. Interleukin-6 (IL-6) in synovial fluid and serum of patients with rheumatic diseases. **Scand J Rheumatol** 17, 469-474.
- Tayebati, S.K., El-Assouad, D., Ricci, A., Amenta, F., 2002. Immunochemical and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. **J Neuroimmunol** 132, 147-155.
- Tomiyoshi, M.Y., Sakai, M., Baleeiro, R.B., Stankevicius, D., Massoco, C.O., Palermo-Neto, J., Barbuto, J.A., 2009. Cohabitation with a B16F10 melanoma-bearer cage mate influences behavior and dendritic cell phenotype in mice. **Brain Behav Immun** 23, 558-567.
- Tracey, K.J., 2002. The inflammatory reflex. **Nature** 420, 853-859.
- Tracey, K.J., 2007. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. **J Clin Invest** 117, 289-296.

- Trinchieri, G., 1998. Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12. **Int Rev Immunol** 16, 365-396.
- Trinchieri, G., 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol** 3, 133-146.
- Truckenmiller, M.E., Bonneau, R.H., Norbury, C.C., 2006. Stress presents a problem for dendritic cells: corticosterone and the fate of MHC class I antigen processing and presentation. **Brain Behav Immun** 20, 210-218.
- Wang, H., Liao, H., Ochani, M., Justiniani, M., Lin, X., Yang, L., Al-Abed, Y., Metz, C., Miller, E.J., Tracey, K.J., Ulloa, L., 2004a. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. **Nat Med** 10, 1216-1221.
- Wang, H., Yang, H., Tracey, K.J., 2004b. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. **J Intern Med** 255, 320-331.
- Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amella, C.A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J.H., Yang, H., Ulloa, L., Al-Abed, Y., Czura, C.J., Tracey, K.J., 2003. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature** 421, 384-388.
- Wong, C.K., Ho, C.Y., Ko, F.W., Chan, C.H., Ho, A.S., Hui, D.S., Lam, C.W., 2001. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. **Clin Exp Immunol** 125, 177-183.
- Yue, C., You, X., Zhao, L., Wang, H., Tang, F., Zhang, F., Zhang, X., He, W., 2010. The effects of adalimumab and methotrexate treatment on peripheral Th17 cells and IL-17/IL-6 secretion in rheumatoid arthritis patients. **Rheumatol Int** 30, 1553-1557.