Cecília Cerqueira Café Mendes

Efeito da nicotina na ativação do fator de
transcrição NF- κ B no sistema nervoso central
na vigência de estímulo inflamatório induzido
por lipopolissacarídeo (LPS)

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia
Experimental

Orientadora: Prof^a.Dr^a.Tania Marcourakis

São Paulo

2009

Cecília Cerqueira Café Mendes

Efeito da nicotina na ativação do fator de
transcrição NF- κ B no sistema nervoso central
na vigência de estímulo inflamatório induzido
por lipopolissacarídeo (LPS)

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia
Experimental

Orientadora: Prof^a.Dr^a.Tania Marcourakis

São Paulo

2009

Dedicatória

“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história.

É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.

É saber falar de si mesmo.

É ter coragem para ouvir um não. É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

Fernando Pessoa

À minha abençoada família que batalhou ao meu lado, de
corpo e alma, mesmo que à distância.

Ao Pedro pelo seu amor e companheirismo.

Agradecimentos

Muitos foram os percalços, mas muitas também foram as vitórias. E digo mais: por conta dos percalços a vitória se tornou ainda mais prazerosa! E como as vitórias só são completas quando compartilhadas, dedico esse espaço a todos os atores que protagonizaram a história da minha vida durante mais esse pedacinho de tempo dedicado à Ciência.

Primeiramente, gostaria de agradecer profundamente à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Tania Marcourakis, por ter acreditado que por detrás daquelas linhas de e-mail havia uma pessoa interessada em trabalhar e em produzir. Hoje, felizmente, somos muito mais do que simplesmente aluna e mestra, mas sim amigas! Obrigada pelos ensinamentos, carinho, dedicação e confiança!

Gostaria de agradecer também à Prof^a. Dr^a. Regina Markus por ter aberto as portas do seu laboratório e engrandecido nossa pesquisa com seu conteúdo e experiência. Por ter me feito sentir em casa e parte da família da Cronofarmacologia. Sem a sua colaboração nada disso teria sido possível. À Prof^a. Dr^a. Zulma Ferreira, da mesma forma, por ter compartilhado seu conhecimento e seu tempo conosco, contribuindo para esse trabalho. Muito Obrigada!

Ao Prof^o. Dr^o. Cristóforo Scavone também meus sinceros agradecimentos por ter sido um importante mediador durante os momentos de dificuldade; por ter me dedicado um voto de confiança e ter tornado o início dessa história possível. Agradeço também ao Laboratório de Neurofarmacologia Molecular pelo apoio.

À Prof^a. Dr^a. Rosana Camarini por estar sempre de portas abertas para me receber e me ajudar. Obrigada pela confiança!

Ao Prof^o. Dr^o. Miguel Garay e à Dr^a. Elaine Hatanaka por terem acreditado e se dedicado ao nosso projeto encontrando tempo para compartilhar conosco seu conhecimento. Muito Obrigada!

Aos meus amigos e colegas de laboratório da Análises Clínicas e Toxicológicas, Raphael e Larissa, pela nossa sintonia. Mesmo não nos encontrando muito, estivemos sempre lado a lado, sabendo que podíamos contar com a ajuda um do outro sempre que precisássemos! À Cristiane, por ter se juntado a nós e caminhado comigo nas tarefas

diárias, nem sempre fáceis. Aos demais Suellen, Wallace, Nathalia por engrandecerem nosso grupo e mostrar o que é gostar de fazer ciência!

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Cronofarmacologia, Pedro, Eduardo, Marco, Renato, Érika, Daiane, Sanseray, Cláudia, Kelly, Alex, Débora, Camila, Marina, principalmente pela Amizade! Vocês me receberam de braços abertos e permitiram que eu fizesse a minha bagunça, às vezes literalmente... mas só às vezes não?? Obrigada por me fazerem sentir parte do grupo; a participação de vocês foi imprescindível para esse trabalho. Muito Obrigada!

À minha amiga, e colega de laboratório, Mara, que já era minha amiga antes mesmo de nos conhecermos, não é? Só precisou de um tempinho para descobriremos! Obrigada pelo apoio, pelos conselhos durante os cafezinhos e obviamente por encher meu dia com novidades! Sua participação foi fundamental!

À minha amiga Marília por ter sido meu braço direito, e muitas vezes também o esquerdo, durante a realização dos experimentos com os animais. Sua ajuda foi peça chave no desenrolar dessa pesquisa. Obrigada pela presteza, simpatia, humildade e por estar sempre disposta a dedicar seu tempo a mim! E à minha amiga Sabrina por ter tido da mesma forma sempre disposição para me aconselhar, trocarmos figurinhas e ser também uma grande guia nessa caminhada. Vocês foram, sem dúvida, grandes aliadas tanto na alegria quanto na tristeza! Aproveito também para agradecer aos demais membros do Laboratório de Neuroquímica e Farmacologia Comportamental André, Ana, Priscila, Daniel, Jacqueline, pela presteza. Os meus infinitos agradecimentos!

À minha grande amiga Paty Lu por toda a ajuda antes e durante esse tempo de mestrado. Sua participação foi imprescindível para o meu estabelecimento e progresso nos pequenos passos do dia a dia! Valeu milga!!

À minha família, a quem jamais poderia deixar de agradecer! Incentivadores, batalhadores e um porto seguro para todos os momentos, na guerra ou na paz. Obrigada pelo laço de amor profundo a qualquer tempo e distância e, felizmente, eterno!

Ao Pedro, pelo amor, pelo carinho, incentivo e dedicação. A felicidade é mesmo feita de simples, mas valiosas coisas!

Às agências de fomento FAPESP, CNPq e CAPES pelo fundamental apoio financeiro.

... e à Deus nosso grande Maestro.

Índice

Resumo

Abstract

1. Introdução	1
1.1. A Nicotina	2
1.2. Nicotina e os Receptores Nicotínicos Neurais	4
1.3 Receptores nicotínicos e doenças neuropsiquiátricas	10
1.4. O fator de transcrição NF- κ B	13
1.5. LPS, Receptores Toll-4 e NF- κ B	17
1.6. Vias colinérgicas, nicotina e sistema imune	23
2. Objetivos	29
3. Materiais e Métodos	31
3.1. Animais	32
3.2. Tratamentos crônicos	32
3.3. Ensaio de gel de retardo (EMSA- <i>Gel shift</i>)	33
3.4. PCR em tempo Real	36
3.5. Dosagem de citocinas	38
3.6. Avaliação das variações de pressão arterial de cauda e batimentos cardíacos	38
3.7. Análise Estatística	39
4. Resultados	40
4.1. Citocinas plasmáticas (TNF, IL-1 β , MIP-1 α , CINC2 α/β)	41
4.2. Avaliação da especificidade do ensaio de NF- κ B no hipocampo e no cerebelo	46
4.3. Efeitos da nicotina crônica sobre a atividade do NF- κ B induzido por LPS no hipocampo e no cerebelo	47
4.4. Receptores nicotínicos	51
4.5. PCR em tempo real no hipocampo e no cerebelo	55
5. Discussão	59
5.1. Citocinas plasmáticas	60
5.2. Nicotina: efeitos na via do NF- κ B, TLR-4 e receptores nicotínicos	65

6. Conclusão	77
7. Referências	79
8. Apêndice	92

Lista de abreviaturas

AcP: <i>accessory protein</i>	LT α 3: <i>lymphotoxin-α3</i>
AP-1: <i>activator protein-1</i>	MAPK: <i>mitogen activated kinase protein</i>
Bax: <i>Bcl2-associated X protein</i>	MCP-1: <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
Bcl-2: <i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>	MECA: <i>mecamilamina</i>
Bcl-3: <i>B-cell CLL/lymphoma 3</i>	MIP-1 α : <i>macrophage inflammatory protein 1α</i>
BHE: <i>barreira hematoencefálica</i>	MLA: <i>metililaconitina</i>
CBP: <i>CREB binding protein</i>	nAChRs; <i>receptores neuronais de acetilcolina</i>
CD14: <i>CD14 molecule</i>	NF- κ B: <i>nuclear factor κB</i>
CINC: <i>cytokine induced neutrophil chemoattractant</i>	NMDA: <i>N-methyl-D-aspartate</i>
c-Myc: <i>cellular myelocytomatosis oncogene</i>	nNOS: <i>sintase do óxido nítrico neuronal</i>
COX-2: <i>ciclooxigenase-2</i>	NO: <i>óxido nítrico</i>
CXCR2: <i>chemokine C-X-C receptor-2</i>	PGE2: <i>prostaglandina E2</i>
E2F1: <i>E2F transcription factor-1</i>	PI3-K: <i>fosfatidil inositol 3 kinase</i>
eNOS: <i>sintase do óxido nítrico endotelial</i>	PLC: <i>fosfolipase c</i>
HMGB1: <i>high mobility group Box 1</i>	PTK: <i>protein tirosine kinase</i>
IKK: <i>IκB kinase</i>	RHD : <i>Rel homology domain</i>
IL-1: <i>interleucina-1</i>	STAT3: <i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
IL-1R: <i>receptor de interleucina 1</i>	TLR-2: <i>toll-like receptor 2</i>
IL-1ra: <i>antagonista de receptor de interleucina-1</i>	TLR-4: <i>toll-like receptor 4</i>
IL-6: <i>interleucina-6</i>	TNF: <i>fator de necrose tumoral</i>
iNOS: <i>sintase do óxido nítrico induzível</i>	TNFR1: <i>receptor de TNF 1</i>
IRF: <i>interferon- regulatory factor</i>	TNFR2: <i>receptor de TNF 2</i>
JAK2: <i>Janus activated kinase</i>	TRAIL: <i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
LPS: <i>lipopolissacarídeo</i>	

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1. Enantiômeros e produtos da biotransformação da nicotina.

Figura 2. Estrutura dos receptores nicotínicos neuronais.

Figura 3. Modelo de homologia das subunidades α/β e ligação à acetilcolina.

Figura 4. Domínios que tipificam a família do NF- κ B, I κ B e complexo IKK.

Figura 5. Translocação nuclear do fator de transcrição NF- κ B.

Figura 6. Reconhecimento do LPS e sinalização pela via do receptor TLR-4.

Figura 7. Vias colinérgicas no encéfalo de rato.

Figura 8. Citocinas plasmáticas (TNF, IL-1 β , CINC 2 α/β) para nicotina em diferentes concentrações (0,1; 0,3; 1,0 mg/kg).

Figura 9. Pressão sistólica e batimentos cardíacos dos animais tratados cronicamente com nicotina 1,0 mg/kg.

Figura 10. Citocinas plasmáticas (TNF, IL-1 β , CINC 2 α/β) no tratamento com nicotina 1,0 mg/kg.

Figura 11. Citocinas plasmáticas (TNF, IL-1 β , CINC 2 α/β , MIP-1 α) tratamento com nicotina crônica 0,1 mg/kg.

Figura 12. Ensaio de competição em extratos nucleares de cerebelo e hipocampo.

Figura 13. Ensaio de gel de retardo em extratos nucleares de cerebelo em diferentes doses de nicotina crônica (0,1; 0,3; 1,0 mg/kg).

Figura 14. Ensaio de gel de retardo em extratos nucleares de cerebelo e hipocampo sob o tratamento crônico com nicotina crônica 1,0 mg/kg.

Figura 15. Ensaio de gel de retardo em extratos nucleares de cerebelo e hipocampo sob o tratamento crônico com nicotina crônica 0,1 mg/kg.

Figura 16. Ensaio de gel de retardo para extratos nucleares de cerebelo e hipocampo no tratamento com o antagonista nicotínico mecamilamina e nicotina 0,1 mg/kg.

Figura 17. Ensaio de gel de retardo para extratos nucleares de hipocampo no tratamento com o antagonista nicotínico metililaconitina e nicotina 0,1 mg/kg.

Figura 18. PCR em tempo real dos genes de TNF, IL1B, NOS2 no hipocampo no tratamento com nicotina crônica a 0,1 mg/kg.

Figura 19. PCR em tempo real do gene da TLR4 no hipocampo para o tratamento com nicotina crônica a 0,1 mg/kg.

Figura 20. PCR em tempo real dos genes de IL1B no cerebelo no tratamento com nicotina crônica a 0,1 mg/kg.

Tabela 1. Classificação proposta para os receptores nAChRs no cérebro de ratos.

Tabela 2. Sequências dos genes TNF, IL1B, NOS2, TLR4 e HPRT e número de acesso no GenBank.

Resumo

A nicotina é um alcalóide extraído da planta do tabaco e age como agonista em neurônios e outras células que expressam receptores nicotínicos. Essa substância é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e mimetizar os efeitos da acetilcolina endógena ao interagir com os diferentes subtipos de receptores. O hipocampo e o cerebelo são regiões encefálicas ricas em receptores nicotínicos como o $\alpha 7$ e o $\alpha 4\beta 2$ que estão também envolvidos na progressão de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, e neuropsiquiátricas, como a esquizofrenia, ambas apresentando um contexto inflamatório. O lipopolissacarídeo (LPS) é um indutor inflamatório que age via receptor toll-4 (TLR-4) ativando, dentre outros, o fator de transcrição NF- κ B. Vários estudos têm demonstrado tanto *in vitro* quanto *in vivo* que a exposição crônica à nicotina inibe a resposta imune. Uma vez que o fator de transcrição NF- κ B regula a expressão gênica de diversos fatores que medeiam a plasticidade e o desenvolvimento neuronal e inflamação, nosso objetivo foi avaliar os efeitos da nicotina crônica sobre a via de sinalização induzida pelo LPS. Sendo assim, avaliou-se a translocação nuclear do NF- κ B, a expressão de indutores inflamatórios (TNF, IL-1 β e iNOS) e também do receptor TLR-4 tanto no hipocampo quanto no cerebelo. Além disso, foram determinados os níveis plasmáticos das citocinas TNF, IL-1 β , MIP-1 α , CINC2 α/β . Nossos resultados mostram que, periféricamente, o LPS induziu a produção das citocinas plasmáticas, mas a nicotina não foi capaz de reverter seus efeitos. Já no cerebelo e no hipocampo, a nicotina crônica (0,1 e 1,0 mg/kg) interferiu significativamente na translocação do NF- κ B induzida pelo LPS, levando inclusive a um bloqueio importante da expressão do mRNA de TNF, IL-1 β , iNOS no hipocampo, e de IL-1 β no cerebelo. Ademais, no hipocampo, a nicotina também interferiu na expressão do receptor TLR-4. A mecamilamina, antagonista heteromérico não-seletivo não foi capaz de reverter os efeitos da nicotina sobre o NF- κ B no hipocampo, mas o fez no cerebelo. Já o antagonista seletivo de receptor $\alpha 7$, metililaconitina, bloqueou a ação da nicotina no hipocampo.

Abstract

Nicotine is an alkaloid extracted from Tobacco plants, and it acts as an agonist in neurons and other cells that express nicotinic receptors. This substance crosses the blood brain barrier and mimics endogenous acetylcholine in interacting with various receptor subtypes. The hippocampus and cerebellum are brain regions rich in nicotinic receptors including $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ and other subtypes, involved in neurodegenerative and neuropsychiatric disorders, including Alzheimer disease and schizophrenia, respectively, in a neuroinflammatory context. The lipopolysaccharide (LPS) is a known inflammatory inducer that exerts its effects through the Toll-like receptor 4 (TLR-4) and activates the transcription factor NF- κ B. In the present work, we evaluate the effects of chronic nicotine on the nuclear translocation of NF- κ B, on the expression of NF- κ B regulated inflammatory inducers (TNF, IL-1 β and iNOS) and on the LPS-induced TLR4 mRNA expression in response to chronic nicotine treatment in hippocampus and cerebellum. In addition, we assessed the production of peripheral cytokines (TNF, IL-1 β , MIP-1 α , CINC 2 α/β). Our results demonstrate that LPS induced the production of peripheral cytokines but nicotine treatment did not interfere in their plasma levels. However, in cerebellum and hippocampus, chronic nicotine 1.0 and 0.1 mg/kg interfered in the LPS-induced NF- κ B leading to a deficient mRNA expression of its related genes TNF, IL-1 β and iNOS in hippocampus and of IL-1 β , in cerebellum. Chronic nicotine (0.1 mg/kg, s.c.) significantly interfered in the TLR4 mRNA expression in LPS-challenged animal group in hippocampus. The non-selective heteromeric antagonist mecamylamine (1.0 mg/kg s.c.) reverted the nicotine effects over NF- κ B nuclear translocation in cerebellum, but not in hippocampus. On the other hand, the $\alpha 7$ antagonist methyllycaconitine (MLA) (5.0 mg/kg i.p.) reverted the nicotine effects over NF- κ B in hippocampus but not in cerebellum. Nicotine prevents LPS effects, both in cerebellum and hippocampus, once it reduced significantly the nuclear translocation of NF- κ B and the expression of related pro-inflammatory cytokines. Besides, the nicotinic effects seem to be mainly mediated by heteromeric receptors in cerebellum and through $\alpha 7$ receptors in hippocampus.

1. Introdução

"All religions, arts and sciences are directed toward ennobling man's life, lifting it from the sphere of mere physical existence and leading the individual toward freedom."

Albert Einstein

1.1. A Nicotina

A nicotina, alcalóide extraído da planta do tabaco, é sintetizada nas raízes e transportada pelo caule até as folhas. Nas regiões mais altas e nas áreas próximas ao talo, armazenam-se suas maiores concentrações. Todavia, o conteúdo de nicotina varia com os tipos da planta, *Nicotiana rústica*, *Nicotiana glutinosa* e *Nicotiana penicilata*. As mais conhecidas são a *Nicotiana tabacum*, por ser suave e de aroma leve, e a *Nicotiana rústica*, mais forte e de paladar menos agradável, e que produz quantidades maiores de nicotina sendo cultivada na Rússia e em outros países asiáticos (Djordjevic & Doran, 2009)

Estruturalmente, a nicotina é uma amina terciária composta por anéis de piridina e pirolidina. No tabaco, os dois enantiômeros *L*-nicotina e *D*-nicotina estão permanentemente presentes sendo o primeiro 100 vezes mais ativo do ponto de vista farmacológico, constituindo 90% do total (Benowitz, 2009). No ato de fumar, a brasa do cigarro atinge em torno de 800°C e surgem formas racêmicas. Os enantiômeros da nicotina variam com as plantas do tabaco. Na *Nicotiana tabacum* encontram-se os mais importantes do ponto de vista farmacológico, como a anabasina, anabatina, nornicotina, miosina, N-metilanabasina nicotirina, nornicotirina. Nornicotina e anabasina possuem atividade semelhante à da nicotina, uma vez que são capazes de se ligar aos receptores nicotínicos e têm alta afinidade pelos que apresentam em sua composição os subtipos $\alpha 7$ e $\alpha 6$ (Mastropaolo *et al.*, 2004; Papke *et al.*, 2007). O tipo do tabaco, o modo e a frequência das tragadas influenciam na quantificação desses alcalóides. Os principais

metabólitos da nicotina, quantitativa e qualitativamente, são a cotinina e o óxido-N-nicotina (Figura 1) (Rosemberg, 2005). Vale lembrar que alguns vegetais da família das solanáceas como a batata, couve-flor, pimentão verde, tomate, e em alguns chás como o chá preto e o chá verde produzem nicotina, mesmo que em baixas quantidades. Além disso, ainda existe a possibilidade de contaminação de produtos agrícolas por alguns inseticidas que apresentam em sua composição a nicotina (Siegmund *et al.*, 1999).

Figura 1. A. Enantiômeros (formas racêmicas *D-L*), nornicotina e anabasina, com atividade semelhante à da nicotina. B. Estrutura química da nicotina (formas racêmicas *D-L*) e dos principais metabólitos (formas racêmicas *D-L*) provenientes de sua biotransformação, a cotinina e a N-óxonicotina.

Muitos trabalhos têm demonstrado que a nicotina é capaz de transpor a barreira hematoencefálica (BHE) e alterar a formação de microvilosidades da sua camada endotelial, reduzindo algumas junções celulares e até

atenuando os níveis e/ou a função de determinados receptores nicotínicos localizados na BHE (Abbruscato *et al.*, 2002). Perifericamente, a nicotina é oxidada no fígado via CYP2A6 (humanos) e CYP2B1 (ratos) formando a cotinina. Entretanto, ainda não está claro se a cotinina encontrada no encéfalo é proveniente do plasma periférico ou da metabolização central da nicotina. Dados obtidos *in vivo* sugerem que a presença da cotinina no SNC pode resultar da metabolização central da nicotina via CYP2B1, já que essa enzima também foi identificada no encéfalo de ratos, e que esse processo encontra-se aumentado após uma exposição crônica à nicotina (Jacob *et al.*, 1997; Lockman *et al.*, 2005).

1.2. Nicotina e os Receptores Nicotínicos Neurais

A nicotina possui efeito agonista nos neurônios e em outras células que expressam receptores de acetilcolina (nAChRs). Essa substância é capaz de atravessar a BHE e de mimetizar os efeitos da acetilcolina endógena interagindo com mais de um subtipo de receptor (Newman *et al.*, 2002).

O receptor nicotínico de acetilcolina, encontrado em diversos tecidos e em leucócitos, é um canal iônico que medeia a neurotransmissão em junções neuromusculares, gânglios autonômicos e em algumas regiões do sistema nervoso central, incluindo o núcleo colinérgico basal, telencefálico, núcleos colinérgicos pontinos dorsais e a habênula, cuja ativação é responsável pela potenciação das funções cognitivas, estimulação psicomotora, recompensa e analgesia (Zanardi *et al.*, 2002). Eles estão

localizados tanto pré quanto pós-sinapticamente e sua ativação pela acetilcolina gera abertura do canal permitindo a entrada de íons sódio e cálcio na célula e consequente saída de íons potássio (Romanelli & Gualtieri, 2003; Vaupel *et al.*, 2007). Esses receptores pertencem a uma família de canais iônicos que estão associados à modulação da liberação dos neurotransmissores dopamina, norepinefrina, GABA e glutamato (Wonnacott, 1997; Girod & Role, 2001; Newman *et al.*, 2002; Schapira *et al.*, 2002)

Como a maioria dos canais iônicos, os receptores nicotínicos são homo ou heteropentaméricos sendo que cada monômero pertence a um conjunto de 9 subunidades alfa ($\alpha 2$ a $\alpha 10$) e 3 subunidades beta ($\beta 2$ a $\beta 4$), expressos nos vertebrados, com cada uma dessas apresentando quatro domínios transmembrana (Albuquerque *et al.*, 2000; Picciotto *et al.*, 2000; Schapira *et al.*, 2002) (Figura 2). Esses receptores são bem conservados entre as espécies, com exceção da subunidade $\alpha 8$, identificada até o momento apenas em aves (Albuquerque *et al.*, 2009). Enquanto cada subunidade apresenta quatro domínios transmembrana, os sítios de ligação aos agonistas estão localizados na interface das subunidades. Tanto os ligantes naturais, como toxinas e o peptídeo β -amilóide (βA), quanto os sintéticos, peptídeos de apolipoproteínaE (Gay *et al.*, 2008) e outras moléculas, (Bhatti *et al.*, 2008) podem exibir diferentes afinidades pelos subtipos de receptor (Schapira *et al.*, 2002). Com base em propriedades farmacológicas, pelo menos duas classes de receptores nAChRs são expressos no SNC. Uma consiste daqueles que se ligam a agonistas nicotínicos com afinidade μM e à α -bungarotoxina compostos pelas

subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 7\alpha 8$, $\alpha 9$ e/ou $\alpha 10$ e os que se ligam à agonistas nicotínicos com afinidade nM mas não à α -bungarotoxina formados pelas combinações $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ ou $\alpha 6$ tanto com $\beta 2$ quanto com $\beta 4$ (ex., $\alpha\beta 2$ e $\alpha 3\beta 4$) e também com a participação das subunidades $\alpha 5$ ou $\beta 3$ (ex., $\alpha 4\alpha 2\beta 3$) (Zoli *et al.*, 1998; Gotti *et al.*, 2007).

Figura 2. Estrutura dos receptores nicotínicos neuronais. Pode-se observar os quatro domínios transmembrana e as subunidades α/β que compõem o receptor. A ligação do agonista no sítio de ligação presente na interface das subunidades leva à abertura do canal iônico e passagem de íons (Bate & Gardiner, 1999).

Diante disso, estudos revelaram a existência de quatro tipos comuns de receptores nicotínicos em diferentes combinações (Tabela 1): (I) subunidade $\alpha 7$ (homomérico ou heteromérico combinado com $\alpha 8$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\alpha 5$ ou $\beta 2$; (II) $\alpha 4\beta 2$ [$(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$, $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$, $(\alpha 4)_2(\beta 2)_2(\alpha 5)$] (III) $\alpha 3\beta 4\beta 2$; (IV)

$\alpha 2\beta 4/\alpha 4\beta 4$ (Girod *et al.*, 1999; Khiroug *et al.*, 2002; Albuquerque *et al.*, 2009).

O subtipo mais comumente encontrado no SNC é o heteromérico $\alpha 4\beta 2^*$ e o $\alpha 7$, enquanto que no sistema nervoso autônomo o subtipo $\alpha 3\beta 4^*$ parece predominar (os asteriscos representam outras subunidades que podem compor o pentâmero) (Figura 3). Estudos desenvolvidos por Turner e colaboradores (2005) demonstraram que o cerebelo do rato expressa, além de receptores $\alpha 7$, os receptores heteroméricos simples com duas subunidades distintas ($\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$) e quatro compostos por três subtipos diferentes ($\alpha 3\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\alpha 4\beta 4$, $\alpha 3\beta 2\beta 4$, $\alpha 4\beta 2\beta 4$), com cada um representando de 10 a 12% da população total de nAChRs. No cerebelo, esses receptores controlam a liberação de glutamato, GABA e norepinefrina (Didier *et al.*, 1995; Reno *et al.*, 2004). Já o hipocampo de ratos é uma região rica em receptores homoméricos e heteroméricos $\alpha 7$ ($\alpha 7\beta 2$), o que foi demonstrado por estudos utilizando os ligantes α -bungarotoxina e metililaconitina (MLA) (Orr-Urtreger *et al.*, 1997; Khiroug *et al.*, 2002). Além disso, encontram-se também as subunidades $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ (Jones *et al.*, 1999).

Figura 3. Modelo de homologia de quatro subunidades de receptores nicotínicos humanos nativos e sua interface ($\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\beta 4$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 7\alpha 7$). A acetilcolina apresenta-se retida no sítio de ligação ao agonista na interface dos monômeros $\alpha 4$ (subunidade 1) e $\beta 2$ (subunidade 2). Em cobre: subunidades α ; azul: subunidades β ; amarelo: sítio de ligação (Schapira *et al.*, 2002)

Do ponto de vista funcional, é importante compreender a composição dos receptores. Como exemplo, pode-se citar os receptores que contêm a subunidade $\alpha 7$, que apresentam alta permeabilidade ao Ca^{2+} , rápida dessensibilização e baixa afinidade à acetilcolina e nicotina. Já os que contêm as subunidades $\alpha 4\beta 2$ possuem maior afinidade à nicotina e à acetilcolina e dessensibilização mais lenta (Cordero-Erausquin *et al.*, 2000; Metherate, 2004; Suzuki *et al.*, 2006). Shytle e colaboradores (2004) descreveram a presença dos receptores $\alpha 7$ na microglia residente no encéfalo de ratos e seu envolvimento com a supressão da neuroinflamação.

Tabela 1. Classificação proposta para os receptores nAChRs no cérebro de rato.

Classe do receptor	Composição	Localização predominante no SNC	Ligantes de alta afinidade no equilíbrio	Farmacologia
Tipo 1	$\alpha 7$	Córtex e área límbica	α BTx	Sensível à α BTx e ao MLA, dessensibilização rápida
Tipo 2	$\beta 2$ - $\alpha 4$ -($\alpha 5$) $\beta 2$ -($\alpha 2$?) $\beta 2$ -($\alpha 3$?) $\beta 2$ -($\alpha 6$ - $\beta 3$?)	Todo SNC, $\alpha 5$ exceto cerebelo, pineal IPn Hipocampo Núcleo Catecolaminérgico	EPI>NIC=CYT=MCC=ACH	Insensível ao MLA, NIC>>CYT, DH β E=MECA
Tipo 3	$\beta 4$ - $\alpha 3$ - $\beta 2$ ($\alpha 5$?)	MHb, IPn, medula dorsal	EPI	Insensível ao MLA, CYT=NIC, DH β E<MECA A baixo decaimento a 100 μ M NIC.
Tipo 4	($\beta 4$ - $\alpha 4$) ($\beta 4$ - $\alpha 2$)	MHb lateral IPn dorsal	EPI>CYT>MCC=ACH	Insensível ao MLA, CYT=Nic, DH β E<MECA decaimento rápido a 100 μ M NIC.

ACH: acetilcolina; α BTx: α -bungarotoxina; MCC: metilcarbamilcolina; CYT: citisina; DH β E: diidro- β -eritroidina; EPI: epibatidina; IPn: núcleo interpeduncular; MECA: mecamilamina; MHb: habênula média; MLA: metilicaconitina; NIC, nicotina (Zoli *et al.*, 1998; Gotti & Clementi, 2004)

A exposição crônica à nicotina, como já se demonstrou em alguns trabalhos (Marks *et al.*, 1983; Schwartz & Kellar, 1983; Sanderson *et al.*, 1993) pode levar a um aumento dos receptores nicotínicos disponíveis. Este aumento já foi demonstrado em modelos animais e em indivíduos fumantes (Benwell *et al.*, 1988; Breese *et al.*, 1997; Perry *et al.*, 1999). Acreditava-se que a regulação positiva desses receptores poderia estar relacionada à dessensibilização dos nAChRs. Sendo assim, a nicotina administrada cronicamente converteria o receptor de uma forma ativa para a dessensibilizada caracterizando um mecanismo de adaptação para compensar a perda de função. Entretanto, estudos realizados *in vitro*, com

linhagens celulares sem estimulação colinérgica e consequentemente sem função a perder, refutam essa teoria (Whiteaker *et al.*, 1998). Aparentemente, essa regulação positiva dos receptores não é proveniente de uma alteração transcricional, mas sim de uma modificação da proteína ou dimerização das subunidades (Marks *et al.*, 1992), bem como de um recrutamento de estoque de receptores pré-existentes (Bencherif *et al.*, 1995).

Os subtipos de receptores respondem de maneira diferente ao tratamento crônico com nicotina. Os receptores $\alpha 4\beta 2$ e os $\alpha 3\beta 2$ apresentam-se mais sensíveis à regulação positiva e demoram mais para retornar aos níveis iniciais. Sugere-se que esses receptores sofrem maturação mais ineficiente e por isso são mais sensíveis à estimulação pela nicotina. Uma vez que esse alcalóide é capaz de atravessar a membrana celular, ele agiria sobre os receptores localizados no retículo endoplasmático acelerando a sua maturação (Darsow *et al.*, 2005; Sallette *et al.*, 2005). Já os receptores $\alpha 3/\alpha 4\beta 4$ são mais dificilmente regulados positivamente (Wang *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 2001), podendo até reduzir a sua quantidade (Nguyen *et al.*, 2003). Além disso, os receptores $\alpha 7$ também são regulados positivamente mas na presença de concentrações maiores de nicotina do que as necessárias para se obter o mesmo efeito com os receptores $\alpha 4\beta 2$ (Peng *et al.*, 1997).

1.3 Receptores nicotínicos e doenças neuropsiquiátricas

Estudos mostram que os receptores nicotínicos estão intimamente ligados às doenças de Alzheimer, de Parkinson e à esquizofrenia (Guan *et*

al., 2002; Pimlott *et al.*, 2004). A doença de Alzheimer (DA) caracteriza-se por uma neurodegeneração progressiva e atinge mais da metade dos indivíduos idosos que apresentam demência (Turner *et al.*, 2008). Há alguns anos, o neurotransmissor acetilcolina tornou-se foco na pesquisa para essa doença quando demonstrou-se que seus níveis encontravam-se baixos nesses pacientes e que isso estava associado à um déficit cognitivo importante. O hipocampo, o córtex frontal e a amígdala são regiões que recebem projeções colinérgicas fronto-basais e as células desse grupo são particularmente destruídas na DA (Pimlott *et al.*, 2004)

Os receptores $\alpha 7$ constituem um alvo terapêutico pelo seu potencial no processamento sensorial e na proteção celular (de Jonge & Ulloa, 2007) sendo que os níveis desses receptores em indivíduos com DA permanece estável ou apresenta uma perda modesta. Estudos realizados em cortes de hipocampo mostram que a subunidade $\alpha 7$ possui uma grande tolerância ao peptídeo βA , podendo inclusive interagir com ela e por isso apresenta uma perda de apenas 14% enquanto que os demais subtipos não- $\alpha 7$ atingem uma redução de 54% (Pettit *et al.*, 2001). Além disso, o bloqueio pré e pós-sináptico do receptor $\alpha 7$ possui implicações importantes na perda cognitiva da DA (Liu *et al.*, 2001). Ademais, estudos avaliando o número de sítios ligantes de alta afinidade para agonistas presentes em indivíduos com DA, demonstraram que o subtipo $\alpha 4\beta 2$ era bastante atingido no decorrer da doença (Warpman & Nordberg, 1995; Martin-Ruiz *et al.*, 1999; Wevers *et al.*, 2000). As placas amilóides estão circundadas por microglia e essas células são ativadas pelo peptídeo βA e iniciam um ciclo de síntese e liberação de citocinas (IL-1, IL-6 e TNF) induzindo a migração de monócitos pela BHE.

Tanto o fator de necrose tumoral (TNF) quanto a interleucina-1 (IL-1) podem aumentar a expressão da proteína precursora do amiloide e do peptídeo β A. Níveis elevados dessas citocinas foram identificados em pacientes com DA (Rainero *et al.*, 2004). Diante disso, estudos realizados com exposição à nicotina e também ao peptídeo β A reduziu o número de células mortas e também a formação de placas amilóides (Ono *et al.*, 2002; Utsuki *et al.*, 2002). Além disso, o bloqueio $\alpha 7$ com α -bungarotoxina, e de $\alpha 4\beta 2$, com dihidro-beta-eritroidina, inibiu os efeitos neuroprotetores (Kihara *et al.*, 1998). A administração aguda de nicotina melhorou o déficit visual dos pacientes com DA (Jones *et al.*, 1992) e a crônica induziu uma melhora na atenção (White & Levin, 2004).

No caso da esquizofrenia, alucinações e disfunções cognitivas são algumas das características presentes nessa doença (Andreasen, 1995). Uma mudança na quantidade de neurotransmissores como dopamina, serotonina, glutamato e ACh tem sido associadas à essa doença. Dados indicam uma queda nos níveis de receptores $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$ no hipocampo, no neocórtex e no estriado (Breese *et al.*, 2000; Leonard *et al.*, 2000; Levin *et al.*, 2002). Além disso, estudos mostram que 95% dos pacientes esquizofrênicos fumam, o que estaria minimizando os efeitos da queda nos níveis de nAChRs no cérebro (Freedman *et al.*, 2000). Mais ainda, fatores ambientais, como trauma, anoxia, e genéticos influenciam na resposta inflamatória e contribuem para essa doença uma vez que níveis plasmáticos de várias citocinas como a IL-1 β e a IL-6 estão aumentados (Hanson & Gottesman, 2005).

As disfunções colinérgicas também têm sido relacionadas aos pacientes com Parkinson (DP). Os distúrbios de movimento associados a essa doença vêm acompanhados de quedas nos níveis de dopamina, dos sítios para recaptação desse neurotransmissor no núcleo caudado, putâmen e queda na quantidade de sítios de alta afinidade para ligação de agonistas colinérgicos no estriado, refletindo em um déficit de receptores nessas regiões (Oishi *et al.*, 2007). Existem evidências de uma queda nos níveis da subunidade $\alpha 3$ no núcleo caudado, no córtex temporal e no hipocampo; da $\beta 2$ no córtex temporal e no hipocampo; aumento da $\alpha 7$ no córtex temporal mas nenhuma alteração nas subunidades $\alpha 4$ (Guan *et al.*, 2002; Quik *et al.*, 2007). Além disso, pacientes que apresentam essa doença possuem uma microglia ativada nas proximidades de neurônios da substância nigra e a sua inibição, com agentes como a naloxona ou tetraciclina minociclina, mostrou-se neuroprotetora em modelos animais de DP (Gao *et al.*, 2003; McGeer & McGeer, 2004). No caso da doença de Parkinson, a ativação dos receptores nicotínicos, pelo uso de *patches* e gomas de mascar contendo nicotina, induzem uma melhora no déficit motor dos indivíduos, como tremores e bradicinesia (Kelton *et al.*, 2000; Villafane *et al.*, 2007).

1.4. O fator de transcrição NF- κ B

Descrito em 1986 por Sen & Baltimore, o NF- κ B é um dímero, geralmente constituído pelas subunidades p65 (RELA) e p50 (NF- κ B1) (Baeuerle & Baltimore, 1996; Siebenlist, 1997). Além destas subunidades, outras constituem essa família, tais como a c-Rel (REL), RELB e p52 (NF- κ B2). Todas compartilham uma região de homologia amino-terminal REL

(RHD) e que são reguladas por oito membros da família do I κ B (Figura 4). Os dímeros de NF- κ B se ligam aos sítios κ B nos promotores ou indutores (*enhancers*) dos genes alvo. A transcrição de REL, RELB e p65 é regulada positivamente por domínios de transativação (TAD). Já a p50 e p52 não possuem esses TADs (Ghosh *et al.*, 1998; Carmody & Chen, 2007; Ghosh & Hayden, 2008).

Figura 4. Família do NF- κ B e do I κ B. São 7 as proteínas do NF- κ B p65, c-Rel, RelB, p105, p50, p100 e p52, todas possuem o domínio de homologia Rel (RHD). Essa região é responsável pela ligação ao DNA, dimerização e ligação das proteínas do I κ B às subunidades do NF- κ B. TAD são domínios de transativação localizados na região C-terminal. As regiões ricas em glicina (GRR) estão presentes nas proteínas p105 e p100 que indicam o processamento proteassômico para gerar a p50 e p52, respectivamente. As proteínas I κ B regulam a atividade transcricional do NF- κ B. Elas possuem repetições de ankirina (ANK) que medeiam a interação das proteínas do I κ B com a RHD do NF- κ B. LZ: *leucine zipper*; DD: *death domain*; PEST: *proline, glutamic acid, serine and threonine rich*; CC: *coiled-coil*; HLH: *helix-loop-helix*; NBD: NF- κ B-essential-modulator-binding domain; ZF: *zinc-finger*; BCL-3: B-cell lymphoma 3 (Carmody & Chen, 2007; Ghosh & Hayden, 2008).

O fator de transcrição NF- κ B é ativado em resposta a diferentes estímulos como glutamato, neurotrofinas, peptídeo β -amilóide, citocinas (ex. IL-1 e o TNF), glicocorticóides, produtos provenientes de vírus e bactérias, irradiação ultravioleta, sintase de óxido nítrico induzível (iNOS), ciclooxigenase tipo 2 (COX-2) dentre outros (O'Neill & Kaltschmidt, 1997). Quando não estimulado, o NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória, o I κ B. A família dessa proteína I κ B possui três grupos funcionais I κ B α , I κ B β e I κ B ε , presentes no citoplasma de células não estimuladas e que podem ser degradadas e novamente sintetizadas em resposta a algum estímulo. Além disso, existem as proteínas precursoras p100 e p105, podendo ser processadas para formar as subunidades p50 e p52 ou serem degradadas. Por fim, as I κ Bs mais atípicas, I κ B ζ , BCL-3 (B-cell lymphoma 3) e I κ BNS, geralmente não são expressas em células não estimuladas, mas podem ser induzidas e migrarem para o núcleo (Basak *et al.*, 2008; Ghosh & Hayden, 2008). Após uma estimulação celular, o I κ B α é ubiquitinado e sofre degradação proteassômica que permite a migração nuclear do NF- κ B. O complexo IKK, responsável pela fosforilação do I κ B, possui duas subunidades homólogas IKK α e IKK β e uma regulatória IKK γ (NEMO). Na via canônica, a qual envolve a ativação induzida por IL-1 e TNF, o IKK β parece ser suficiente para fosforilação do I κ B α , mais ainda, o IKK γ também participa de todas as vias canônicas, foco do presente trabalho. Este complexo impede a translocação do NF- κ B para o núcleo (Zandi *et al.*, 1997), portanto, a fosforilação e a degradação do I κ B são necessárias para

que ocorra a translocação desse fator de transcrição do citoplasma para o núcleo (Figura 5) (Palombella *et al.*, 1994; Baeuerle & Baltimore, 1996; Baldwin, 1996; Pickart, 1997)

Figura 5. Translocação nuclear do fator de transcrição NF-κB. Na presença de um estímulo inflamatório, o complexo IKK fosforila a proteína inibitória IκB ativando um sinal de ubiquitinação que levará a degradação proteossômica de IκB e conseqüente liberação do NF-κB. Esse fator de transcrição, no núcleo, irá se ligar ao seu sítio κB em promotores ou *enhancers* dos genes alvo induzindo a transcrição. A ubiquitinação da subunidade p65 levará a sua degradação e término da transcrição.

O interesse crescente no estudo deste fator de transcrição decorre da enorme quantidade de genes e processos celulares que o NF-κB regula, tais como: desenvolvimento, plasticidade, morte e defesa celular. Entre os genes regulados podemos citar: os envolvidos na síntese de enzimas, como da iNOS e da COX-2i e da enzima de defesa antioxidante, a superóxido dismutase; TNF; IL-1β; E-selectina; complexos de histocompatibilidade de classe I e II. Adiciona-se a este amplo espectro de ação, o fato de que vários genes virais são regulados pelo NF-κB, como por exemplo, os dos vírus da

imunodeficiência humana, relevante para o estudo de disfunções associadas à síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (Barnes & Karin, 1997; O'Neill & Kaltschmidt, 1997).

Experimentos envolvendo plasticidade e potenciação de longa duração sugerem uma função do NF- κ B na atividade sináptica e na plasticidade neuronal (Meberg *et al.*, 1996). Outros estudos relacionam a sua ativação a processos neurodegenerativos, como lesões obtidas por estimulações dopaminérgicas, doença de Parkinson e doença de Alzheimer (Kaltschmidt *et al.*, 1997). Estudos em nosso meio mostraram em cultura primária de células cerebelares que o peptídeo β A ativa este fator de transcrição através da via NMDA-p21ras-MAPK/PI3-K (Kawamoto *et al.*, 2005). Portanto, existe uma relação forte entre a sinalização glutamatérgica e a ativação do NF- κ B no SNC.

1.5. LPS, Receptores Toll-4 e NF- κ B

Um importante indutor inflamatório que ativa o NF- κ B, e amplamente utilizado em estudos *in vitro* e *in vivo*, é o LPS. Essa molécula é uma endotoxina presente na membrana externa de bactérias Gram-negativas e possui três regiões distintas: o lipídeo A, estrutura necessária para a inserção na camada externa da bicamada lipídica; um centro covalente (*core*) e uma cauda polissacarídica ligada ao *core*. Essa cauda constitui o antígeno-O das bactérias Gram-negativas e cada monossacarídeo confere uma especificidade sorológica a esse componente. As propriedades endotóxicas do LPS residem basicamente no lipídeo A (Zughaier *et al.*,

2005), região conservada e que é alvo de reconhecimento pelos receptores, uma vez que essa toxina exibe uma grande variabilidade nas diferentes linhagens bacterianas (Jerala, 2007).

Para que o LPS seja reconhecido pelo sistema imune, são necessárias algumas proteínas intermediárias. Inicialmente a toxina é detectada pela proteína LBP (*LPS binding protein*) e em seguida um de seus monômeros é transferido para o co-receptor CD14, que a leva até a proteína acessória MD-2, que pode estar sob a forma solúvel ou associada a um domínio extracelular de TLR-4. A formação do complexo LPS:MD-2:TLR-4 encerra o reconhecimento extracelular da toxina. Isso inicia uma cascata de sinalização intracelular por meio de adaptadores como o MyD88-TIRAP, ativado a partir da membrana plasmática, e TRIF-TRAM induzido após a internalização do receptor em endossomos (Kagan *et al.*, 2008) podendo culminar na ativação do NF- κ B, do AP-1 e de fatores reguladores de interferon (IRF) (Husebye *et al.*, 2006) (Figura 6).

Os receptores Toll pertencem a uma superfamília conhecida como IL-1R/TLR em que todos os membros possuem um domínio citoplasmático conhecido como Toll/IL-1R *resistance domain* (TIR). Dentre os Toll, o TLR-4 é o que reconhece o LPS (Nadeau & Rivest, 2000; Conze *et al.*, 2008), e o único receptor, até o momento, capaz de ativar duas vias independentes: uma ativada por MyD88 que leva à produção de citocinas inflamatórias, e outra ativada por TRIF, responsável pela indução da produção de IFN-1 (Barton & Medzhitov, 2003). Além disso, também é o único que recruta os quatro adaptadores que possuem o domínio TIR (O'Neill & Bowie, 2007).

Figura 6. Reconhecimento e sinalização induzida pelo indutor inflamatório LPS. Inicialmente a toxina é detectada pela proteína LBP (*LPS binding protein*) e transferida para o co-receptor CD14, que a leva até a proteína acessória MD-2. Essa proteína induz uma mudança conformacional em TLR-4. Isso inicia uma cascata de sinalização intracelular por meio de adaptadores como o MyD88-TIRAP, ativado a partir da membrana plasmática que induz a ativação do NF- κ B, e de TRIF-TRAM induzido após a internalização do receptor em endossomos induzindo fatores reguladores de interferon (IRF).

Glezer e colaboradores (2003) mostraram que o LPS é capaz de induzir a translocação nuclear do NF- κ B em diversas estruturas do SNC (hipocampo, hipotálamo, cerebelo, córtex frontal, estriado), com pico de ativação máxima ocorrendo 2 horas após o estímulo. Estes estudos também mostraram que a ativação do NF- κ B pelo LPS ocorre via receptor

glutamatérgico NMDA e óxido nítrico (NO), uma vez que quando os animais foram tratados com MK-801 (antagonista de receptor NMDA) e/ou 7-Ni (7-nitroindazol, inibidor da enzima nNOS), observou-se uma atenuação da resposta obtida.

O NO é um mediador inflamatório, com potencial ação tóxica tecidual, sendo um radical livre, inorgânico, gasoso e com baixo peso molecular. Várias isoformas NOS já foram isoladas (Bredt & Snyder, 1992; Janssens *et al.*, 1992; Lyons *et al.*, 1992) possuindo variações quanto à localização intracelular, estrutura, regulação e função. Funcionalmente, as NOS são classificadas de acordo com sua expressão constitutiva, NOS neuronal (nNOS ou NOS-I) ou endotelial (eNOS ou NOS-III), e induzida (iNOS ou NOS-II) (Koyama *et al.*, 2002).

A iNOS, a qual é ausente (ou pelo menos não detectada) em células não estimuladas, tem sua expressão aumentada por vários estímulos, tais como o LPS e citocinas, e independe da presença de Ca^{2+} /calmodulina. A iNOS foi descrita em macrófagos (Marletta *et al.*, 1988), células da glia (Garthwaite & Boulton, 1995), células da musculatura lisa vascular (Busse & Mulsch, 1990), células endoteliais (Kilbourn & Belloni, 1990), células mesangiais do rim (Pfeilschifter *et al.*, 1991) e hepatócitos (Billiar *et al.*, 1990). Uma vez expressa, esta enzima gera quantidades apreciáveis de NO por um período grande de tempo. A quantidade de NO produzida por essa enzima é maior do que a sintetizada pelas formas constitutivas. Acredita-se que a alta concentração (nanomoles) de NO produzido, tenha efeitos tóxicos importantes e contribua para o

desenvolvimento da lesão tecidual observada em várias infecções. Existem evidências de que a expressão da iNOS seja regulada, também, a partir de sistemas intracelulares os quais envolvem a fosforilação e a ativação do fator de transcrição NF- κ B pelo estresse oxidativo (Ouaaz, 1995).

Além disso, células do SNC incluindo astrócitos, microglia, oligodendrócitos e neurônios e os macrófagos, periféricamente, são capazes de participar da resposta imune local produzindo e respondendo a citocinas, como TNF e IL-1 β , foco do presente trabalho, envolvidas na cascata de sinalização que envolve o NF- κ B (Carlson *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2004).

O TNF é uma citocina considerada “sentinela” já que inicia a resposta de defesa inicial. Em altas concentrações ela pode levar a um choque séptico e lesão de órgãos (Choi *et al.*, 2005). O TNF amplifica e prolonga a resposta inflamatória induzindo a produção de outras citocinas IL-1, interferon- γ e IL-2 que, por sua vez, também induzem TNF. Além disso, ativa outras células que liberam HMGB1 (*high mobility group B1*) e outros mediadores como eicosanóides, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio. Dois são os receptores responsáveis pelo seu reconhecimento, TNFR1 e TNFR2 que são glicoproteínas que se ligam especificamente ao TNF e ao LT α 3, mas diferem nos perfis de expressão, afinidade pelo ligante, estrutura citoplasmática e mecanismos de sinalização. Os efeitos mediados pelo TNF podem levar à ativação alternativa do NF- κ B ou a apoptose, dependendo do estado metabólico da célula. Por fim, o TNF também induz reguladores como IL-10, prostaglandinas e corticosteróides que geram um

feedback negativo que inibe a transcrição do seu mRNA (Chan *et al.*, 2000; Tracey *et al.*, 2008).

A interleucina-1 constitui uma família de proteínas, sendo que IL-1 α e IL-1 β aparentemente agem pelo mesmo receptor IL-1R1 que necessita de uma proteína acessória (AcP) para induzir a via de sinalização. O terceiro membro dessa família é o antagonista de receptor IL-1 (IL-1ra), que age como um antagonista seletivo, e acredita-se que bloqueie completamente as ações da IL-1 (Gibson *et al.*, 2004). A clivagem e liberação da proteína ativa IL-1 β é catalisada pela caspase-1, uma das enzimas pertencentes a uma família de mediadores centrais da apoptose (Nicholson & Thornberry, 1997). Todos os membros da família IL-1 são produzidos pelas células encefálicas, mas a primeira a expressá-las é a microglia, porém os astrócitos, as células vasculares e os neurônios também o fazem. IL-1 α e IL-1 β agem da mesma forma ligando-se ao receptor IL-1R1 (Sims *et al.*, 1988). A ligação resulta na ativação de uma série de proteínas adaptadoras intracelulares, MAPK e NF- κ B. A ativação da IL-1 induz febre e leva à ativação da microglia, indução de óxido nítrico e de ácido aracdônico, prostaglandinas e outros eicosanóides, proteínas de fase aguda (β -amilóide) expressão de moléculas de adesão, ativação do sistema complemento, dentre outros (Touzani *et al.*, 1999).

O LPS também induz a produção de CINC 2 α/β (*cytokine induced neutrophil chemoattractant*) (equivalente à IL-8 em humanos), e MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein*). As CINC se ligam a receptores CXCR2, que são comuns a todos esses subtipos de quimiocinas, e são responsáveis pelo grande influxo de neutrófilos em situações de inflamação

como glomerulonefrite, lesões nos pulmões e inflamações alérgicas. Além disso, demonstrou-se que das duas isoformas, a CINC 2α apresenta papel dominante no recrutamento dos neutrófilos em comparação com a CINC 2β (Amano *et al.*, 2000). A ação sobre os neutrófilos dos três subtipos conhecidos de CINC (1, 2 e 3) são similares tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Demonstrou-se em cultura de hepatócitos (Kaibori *et al.*, 2006) e também *in vivo* (Liu *et al.*, 1999; Tian *et al.*, 2003) que essa quimiocina é regulada pelo NF- κ B. A MIP-1 α é uma quimiocina capaz de induzir o acúmulo de leucócitos, gerar fissuras nos capilares e lesão tecidual aguda, podendo gerar mortalidade em casos de endotoxemia (Brueckmann *et al.*, 2004). Ela é ativada por fatores que induzem os macrófagos como endotoxinas e IFN- γ , sendo regulada negativamente por agentes anti-inflamatórios como prostaglandina E2 (PGE2). Ela é quimiotática para neutrófilos, entretanto menos eficiente do que a CINC (Shanley *et al.*, 1997; Takano & Nakagawa, 2001), e para monócitos. Além disso, essa quimiocina faz parte de uma classe de genes de resposta rápida e é regulado pelo NF- κ B (Grove & Plumb, 1993; Brueckmann *et al.*, 2004).

1.6. Vias colinérgicas, nicotina e sistema imune

As vias colinérgicas centrais regulam principalmente funções globais no córtex como atenção, despertar, motivação, memória e consciência. A região fronto-basal do encéfalo apresenta dois grupos de neurônios colinérgicos: 1. complexo septo-medial (núcleo septo-medial [ms] e banda vertical-diagonal [vdb]) que projetam axônios colinérgicos para o hipocampo

e giro parahipocampal e 2. complexo do núcleo basal (núcleo basal [bas], substância inominada [si] e banda horizontal diagonal [hdb]) que projetam seus axônios para todas as partes do neocórtex, córtex límbico e amígdala. Os neurônios pontomesencefálicos (tegmento latero-dorsal [ldt] e núcleo pedunculopontino [ppt] projetam para a porção posterior do cérebro, tálamo, hipotálamo e região fronto-basal (Figura 7) (Metherate *et al.*, 1992; Woolf, 1996).

Figura 7. Vias colinérgicas no encéfalo de rato. Os núcleos colinérgicos originam-se no núcleo septo-medial [ms], banda vertical-diagonal [vdb], núcleo basal [bas], substância inominada [si] e banda horizontal diagonal [hdb], tegmento latero-dorsal [ldt] e núcleo pedunculopontino [ppt] projetando seus axônios por todo o córtex. Adaptado de (Woolf, 1991)

A via anti-inflamatória colinérgica é o mecanismo fisiológico pelo qual o sistema nervoso interage com o imune inato de forma a regular a resposta inflamatória (Gallowitsch-Puerta & Pavlov, 2007). O nervo vago, que pertence ao sistema nervoso autonômico parassimpático, regula algumas funções vitais como batimento cardíaco, função gastrointestinal e

broncoconstrição por meio do seu principal neurotransmissor, a acetilcolina, além de outras substâncias (Pavlov & Tracey, 2004). Estudos mostram que o nervo vago eferente inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1 β e IL-6 (Ghia *et al.*, 2006). Agonistas colinérgicos como a própria acetilcolina, carbacol e nicotina inibem a produção desses mediadores inflamatórios em macrófagos tanto humanos quanto de murinos (Ulloa & Wang, 2007)

Diante disso, diversos trabalhos passaram a utilizar agonistas colinérgicos como a nicotina, que se mostrou mais eficiente do que a própria acetilcolina (Wang *et al.*, 2003). Estudos realizados em cultura de células demonstraram que o pré-tratamento com nicotina protege contra a neurotoxicidade induzida por glutamato em neurônios estriatais, corticais, cerebelares e mesencefálicos (Maggio *et al.*, 1998; Minana *et al.*, 1998). Além desses estudos avaliando os danos oxidativos, o uso crônico da nicotina tem sido objeto de outras abordagens. Uma delas diz respeito ao sistema imune. Existem várias evidências mostrando seu envolvimento na inibição das atividades imunológicas tanto celular quanto humoral, atuando, portanto, como agente imunossupressor. A administração subcutânea crônica de nicotina a ratos (3-4 semanas) produziu uma queda nos níveis de resposta inflamatória, além de diminuir a resposta à anticorpos e à sinalização mediada por receptores de células T (Piubelli *et al.*, 2005). Madretsma e colaboradores (1996) demonstraram que a nicotina inibe em torno de 50% a produção de IL-2 e do TNF em células mononucleares não-aderentes. Sasagawa e colaboradores (1985) avaliaram a ação da nicotina nas células polimorfonucleares e sugerem que a nicotina causa uma

supressão de suas funções. Esses resultados são corroborados por Pabst e colaboradores (1995) que mostraram inibição da atividade antimicrobiana de neutrófilos expostos à nicotina.

Singh e colaboradores (2000) demonstraram que ratos expostos cronicamente à fumaça do cigarro ou à nicotina exibiam uma anergia e queda na proliferação das células T. Tanto a administração crônica quanto a aguda de nicotina regulam a proliferação celular das células T por meio de nAChRs. A administração aguda de nicotina leva a uma queda na proliferação mitótica das células periféricas sanguíneas induzida pelas células T, sendo que a administração crônica induz tolerância podendo reverter esses efeitos. Esses efeitos estão relacionados a uma queda na resposta ao Ca^{2+} na ligação aos receptores de células T (TCR) e ativação constitutiva da proteína tirosina quinase (PTK) e da atividade da fosfolipase C (PLC). Em contraste com o observado na resposta crônica, a administração aguda de nicotina não suprime a resposta ao cálcio mediada por TCR e nem causa ativação constitutiva de PTK e PLC nos linfócitos sanguíneos. Esse tratamento também gerou um aumento na quantidade de corticosterona plasmática sendo esse aumento também inibido pelo tratamento com mecamilamina (MECA – inibidor não seletivo heteromérico de nAChRs).

O estudo das alterações do proteoma induzidas pela nicotina permite um melhor entendimento de suas propriedades neuroimunomodulatórias e de seu impacto na patogênese de doenças inflamatórias. Assim, Piubelli e colaboradores (2005), investigaram o soro e os leucócitos de ratos

submetidos à administração crônica de nicotina. Foi observada a expressão de 15 proteínas diferentes, envolvidas em uma variedade de vias metabólicas e celulares, incluindo resposta de fase aguda, sugerindo um efeito nas cascatas inflamatórias e de forma mais geral, no sistema imune, no estresse oxidativo e na estrutura e regulação do citoesqueleto. As alterações observadas implicam em uma redução geral na resposta inflamatória com um concomitante desequilíbrio no estresse oxidativo no sistema periférico e apontam para uma série de marcadores potenciais para o SNC.

Outros estudos relacionados à inflamação pelo vírus influenza mostraram que a nicotina suprime a migração dos leucócitos para o sítio de infecção, aumentando os níveis desse vírus no pulmão o que indica uma contribuição negativa dessa substância na cicatrização e estímulo ao aumento na incidência de doenças respiratórias entre fumantes (Razani-Boroujerdi *et al.*, 2004).

Sugano e colaboradores (1998) avaliaram a ação da nicotina na produção de IL-1 β , IL-8 e de prostaglandina E2 (PGE2), induzidos por LPS em células U937. A nicotina apresentou um efeito inibitório na produção de IL-1 β , IL-8 e de PGE2, a qual mostrou ser modulada pelo fator de transcrição NF- κ B. Os autores concluem que estes resultados estão de acordo com o aumento da susceptibilidade às infecções que ocorre em fumantes, e pela diminuição da susceptibilidade a algumas doenças imunes, tais como a colite ulcerativa.

Seguindo a mesma abordagem de avaliação dos efeitos da nicotina na presença do estímulo inflamatório com LPS, Patton e colaboradores (2006), com o intuito de avaliar os danos no endotélio vascular, estudaram os efeitos da nicotina e do LPS, tanto isoladamente quanto em conjunto, na expressão de IL-6, IL-8, do fator quimiotático de indução de neutrófilos (GRO- α) e da proteína quimioatrativa de monócito 1 (MCP-I) em linhagens da célula endotelial de artéria coronária humana e de monócitos pulmonares. Observou-se, em ambas as linhagens celulares, que o LPS, sozinho, aumentou a atividade desses mediadores, enquanto que o tratamento com a nicotina isoladamente praticamente não gerou efeitos. Em tratamento conjunto, houve uma inibição significativa na produção de citocinas e de quimiocinas. Acredita-se, dessa forma, que a nicotina pode limitar o dano imposto pela endotoxina, mas ao mesmo tempo suprimir a atividade antimicrobiana do sistema imune.

2. Objetivos

O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da administração crônica de nicotina sobre a atividade do fator de transcrição NF- κ B. Também foi avaliada a expressão gênica dos mediadores inflamatórios TNF, IL-1 β , iNOS e do receptor TLR-4 induzidos pela endotoxina bacteriana LPS (lipopolissacarídeo) no hipocampo e cerebelo.

3. Materiais e Métodos

“He who loves practice without theory is like the sailor who boards ship without a rudder and compass and never knows where he may cast.”

Leonardo da Vinci

3.1. Animais

Ratos machos Wistar adultos (200-350 g), provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas I da Universidade de São Paulo, foram mantidos em ciclo de 12 horas claro/escuro com acesso livre a ração e água. Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos para pesquisa com animais adotados pelo Instituto de Ciências Biomédicas e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo de Pesquisa número 896/06) (Apêndice 1).

3.2. Tratamentos crônicos

Os animais foram tratados subcutaneamente (s.c.) durante 14 dias com nicotina (1,0; 0,3; 0,1mg/kg) [(-)-*nicotine hydrogen tartrate salt* #N5260 Sigma] ou salina 0,9% sendo, no 15º dia, desafiados com LPS (*Escherichia coli* O111:B4 Sigma #L-2630) a 1,0 mg/kg (i.v.) ou salina 0,9%. Os tratamentos com o antagonista heteropentamérico não-seletivo de receptores nicotínicos, mecamilamina (MECA), foram realizados na dose de 1,0 mg/kg (s.c.) (Papke *et al.*, 2008) 40 minutos antes da dose diária de nicotina durante os 14 dias. O antagonista nicotínico $\alpha 7$, metililaconitina (MLA), foi administrado na dose de 5,0 mg/kg (i.p.) (Turek *et al.*, 1995) 30 minutos antes da dose diária de nicotina, durante 14 dias. Os tratamentos foram realizados entre 9:00 e 10:00 horas da manhã. No 15º dia, os animais receberam LPS (i.v.) e decorridas 2 horas da infusão de LPS/salina (Glezer *et al.*, 2003), os animais foram decapitados e o encéfalo rapidamente

retirado e mergulhado em solução gelada de tampão salina-fosfato. As estruturas encefálicas, cerebelo e hipocampo, foram dissecadas e congeladas em gelo seco e posteriormente armazenadas em freezer -80°C, até a preparação dos respectivos extratos nucleares.

3.3. Ensaio de gel de retardo (EMSA-*Gel shift*)

Este ensaio consiste na reação de ligação de proteínas do extrato nuclear com uma sequência de nucleotídeos específica para o fator de transcrição em questão marcada com ^{32}P pela enzima T4 polinucleotídeo quinase (Invitrogen®). Quando o meio reacional é submetido a uma eletroforese em gel de poliacrilamida, a sonda livre (oligonucleotídeo) migra mais que a sonda ligada ao fator nuclear (banda de retardo).

➤ Extração de proteínas nucleares

O método usado foi descrito em Glezer *et al.*, (2003). As estruturas (aproximadamente 100 mg) foram descongeladas e homogeneizadas, com auxílio de homogeneizadores a pilha, em tampão fosfato-salina contendo tampão de lise (HEPES 10mM; MgCl_2 1,5mM; KCl 10mM; PMSF 0,5mM; ortovanadato 3mM e DTT 0,5 mM) sendo, posteriormente, incubadas em gelo durante 10 minutos. Em seguida, adicionou-se NP-40 10% agitando-se vigorosamente o tubo por aproximadamente 10 segundos. O tubo foi então centrifugado à 12.000g por 1 minuto a 4°C. Ressuspendeu-se o *pellet* em tampão de extração (HEPES 20mM; glicerol 25%; MgCl_2 1,5mM; NaCl 300mM; EDTA 0,25mM; ortovanadato 3mM; PMSF 0,5mM; DTT 0,5 mM) e incubado por 20 minutos em gelo. O extrato foi centrifugado à 12.000g por

20 minutos a 4°C recolhendo-se o sobrenadante que corresponde ao extrato nuclear. A concentração de proteínas foi determinada por ensaio de Bradford (BioRad®) e o extrato armazenado a -20°C para uso posterior.

➤ Marcação e Purificação da Sonda

O oligonucleotídeo de DNA contendo a sequência para o fator de transcrição NF-κB, foi marcado radioativamente adicionando-se γ -³²P ATP a uma solução contendo Tampão T4 quinase, enzima T4 quinase e água, nas concentrações de: 3,5 pmol de oligonucleotídeo, 1U/μL de enzima T4 quinase, 1 μL de γ -³²P ATP (3Ci/mmol), 1 μL de tampão T4 Kinase Buffer (10 X) em 10 μL de volume de reação. Após incubação à 37° C x 10 minutos, o excesso de γ -³²P ATP foi retirado com resina Sephadex G-25 da seguinte forma: aumentou-se o volume da sonda para cerca de 30 μL com água autoclavada e ressuspendeu-se a resina gentilmente. Em seguida, abriu-se um pouco a tampa da coluna e quebrou-se a sua porção final. As colunas [Microspin G-25 (GE Healthcare®)] foram colocadas com a tampa levemente frouxa em um tubo de microcentrifuga e centrifugadas por 1 minuto a 3.000 rpm. A seguir transferiu-se a coluna para um novo tubo e aplicou-se a sonda marcada no centro da resina. Centrifugou-se nas mesmas condições e recolheu-se o eluato. No dia do ensaio a atividade da sonda foi determinada, e usou-se aproximadamente 25.000 – 50.000 cpm/μL.

➤ Preparação do Gel

Utiliza-se gel de poliacrilamida 5,5% (acrilamida/bisacrilamida (37,5:1). O gel é preparado contendo TBE 0,5X (Tris 45mM ácido bórico

45mM EDTA 0,5mM) glicerol 2,5%. Para a eletroforese é usado um tampão de corrida consistindo em 0,5X TBE. O gel deve ser pré-corrido por 30 minutos à 150V.

➤ Reação de ligação e Corrida do Gel

Para o ensaio de ligação adicionou-se em um tubo de microcentrífuga: 4 μ L de tampão de ligação 5X (MgCl₂ 5mM; EDTA 2,5mM; DTT 2,5mM; NaCl 300mM; Tris-HCl 50mM pH 7,5; Poly dIdC 0,25 μ g/ μ L; glicerol 20%); extrato nuclear (10 μ g ou mais de proteína) e H₂O q.s.p. para 20 μ L de volume final (contando com a adição da sonda marcada). A reação foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente, adicionou-se em seguida a sonda marcada (1 μ L), e procedeu-se a uma nova incubação por 30 minutos a temperatura ambiente. A visualização da migração protéica no gel foi acompanhada pela adição de 2 μ L de tampão de corrida com azul de bromofenol 10X) à sonda não incubada com extrato nuclear (controle negativo). O conteúdo total da reação foi aplicado no gel de poliacrilamida. Para a eletroforese utilizou-se um tampão de corrida consistindo em 0,5X TBE (10X TBE = Tris 90mM, ácido bórico 90mM, EDTA 10mM). O tempo de eletroforese foi de aproximadamente de 2 horas a 150-160 V. Ao final da corrida, o gel foi submetido à secagem no aparelho Model 583 Gel Dryer-BioRAD[®]. Em seguida, o gel foi exposto ao filme Kodak[®] BioMax[™] em armazenado em cassete a -80° C por 5 dias (variável). A revelação do filme foi feita em sala escura, mergulhando-se sucessivamente em solução reveladora Kodak[®] durante 5 minutos, depois em água para retirar o excesso

dessa solução e por fim em solução fixadora Kodak® durante 10 minutos, de acordo com as instruções do fabricante.

3.4. PCR em tempo Real

➤ Extração do RNA

Todo o material utilizado deve estar RNase *free*. A homogeneização dos tecidos foi feita em TRIzol® (Invitrogen) seguindo-se as determinações do fabricante. Em resumo, adicionou-se 1mL do reagente para a homogeneização e aguardou-se 5 minutos em temperatura ambiente. Para separação das fases, adicionou-se clorofórmio (24 partes de clorofórmio: 1 parte de álcool isoamílico), seguido de agitação e incubação por 10 minutos, em temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 12.000g por 15 minutos a 4°C. Foram coletados 300 µL da fase superior e adicionou-se 200 µL de isopropanol deixando-se 30 minutos a -20°C. Em seguida, centrifugou-se a 12.000g por 10 minutos a 4°C. Para lavagem do *pellet* foram adicionados 500 µL de etanol a 95% com posterior centrifugação a 7.500g, por 5 minutos, a 4°C. Essa etapa foi repetida com etanol a 75% e em seguida os tubos foram deixados aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente para secagem do etanol restante no *pellet*. O *pellet* foi então ressuspendido em água Milli-Q autoclavada, cuidadosamente, com auxílio de uma pipeta e armazenado a -80°C. A quantificação do RNA foi feita em NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Em seguida, procedeu-se ao gel de integridade em agarose 1%, para visualização das condições do produto extraído.

➤ Preparação do cDNA

Utilizou-se 3µg de RNA com 40u de inibidor de ribonuclease Ribolock (Fermentas®), DNase I 1uL, 5x tampão de reação 1 mL, Oligo (dT)18 0.5 µg, dNTPs Mix 10mM 1 µL (Fermentas®). Essa reação foi incubada a 37°C por 10 min, 75°C por 5 min (para inativar a DNase) e 37°C por 2 min. Após este período, adicionou-se 20 u de transcriptase reversa M-Mulv (Fermentas®) à reação incubando-a a 37°C por 1h, 75°C por 15 min, 37°C por 2 min e 4°C por 15 min. O cDNA foi armazenado a -20°C.

➤ PCR em tempo Real

O cDNA preparado com 3 µg de RNA foi diluído na proporção 1:10 (essa diluição pode variar de 1:10 a 1:30). Dessa diluição retirou-se 3 µL para montagem da placa, que foram somados a 3µL de primer a 0,3 µg e 6 µL de Sybr®green mix (2x) (*Applied Biosystems*). Em seguida procedeu-se ao ensaio com denaturação a 94°C por 10 minutos e anelamento a 60°C por 1 min, 40 ciclos. Os genes avaliados nesses ensaios estão listados na tabela 2 (*Bioneer Oligo Synthesis Report*).

Tabela 2. Sequência dos genes analisados por PCR em tempo real e respectivos números de acesso ao GenBank.

Genes	Primer	Número de acesso ao GenBank
TNF <i>Tumor necrosis factor</i>	F-GTAGCCACGTCGTAGCAAAC R-CTGGCACCAGTAGTTGGTTGTCT	NM012675
IL1B <i>Interleukin 1, beta</i>	F-AAGATGAAGGGCTGCTTCCA R-ATGAGTGATACTGCCTGCCTGAA	NM 031512
NOS2 <i>Nitric oxide synthase 2, inducible</i>	F-CTTGGTGAAAGCGGTGTTCT R-GAAGGCGTAGCTGAACAAGG	NM 012611
TLR4 <i>Toll-like receptor 4</i>	F-TCACAACCTTCAGTGGCTGGA R-TCCTGGGGAAAACTCTTGA	NM 019178
HPRT <i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>	F-GCTGAAGATTTGGAAGGTGT R-ACAGAGGGCCACAATGTGAT	NM 012583

3.5. Dosagem de citocinas

Para realizar a quantificação das citocinas (IL-1 β), quimiocinas (CINC 2 α/β ou IL-8; MIP-1 α) do TNF e VEGF, o sangue do tronco foi recolhido após a decapitação dos animais em tubos de vidro contendo EDTA 8% (LabNew). Centrifugou-se o sangue a 3.000g durante 15 minutos para separação do plasma. Após isso, procedeu-se a ensaios de ELISA com o Kit DuoSet da R&D Systems seguindo instruções do fabricante.

3.6. Avaliação das variações de pressão arterial de cauda e batimentos cardíacos

As medidas de pressão de cauda e os batimentos cardíacos dos grupos experimentais tratados com nicotina crônica a 1,0 mg/kg foram

obtidas, de 3 em 3 dias, 2 horas após a infusão realizada no dia e durante os 15 dias de tratamento. Para isso, utilizou-se a técnica de pletismografia de cauda (LE 5001, Panlab s.l.Barcelona, Espanha). Os valores de ambas as medidas representam a média aritmética de 15-20 medidas coletadas de cada animal.

3.7. Análise Estatística

Os dados referentes aos tratamentos crônicos com nicotina e desafio com LPS (EMSA, ELISA) foram analisados pelo método Two-way ANOVA seguido do teste Newman-Keuls. Os dados relativos aos tratamentos crônicos de dose resposta de nicotina (EMSA e ELISA) e de pletismografia de cauda foram analisados por One-Way ANOVA seguido do teste Newman-Keuls. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

4. Resultados

“Our doubts are traitors and make
us lose the good we oft might win
by fearing to attempt.”

William Shakespeare

4.1. Citocinas plasmáticas (TNF, IL-1 β , MIP-1 α , CINC2 α/β)

Visando-se avaliar se o LPS foi capaz de induzir a produção sistêmica de determinadas citocinas inflamatórias e se a administração crônica de nicotina interferiria nessa atividade, os níveis plasmáticos de TNF, IL-1 β , CINC2 α/β e MIP-1 α foram dosados, pelo método de ELISA.

Inicialmente, buscou-se investigar se a nicotina *per se* seria capaz de induzir a produção dessas citocinas. Como mostra a Figura 8 (A-C), TNF, IL-1 β e CINC2 α/β não apresentaram diferença estatística entre os grupos tratados e não tratados (controle salina) com as diferentes doses de nicotina.

Uma vez que a nicotina *per se* não alterou a produção das citocinas, optou-se pela dose de 1,0 mg/kg (s.c.), para os primeiros tratamentos envolvendo a nicotina crônica. Um grupo de animais foi destinado à avaliação de parâmetros cardiovasculares (batimentos cardíacos – BPM e pressão sistólica - mmHg) enquanto o outro grupo para o desafio com LPS no 15º dia.

Figura 8. Dosagem de citocinas plasmáticas após tratamento crônico (14 dias) com nicotina nas doses de 0,1; 0,3 e 1,0 mg/kg. As diferentes doses não alteraram significativamente os níveis de (A)TNF, (B) IL-1 β e (C) CINC2 α / β . (n=3) One Way ANOVA, *post-test*: Newman-Keuls.

Como pode ser observado na Figura 9A, os animais que receberam nicotina crônica a 1,0 mg/kg apresentaram uma pressão sistólica mais elevada comparativamente ao seu controle ($p < 0,05$), mas os batimentos cardíacos não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Figura 9B).

Os animais que receberam o desafio (LPS ou salina i.v.) no 15º dia, apresentaram níveis elevados de TNF em resposta ao estímulo com LPS (Salina/LPS) ($p < 0,05$) comparativamente aos controles (Sal/Sal e Nic/Sal) e a presença da nicotina exacerbou esse resultado (Nicotina/LPS) ($p < 0,001$) relativamente ao grupo Salina/LPS (Figura 10A). As demais citocinas IL-1 β ($p < 0,001$) (Figura 10B) e CINC 2 α / β ($p < 0,001$) (Figura 10C) foram induzidas

na presença do LPS, porém a nicotina não interferiu nesse padrão de resposta.

Figura 9. A. Avaliação da pressão sistólica (mmHg) e B. batimentos cardíacos por minuto (BPM) do grupo tratado cronicamente com nicotina 1,0 mg/kg. Os indivíduos que receberam a nicotina apresentaram uma pressão sistólica mais elevada que o seu controle ($p < 0,05$). One-way ANOVA *post-test*: Newman-Keuls ($n=3$). (Nic: nicotina)

Figura 10. Dosagem de citocinas plasmáticas após tratamento crônico (14 dias) com nicotina (1,0 mg/kg s.c.) e salina (0,9%) e desafio (15º dia) com LPS (1,0 mg/kg i.v.) ou salina (0,9%). O LPS induziu significativamente a produção de (A) TNF ($p<0,05$), (B) IL-1 β ($p<0,001$) e (C) CINC2 α/β ($p<0,001$) relativamente ao controle (Sal/Sal e Nic/Sal). A presença da nicotina juntamente com o LPS (Nic/LPS) não interferiu nesse resultado para IL-1 β e CINC2 α/β , mas exacerbou a resposta do TNF ($p<0,001$) em relação ao grupo Sal/LPS. Two-Way ANOVA, *post-test*: Newman-Keuls ($n=3$) (a:Sal/Sal; b:Sal/LPS; c: Nic/Sal; d:Nic/LPS).

Diante disso, optou-se por prosseguir nos experimentos utilizando-se a dose 10x menor, 0,1 mg/kg (s.c.). Nesse grupo experimental, o LPS induziu a produção de IL-1 β ($p<0,01$), CINC2 α/β ($p<0,001$), TNF ($p<0,001$) e

MIP-1 α ($p<0,001$) em comparação ao controle Sal/Sal (Figura 11 A-D). A presença da nicotina nessa dose não alterou a produção de nenhuma dessas citocinas induzidas pelo LPS.

Figura 11. Dosagem de citocinas plasmáticas após tratamento crônico (14 dias) com nicotina (0,1 mg/kg s.c.) e salina (0,9%) e desafio (15º dia) com LPS (1,0 mg/kg i.v.) ou salina (0,9%). O LPS induziu significativamente a produção de (A) IL-1 β ($p<0,01$), (B) CINC2 α / β ($p<0,001$), (C) MIP-1 α ($p<0,001$), (D) TNF ($p<0,001$) relativamente aos controles Sal/Sal e Nic/Sal. A presença da nicotina juntamente com o LPS (Nic/LPS) não interferiu nesse resultado para nenhuma dessas citocinas. Two-Way ANOVA, *post-test*: Newman-Keuls ($n=6$) (a:Sal/Sal; b:Sal/LPS; c: Nic/Sal; d:Nic/LPS).

4.2. Avaliação da especificidade do ensaio de NF- κ B no hipocampo e no cerebelo

Uma vez que o LPS induziu a resposta inflamatória, buscou-se avaliar os efeitos centrais desse estímulo periférico e a ação da nicotina sobre essa resposta. Para isso, procedeu-se a ensaios de gel de retardo para verificar a translocação nuclear do fator de transcrição NF- κ B.

Com o objetivo de avaliar a especificidade da ligação das proteínas nucleares ao oligonucleotídeo do NF- κ B utilizado nos ensaios de gel de retardo, realizou-se um ensaio de competição entre o oligo frio (não-marcado radioativamente) de NF- κ B (em excesso molar de 5 e 10 vezes em relação ao oligo marcado) e o oligo marcado (32 P-ATP). Como pode ser observado na Figura 12, os complexos 1 e 2 foram deslocados pela sonda fria do NF- κ B, porém o complexo 3 permaneceu inalterado, apesar das concentrações crescentes do oligo não marcado, sendo portanto classificado como não específico (NE). Além disso, utilizou-se um oligo frio de AP-1 (em excesso molar de 5 vezes) para reafirmar a especificidade da ligação proteína/DNA; ele não foi capaz de deslocar nenhuma das bandas referentes aos complexos específicos. Dados anteriores em nosso meio, em ensaios de *supershift* utilizando anticorpos específicos para as subunidades do NF- κ B, identificaram os dois primeiros complexos como correspondendo às subunidades p65/p50 (1) e p50/p50 (2) respectivamente (Glezer *et al.*, 2003), como indicado na Figura 12 e subseqüentes.

Figura 12. Ensaio de competição realizado por *gel shift* em extrato nuclear de (A) cerebelo (10 μ g) e (B) hipocampo (15 μ g) dos grupos salina/LPS na presença do oligonucleotídeo não marcado do NF- κ B (excesso molar de 5 e 10 vezes) ou da sequência consenso para AP-1 não marcada (excesso molar de 5 vezes). Os dois primeiros complexos foram considerados específicos e o terceiro não específico (NE).

4.3. Efeitos da nicotina crônica sobre a atividade do NF- κ B induzido por LPS no hipocampo e no cerebelo

A fim de se avaliar se a nicotina *per se* poderia induzir a translocação nuclear do NF- κ B, administrou-se cronicamente diferentes concentrações de nicotina (0,1; 0,3 e 1,0 mg/kg) ou salina 0,9% (controle) aos animais. Para

tanto, realizou-se ensaios de gel de retardo em extratos nucleares de cerebelo. Como apresentado na Figura 13, não houve diferença estatística entre os grupos demonstrando que a nicotina não interfere na ativação constitutiva do NF- κ B em nenhuma das doses testadas.

Figura 13. Ensaio de gel de retardo em extratos nucleares de cerebelo (10 μ g) utilizando diferentes doses de nicotina crônica (0,1; 0,3 e 1,0 mg/kg) ou salina 0,9%. Não houve diferença estatística entre os grupos. (n=3) One-way ANOVA *post-test*: Newman-Keuls.

Sendo assim, os primeiros tratamentos com nicotina priorizaram a dose de 1,0 mg/kg. Como pode ser observado na Figura 14 (A-B), o LPS induziu a translocação nuclear do NF- κ B tanto no cerebelo quanto no hipocampo ($p < 0,05$) e a nicotina inibiu-a quando comparado aos animais controle (Sal/LPS), tanto no cerebelo ($p < 0,05$) (Figura 14A) quanto no hipocampo ($p < 0,05$) (Figura 14B).

Figura 14. Ensaio de gel de retardo no tratamento crônico com nicotina 1,0 mg/kg (s.c.) ou salina 0,9% e desafio com LPS (1,0 mg/kg i.v.) ou salina 0,9%. A. no cerebelo (10 μ g) a nicotina inibiu significativamente a ativação do NF- κ B ($p < 0,05$), e o mesmo ocorreu no B. hipocampo (15 μ g) ($p < 0,05$) ($n = 3$) (Sal: salina; Nic: nicotina). (a: Sal/Sal; b: Sal/LPS, c: Nic/Sal; d: Nic/LPS). Two-way ANOVA, *post-test* Newman-Keuls.

No ensaio utilizando nicotina a 0,1 mg/kg/dia, o LPS também induziu a migração do NF- κ B em ambas as estruturas ($p < 0,01$) e a nicotina inibiu essa atividade comparativamente aos controles Salina/LPS, tanto no

cerebelo ($p < 0,01$) (Figura 15A) quanto no hipocampo ($p < 0,001$) (Figura 15B). Não houve diferença estatisticamente significativa na ativação do NF- κ B entre os animais tratados cronicamente tanto com salina quanto com nicotina e desafiados com salina 0,9%.

A)

Cerebelo

B)

Figura 15. Ensaio de gel de retardo realizado em extratos nucleares para o tratamento com nicotina 0,1 mg/kg/dia (s.c.) ou salina 0,9% e desafio com LPS (1,0 mg/kg i.v.) ou salina 0,9%. A. Cerebelo (10µg). A nicotina inibiu significativamente a translocação nuclear do NF-κB induzido pelo LPS ($p<0,01$) B. Hipocampo (15µg). A nicotina também inibiu a ativação do NF-κB ($p<0,001$). Cada gráfico apresenta sua autoradiografia correspondente. (n=6) (NE: não-específico; CN: controle negativo; CNT: controle externo, medida de variação dos filmes radiográficos) Two-way ANOVA, *post-test* Newman-Keuls (a:Sal/Sal; b: Sal/LPS, c:Nic/Sal; d:Nic/LPS)

4.4. Receptores nicotínicos

Visando-se avaliar quais receptores estariam envolvidos na resposta da nicotina sobre a ativação do NF-κB induzido pelo LPS, empregou-se, também cronicamente, o antagonista nicotínico heteropentamérico não

seletivo, Mecamilamina (MECA) (1,0 mg/kg s.c.) previamente ao tratamento crônico com nicotina (0,1 mg/kg s.c.). Esse antagonista inibiu, significativamente, os efeitos da nicotina (0,1 mg/kg) sobre a translocação nuclear do NF- κ B induzida pelo LPS ($p < 0,05$) no cerebelo (Figura 16A). O mesmo não ocorreu no hipocampo, como mostra a Figura 16B.

B)

Figura 16. Ensaio de gel de retardo para o tratamento com Mecamilamina (1,0 mg/kg s.c.) (n=5) 40 minutos antes do tratamento com nicotina 0,1 mg/kg durante 14 dias e desafio com LPS (1,0 mg/kg i.v.) ou salina 0,9% no 15º dia. A. Cerebelo (10µg): o antagonista reverteu o efeito da nicotina sobre o NF-κB induzido pelo LPS ($p < 0,05$), o mesmo não aconteceu no B. hipocampo (15µg) Two-way ANOVA, *post-test*. Newman-Keuls. (M: mecamilamina; N: nicotina; S: salina; CN: controle negativo) (a: S+N+Sal; b: S+N+LPS, c: MECA+N+Sal; d: MECA+N+LPS).

Posteriormente, investigou-se mais profundamente a participação do receptor $\alpha 7$ na mediação dessa resposta à nicotina, uma vez que esse

subtipo é extremamente abundante nas diversas estruturas cerebrais. Para isso, os animais foram tratados cronicamente com o antagonista seletivo $\alpha 7$, MLA (5,0 mg/kg i.p.) e os ensaios de gel de retardo foram realizados em extratos nucleares de hipocampo (15 μ g). Como apresentado na Figura 17, o LPS induziu a translocação nuclear do NF- κ B ($p < 0,05$) e na presença da nicotina crônica (0,1 mg/kg), essa ativação foi inibida significativamente ($p < 0,05$). A presença do MLA reverteu, consideravelmente, os efeitos da nicotina sobre o NF- κ B induzido pelo LPS ($p < 0,05$).

Figura 17. Ensaio de gel de retardo realizado com extrato nuclear do hipocampo (15 μ g); tratamento crônico com MLA (5,0 mg/kg i.p.) ou salina (0,9%) 30 minutos antes da nicotina (0,1 mg/kg s.c.) ou salina (0,9%) durante 14 dias; os animais foram desafiados com LPS (1,0 mg/kg i.v.) ou salina (0,9%) no 15º dia. O MLA reverteu significativamente os efeitos inibitórios da nicotina sobre o NF- κ B induzido por LPS ($p < 0,05$); ($n=4$) Two-way ANOVA, *post-test*: Newman-Keuls. (S: salina; N: nicotina). (a:S+S+S; b: S+S+LPS; c:S+N+S; d:S+N+LPS; e:MLA+N+S; f:MLA+N+LPS).

4.5. PCR em tempo real no hipocampo e no cerebelo

Uma vez que a nicotina crônica mostrou-se capaz de inibir significativamente a translocação nuclear do NF- κ B, buscou-se avaliar se essa inibição estaria interferindo transcricionalmente na expressão gênica do mRNA de indutores inflamatórios regulados diretamente por esse fator. Para isso, realizou-se ensaios de PCR em tempo real para TNF, IL-1 β e iNOS. A Figura 18A mostra que o mRNA do TNF, induzido pelo LPS ($p < 0,05$), foi totalmente inibido na presença da nicotina (0,1 mg/kg) (nicotina/LPS) ($p < 0,01$). Da mesma forma, o LPS induziu a expressão do mRNA da IL-1 β ($p < 0,01$) (Figura 18B) e da iNOS ($p < 0,05$) (Figura 18C), sendo inibidos significativamente ($p < 0,05$, ambos) na presença da nicotina crônica (0,1 mg/kg). Ao lado de cada gráfico apresenta-se a curva de dissociação correspondente com um pico único.

B)

C)

Figura18. PCR em tempo real da expressão do mRNA de TNF, IL-1 β e iNOS no hipocampo após tratamento com nicotina 0,1 mg/kg ou salina 0,9% e desafio com LPS (1,0 mg/kg i.v.) ou salina 0,9%. A nicotina (0,1 mg/kg) inibiu significativamente a expressão de TNF ($p<0,01$), IL-1 β ($p<0,05$), iNOS ($p<0,05$). Acima de cada gráfico apresenta-se a curva de dissociação correspondente, com um pico único. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. (n=6) Two-way ANOVA; *post-test* Newman-Keuls (a:Sal/Sal; b: Sal/LPS, c:Nic/Sal; d:Nic/LPS)

Uma vez que o LPS age via receptores TLR-4 e, por isso, induz a cascata de sinalização que ativa o fator de transcrição NF- κ B, induzindo a expressão de indutores inflamatórios, buscou-se avaliar se a presença da nicotina também estaria interferindo na expressão deste receptor. Para isso, foram realizadas reações de PCR em tempo real para TLR4 em amostras de hipocampo. Como observado na Figura 19, o LPS foi capaz de induzir a expressão desse receptor ($p < 0,001$) comparativamente aos controles negativos (Sal/Sal e Nic/Sal) e a presença da nicotina (0,1 mg/kg) inibiu significativamente a sua transcrição gênica ($p < 0,001$), relativamente ao controle positivo (Sal/LPS).

Figura 19. PCR em tempo real da expressão do mRNA de TLR4 no hipocampo após tratamento com nicotina 0,1 mg/kg ou salina 0,9% e desafio com LPS (1,0 mg/kg i.v.) ou salina 0,9%. O LPS induziu a expressão do receptor ($p < 0,001$) mas a nicotina (0,1 mg/kg) reverteu esse efeito significativamente ($p < 0,001$). A imagem corresponde à curva de dissociação apresentando um pico único. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. (n=6) Two-way ANOVA, *post-test*: Newman-Keuls (a: Sal/Sal; b: Sal/LPS, c: Nic/Sal; d: Nic/LPS).

No cerebelo, as reações de PCR em tempo-real foram realizadas para IL-1 β . Como pode ser observado na Figura 20, o LPS induziu significativamente sua expressão ($p<0,01$) e a nicotina crônica (0,1 mg/kg) inibiu consideravelmente a transcrição gênica ($p<0,01$). Ao lado do gráfico apresenta-se a curva de dissociação correspondente, e com um pico único.

Figura 20. PCR em tempo real da expressão do mRNA de IL-1 β no cerebelo após tratamento com nicotina 0,1 mg/kg ou salina 0,9% e desafio com LPS (1,0 mg/kg i.v.) ou salina 0,9%. A nicotina (0,1 mg/kg) inibiu significativamente a expressão de IL-1 β ($p<0,01$). Acima de cada gráfico apresenta-se a curva de dissociação correspondente, com um pico único. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. (n=6) Two-way ANOVA; *post-test* Newman-Keuls (a: Sal/Sal; b: Sal/LPS, c: Nic/Sal; d: Nic/LPS).

5. Discussão

“A meta de uma discussão ou debate não deveria ser a vitória, mas o progresso”

Joseph Joubert

5.1. Citocinas plasmáticas

O LPS é um importante indutor da resposta inflamatória capaz de induzir células que apresentam o receptor TLR-4 em sua membrana, como macrófagos e células dendríticas (Qin *et al.*, 2005; van Lieshout *et al.*, 2009) a produzir citocinas como TNF, IL-1 β , IL-8 dentre outras. Nossos dados confirmam esse efeito do LPS periféricamente como demonstrado pelo aumento nos níveis de TNF, IL-1 β , CINC 2 α/β e MIP-1 α no plasma dos animais experimentais.

Entretanto, apesar de muitos estudos realizados tanto *in vitro* quanto *in vivo* apontarem para uma redução na produção e na expressão gênica de citocinas periféricas na presença de nicotina (p.ex. TNF, IL-1 β , IL-8, IL-10) (Sugano *et al.*, 1998; Dowling *et al.*, 2007; Wittebole *et al.*, 2007), não detectamos diferenças significativas entre os grupos tratados e não tratados com nicotina crônica (1,0 e 0,1 mg/kg) e desafiados com LPS. Apenas no tratamento com a dose de 1,0 mg/kg, o TNF plasmático dos animais Nicotina/LPS mostrou-se bastante elevado em comparação com seu controle positivo (Salina/LPS).

Vale destacar que os primeiros tratamentos com nicotina crônica realizados nesse trabalho, levaram em consideração dados anteriores da literatura que utilizaram doses em torno de 3,0 e 10 mg/kg (Ravikumar *et al.*, 2004). Para isso, nosso método de administração foi a injeção subcutânea, enquanto os demais trabalhos utilizavam bombas de infusão implantadas subcutaneamente ou *patches* (Razani-Boroujerdi *et al.*, 2004) os quais

mantêm as concentrações de nicotina constantes durante todo o período de exposição, diferentemente da injeção subcutânea que gera picos desse fármaco logo após a sua administração. Assim, ao administrarmos essas doses, os animais convulsionaram poucos segundos após a injeção, o que nos levou a reduzi-la para 1,0 mg/kg/dia. Mesmo com a diminuição da dose alguns indivíduos apresentaram alterações comportamentais como tremores e andar cambaleante nos últimos dias de tratamento. Isso parece ter se refletido na produção de TNF, já que na presença de nicotina e do estímulo inflamatório com LPS, essa citocina atingiu níveis plasmáticos elevados comparativamente ao seu controle positivo (Salina/LPS), apesar de não ter sido detectado nos animais controle com nicotina (Nicotina/Salina).

Outro fator importante a ser considerado, foi o aumento da pressão sanguínea observada nos animais tratados com nicotina 1,0 mg/kg quando comparado aos que receberam salina. Entretanto, não houve diferença estatística no batimento cardíaco entre os grupos experimentais. Para afastar quaisquer efeitos do estresse causado pelo manuseio e pela própria injeção, que poderiam ocasionar mudanças no BPM e na pressão sistólica pelo estresse e não pela nicotina (Wsol *et al.*, 2008; Ni *et al.*, 2009), as medidas cardiovasculares só foram obtidas decorrido um período de aproximadamente 2h após a infusão. Estudos mostram que ratos recém-nascidos que foram expostos à nicotina durante a vida gestacional apresentam um aumento na pressão sistólica, aparentemente relacionado a uma incapacidade do tecido adiposo perivascular em modular a contração vascular (Gao *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2008). Além disso, estudos

comparando duas linhagens de ratos, Wistar e SHR (espontaneamente hipertensos), indicam que doses consideradas moderadas (8,0 mg/kg/dia), fornecidas por *patches* de nicotina não alteram a pressão sanguínea dos ratos Wistar, mas o fazem nos SHR (Ferrari & Fior-Chadi, 2007).

Nossos dados indicam que a dose de 1,0 mg/kg pode ter-se mostrado estressante para o animal tornando-o mais vulnerável a uma resposta ao LPS, exacerbando os efeitos deletérios da inflamação ao contrário de controlá-los. Estudos mostram que doses repetidas de nicotina podem levar a um aumento de norepinefrina, neurotransmissor responsivo ao estresse (Feitelson *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2003), e que ele, por sua vez, pode levar ao aumento da pressão arterial (Black *et al.*, 2001). Assim, o aumento da pressão observada nesses animais pode ter sido decorrente de uma ação direta da nicotina, bem como da liberação da norepinefrina causada pelo estresse. Diante disso, o animal pode ter-se tornado mais vulnerável aos estresses do dia a dia, como ao manuseio e à infusão diária da nicotina, além da administração do LPS que é realizada na veia da cauda.

Já na dose de 0,1 mg/kg de nicotina, não foi possível obter os resultados referentes à pressão arterial, porém os níveis das citocinas estudadas responderam ao LPS, indicando que a nicotina não interferiu o efeito dessa endotoxina, diferente do que ocorreu com a dose de 1,0 mg/kg. Além disso, os animais não apresentaram alterações perceptíveis de comportamento, sugerindo que esta dose foi adequada para a realização de nosso estudo.

O fato de não termos encontrado diferenças significativas na maioria das citocinas plasmáticas após tratamento com nicotina, pode estar relacionado às diferenças tecido-específicas que este fármaco causa. Cada tecido possui uma expressão de receptores característica, o que pode colaborar com a variedade de efeitos. Dessa forma, o plasma pode não ser um bom material para avaliação dessas respostas.

Assim como no SNC, o sistema periférico também apresenta uma grande diversidade de receptores nicotínicos. Estudos desenvolvidos em camundongos deficientes em receptores $\alpha 5$ mostram que esses indivíduos tornam-se mais suscetíveis às doenças inflamatórias do estômago quando comparados aos animais selvagens, o que tira um pouco o foco dos receptores $\alpha 7$ como únicos mediadores dessas respostas imunomoduladoras. Além disso, outros subtipos de receptores também já foram identificados nessa região como $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 2$ e $\beta 4$ (Orr-Urtreger *et al.*, 2005). Em epitélio bronquiolar, além dos receptores $\alpha 7$ também são encontrados $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 2$ e $\beta 4$, bem como os homoméricos $\alpha 9$ e $\alpha 10$. Trabalhos realizados em cultura de células dendríticas, que expressam receptores $\alpha 7$ bem como os macrófagos (Van Der Zanden *et al.*, 2009), mostraram que baixas doses de nicotina reduzem a morte celular ao contrário das altas doses (Aicher *et al.*, 2003), e que a nicotina *per se* não era capaz de induzir a produção de IL-8 (Vassallo *et al.*, 2008). Ademais, a nicotina crônica pode levar a uma anergia das células T e queda na migração leucocitária; porém, na administração aguda, ocorre um aumento no Ca^{2+} intracelular e na migração celular (Sopori *et al.*, 1998).

Sendo assim, é importante ressaltar que a duração e a concentração de nicotina desempenham um papel importante na dessensibilização dos receptores pela presença constante do agonista. Apesar dessa mudança de estado do receptor ser passageira, o acúmulo da nicotina no tecido pode induzir um estado contínuo que leve até a inativação dos receptores. Subtipos como o $\alpha 7$ respondem a baixas doses de nicotina, e dessensibilizam rapidamente, enquanto que outros que contém $\alpha 3/\beta 4$ são mais dificilmente dessensibilizados e respondem a doses mais altas desse fármaco (Gotti *et al.*, 2006).

Dentro desse contexto, é importante ressaltar que o tempo e a via de administração, a dose de nicotina, bem como o tecido em estudo com seus receptores característicos, tornam-se variáveis importantes no uso e na interpretação da ação da nicotina, uma vez que estudos utilizando modelos animais de infusão mostraram que a razão tecido-sangue de nicotina nas diferentes partes do organismo varia significativamente (cérebro 3:0; coração 3:7; músculo 2:0; tecido adiposo 0:5; rins 21:6; fígado 3:7; pulmões 2:0 e tecido gastrointestinal 3:5) (Gahring & Rogers, 2005). Somando-se a isso, tem-se que a maioria dos trabalhos referentes à atividade da nicotina sobre o sistema imune não foi realizada em ratos Wistar, mas em ratos Lewis e Sprague-Dawley, e existem evidências de que a sensibilidade à nicotina parece sofrer influência de componentes genéticos como reflexo de diferentes padrões de resposta associados a determinadas linhagens de animais (McAllister-Sistilli *et al.*, 1998).

5.2. Nicotina: efeitos na via do NF- κ B, TLR-4 e receptores nicotínicos

O fator de transcrição NF- κ B regula a expressão de genes envolvidos em uma série de atividades celulares, como por exemplo: sobrevivência e proliferação celular, resposta imune inata e adaptativa e reação ao estresse. A endotoxina presente na membrana externa de bactérias Gram-Negativas, o LPS, é um importante indutor desse fator nuclear e sua atividade se inicia com a ligação ao receptor TLR-4.

Diante disso, alguns trabalhos buscam compreender os mecanismos moleculares envolvidos nessas respostas. Ravikumar e colaboradores (2004) demonstraram que animais que apresentavam danos na medula espinal, e por consequência aumento de genes pró-inflamatórios, e que foram tratados com dose única de nicotina intraperitoneal (0,35 a 7,0 mg/kg) apresentaram uma queda na ativação dos fatores de transcrição AP-1, CREB e NF- κ B, assim como na produção de TNF. Outros trabalhos desenvolvidos por Liu e colaboradores (2007) em modelos de camundongos para a doença de Alzheimer (camundongos APP transgênicos) indicam que a nicotina reduz a ativação do NF- κ B inibindo a MAPK e consequentemente, regulando negativamente a atividade da iNOS e a produção de NO. Esses resultados também implicam que a subunidade $\alpha 7$ medeia o controle da nicotina sobre a via do NF- κ B, bem como possivelmente as subunidades $\alpha 3\beta 4$, apesar de ainda não existirem trabalhos que mostrem uma correlação clara entre os efeitos imunorregulatórios e esse subtipo de receptor. Nossos resultados demonstraram, pela primeira vez no hipocampo e no cerebelo,

que a nicotina crônica (1,0 e 0,1 mg/kg) inibe a translocação nuclear do NF- κ B ativada por LPS.

Em vista do que foi discutido acima, a caracterização dos tipos de receptores envolvidos na ação da nicotina na ativação do NF- κ B passa a ser importante para a compreensão destes mecanismos. Muitos trabalhos têm demonstrado que a maior parte dos nAChRs expressos no encéfalo são heteropentaméricos contendo as subunidades $\alpha 4$ e $\beta 2$ e os homopentaméricos compostos pela subunidade $\alpha 7$. Além disso, as subunidades $\alpha 4/\beta 2$ apresentam alta afinidade por agonistas, são bastante expressos no córtex cerebral de ratos tratados cronicamente com nicotina e são mais suscetíveis à regulação positiva do que os receptores que contém as subunidades $\alpha 3\beta 2$ e $\beta 4$ (Flores *et al.*, 1992; Picciotto *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2007).

Buscando-se compreender melhor quais receptores estariam envolvidos na resposta observada no presente trabalho, alguns antagonistas de receptores nicotínicos, MECA e MLA foram administrados, também cronicamente, minutos antes da infusão diária de nicotina 0,1 mg/kg. Estudos mostram que a MECA possui alguma seletividade por receptores ganglionares (com $\beta 4$) e por heteroméricos ($\alpha 4\beta 2$), e que o MLA é um antagonista $\alpha 7$ (Papke *et al.*, 2001; Papke *et al.*, 2008). Nossos resultados indicam que os receptores $\alpha 7$, no hipocampo, possuem um papel crucial na regulação da resposta da nicotina sobre o NF- κ B induzido por LPS, já que o MLA foi capaz de bloquear os efeitos reguladores da nicotina, e que

aparentemente, os receptores heteroméricos também participam ativamente dessa resposta principalmente no cerebelo.

Diversos trabalhos têm demonstrado um papel benéfico com a administração da nicotina por *patches* principalmente para o tratamento de transtornos que envolvem o déficit cognitivo observados na doença de Alzheimer, e na esquizofrenia. Cada uma dessas doenças parece envolver diferentes subtipos de receptores como, por exemplo, o baixo número de subtipos $\alpha 4$ na doença de Alzheimer e de $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$ na esquizofrenia (Levin, 2002). No caso do cerebelo, alguns distúrbios como o autismo, parecem envolver uma participação importante dos receptores nicotínicos. A subunidade $\alpha 4$ é encontrada em corpos celulares nas camadas moleculares, granulares e das células de Purkinje e nos terminais de axônios que formam sinapses com essas células. Além disso, a subunidade $\alpha 7$ está presente nas células de Purkinje e nos dendritos das células granulares. Alguns estudos de casos, envolvendo pacientes autistas mostram perda de receptores $\alpha 4$ que pode estar relacionada a uma perda das células de Purkinje e consequente compensação com receptores $\alpha 7$. Entretanto, como as anormalidades presentes nesses receptores estão relacionadas ao desenvolvimento dessa doença ainda é desconhecido (Lee *et al.*, 2002).

Demonstramos também, nesse estudo, que o mRNA do TNF, IL-1 β e iNOS, indutores inflamatórios diretamente regulados pelo NF- κ B, estavam reduzidos no grupo tratado com nicotina e desafiado com LPS, no hipocampo, confirmando que a modulação desse fator de transcrição pela nicotina interfere na expressão gênica de mediadores inflamatórios. Foi

descrito o envolvimento desses mediadores em diversas doenças do SNC como nos acidentes vasculares cerebrais, na esclerose múltipla, e nas doenças de Parkinson e de Alzheimer (Lucas *et al.*, 2006) Na esclerose múltipla, além do TNF e da IL-1 β também foi descrita a participação da iNOS, que aumenta a atividade inflamatória, piorando o quadro (Raivich & Banati, 2004), e é interessante destacar que na doença de Alzheimer, que afeta prioritariamente o hipocampo, Sheng e colaboradores (1998) descrevem uma maior produção de IL-1, IL-6 e TNF, as quais aumentam a expressão do peptídeo β A. Uma vez que essas doenças possuem uma grande participação da atividade inflamatória, a modulação destes mediadores inflamatórios pela nicotina, pode se tornar uma estratégia interessante no controle destas condições clínicas.

É importante notar que esses mediadores também induzem a migração nuclear do NF- κ B por intermédio de seus próprios receptores (TNFR1, IL1R1) (O'Neill & Greene, 1998; Schutze *et al.*, 2008). Assim, a modulação da via desse fator de transcrição pela nicotina diminuiria a produção dos mediadores inflamatórios que, por sua vez, diminuiriam a ativação do próprio NF- κ B, o que levaria a uma resposta menos proeminente dos efeitos decorrentes da translocação nuclear do NF- κ B, como a apoptose, a inflamação, a plasticidade e o desenvolvimento neuronal.

A iNOS, responsável pela formação de grandes quantidades de NO, além de ser estimulada pelo LPS também responde aos estímulos de citocinas como o TNF e a IL-1 β . No cérebro a NOS é encontrada em interneurônios no hipocampo, correspondendo a 1-2% da população

neuronal total; já no cerebelo é abundante principalmente na camada de células granulares e células em cesto (*basket cells*) (Bredt & Snyder, 1992). Apesar do NO, em condições fisiológicas, participar de diferentes processos como a regulação da atividade vascular cerebral, aprendizado, memória e sinaptogênese, altos níveis de NO têm sido relacionados à existência de uma associação possível entre a neurotoxicidade de NO e a doença de Alzheimer (Limon *et al.*, 2009), de Parkinson dentre outras doenças neurodegenerativas. Estudos desenvolvidos em ratos que receberam infusões de peptídeo β A indicam que a produção excessiva de NO gera outros produtos altamente tóxicos como o ânion peroxinitrito (ONOO^-) que aumenta o dano neuronal. Os astrócitos e a microglia ativados produzem NO pelas vias do NF- κ B (Parks *et al.*, 2001; Moncada & Bolanos, 2006), o que pode colaborar com a neurodegeneração. No caso de modelos animais para o Parkinson, animais *knockout* para os genes da nNOS ou iNOS, ou mesmo a sua inibição por fármacos, demonstrou que a ausência desses produtos preveniu a destruição de neurônios dopaminérgicos (Liberatore *et al.*, 1999; Dehmer *et al.*, 2000). Sendo assim, Liberatore e colaboradores (1999) sugeriram que a iNOS pode se tornar um importante alvo terapêutico na modulação dos danos oxidativos envolvidos em processos inflamatórios. Como apresentado em nosso trabalho no hipocampo, a nicotina inibiu a expressão do seu mRNA indicando o seu possível papel neuroprotetor.

No cerebelo, demonstrou-se no presente trabalho que a citocina pró-inflamatória IL-1 β , também foi inibida na presença da nicotina. Corroborando com esses dados, têm-se os trabalhos desenvolvidos por Park e

colaboradores (2007) em cultura de microglia e em homogenatos de substância nigra de ratos tratados cronicamente com nicotina, e por Yoshikawa e colaboradores (2006), em cultura de monócitos/macrófagos humanos. Os dados mostram que tanto a produção de TNF quanto a sua expressão estavam significativamente reduzidas nos grupos tratados com nicotina e desafiados com LPS, em comparação aos salina/LPS.

Dentre as citocinas, a IL-1 β tem-se apresentado como chave em vários processos relacionados ao desenvolvimento de doenças, já que altos níveis desse produto levam a infecções e recuperação deficiente de pacientes após um derrame ou dano cerebral (Patel *et al.*, 2003; Rothwell, 2003). Considerando-se que o cerebelo indica ser um alvo importante para doenças neurodegenerativas (Baldacara *et al.*, 2008), nossos resultados apresentam, pela primeira vez, essa estrutura como uma região encefálica importante para a ação da IL-1 β em resposta a um estímulo inflamatório sistêmico. Isso contribui para trabalhos anteriores que demonstraram *in vivo* que essa citocina age no hipotálamo, alterando a viabilidade celular no córtex por vias dependentes de IL-1, que se projetam do estriado para o córtex via hipotálamo induzindo a morte de células corticais (Allan *et al.*, 2000). Além disso, outros experimentos *in vivo* mostraram que em resposta à administração de cainato, a IL-1 exerce efeitos modulatórios nas células de Purkinje, o que pode estar relacionado à ataxia cerebelar (Andoh *et al.*, 2008; Motoki *et al.*, 2009).

Diversas vias têm sido analisadas também na busca do mecanismo de ação desse alcalóide. Demonstrou-se no córtex pré-frontal de

camundongos tratados agudamente com nicotina que essa substância age inibindo a atividade proteassômica nas células aumentando o número de proteínas ubiquitinadas no citoplasma, bloqueando assim, a degradação dessas proteínas (Rezvani *et al.*, 2007). Também foi demonstrado que a nicotina age inibindo a fosforilação do I κ B, e por conseqüência, a sua ubiquitinação, sinal para sua degradação. Uma vez que os dados de Rezvani e colaboradores (2007) mostram que a nicotina impede a degradação proteassômica de proteínas ubiquitinadas, é possível que o I κ B não esteja sendo degradado, mantendo assim o NF- κ B no citoplasma. Outra via de ação da nicotina atinge diretamente o retículo endoplasmático (RE) induzindo uma maturação precoce dos receptores nicotínicos (Nguyen *et al.*, 2003; Sallette *et al.*, 2004; Sallette *et al.*, 2005; Corringer *et al.*, 2006). Apesar dessas ações não serem dependentes da participação dos receptores nicotínicos, uma vez que a nicotina é capaz de atravessar a membrana plasmática, animais *knockout* para o receptor $\alpha 7$ (Wang *et al.*, 2003; Fujii *et al.*, 2007) não apresentam uma regulação da reação inflamatória tão eficiente quanto os animais que expressam normalmente esse subtipo de receptor. Isso sugere que a participação dos receptores nicotínicos, principalmente o $\alpha 7$, é fundamental para que a nicotina possa exercer seus efeitos imunomoduladores. Dessa forma, a ação da nicotina por outras vias independentes dos receptores parece interferir pouco na resposta final.

Outro aspecto importante a ser avaliado no nosso modelo de estudo é o receptor de LPS, o TLR-4. Demonstramos no hipocampo, que a nicotina

crônica inibe a expressão do mRNA deste receptor sugerindo que, no caso de uma inflamação local, o reconhecimento desse produto microbiano estaria prejudicado pela redução na quantidade de receptores disponíveis. A falha no reconhecimento do LPS impede a ativação das vias de sinalização TIRAP-MyD88 e TRAM-TRIF que, em geral, ativam os fatores de transcrição NF- κ B e IRF-3 respectivamente, além da via da MAPK (Qin et al., 2005). No encéfalo, o receptor TLR-4 é expresso principalmente na microglia, mas também em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (Buttini *et al.*, 1996; Lehnardt *et al.*, 2002; Jack *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2008). Estudos realizados em células neurais progenitoras obtidas de camundongos adultos mostraram que essas células expressam receptores TLR-4 e que a sua ativação por indutores, como o LPS, inibe a diferenciação neuronal e a sua neutralização reverte essa resposta. Além disso, a supressão da expressão desse receptor por RNAi (RNA de interferência) aumentou a diferenciação neuronal (Rolls *et al.*, 2007) e camundongos deficientes para o gene de TLR4 apresentavam uma maior proliferação e diferenciação celular. O mesmo ocorreu quando a proteína adaptadora MyD88 era inibida, o que indica que a via de TLR-4 dependente de MyD88 é importante na inibição dessa via. Além disso, demonstrou-se que outro receptor, cuja ativação pode culminar na ativação do NF- κ B, o TLR-2, regula a atividade inibitória induzida por TLR-4 (Rolls *et al.*, 2007). Sendo assim, a regulação dessa via, como demonstrado em nosso trabalho na presença da nicotina, pode indicar um papel importante no aumento da diferenciação e proliferação neuronal, revertendo os danos causados, por exemplo, por doenças neurodegenerativas. Entretanto, mais estudos são necessários

envolvendo a participação da nicotina na via de Toll-2 bem como em outras que interfiram na via de Toll-4.

Diversos distúrbios neurodegenerativos como o acidente vascular cerebral, as doenças de Alzheimer e de Parkinson envolvem a morte neuronal. Participam desse processo algumas proteínas apoptóticas como a Bax, Bcl-2 e caspase-3 que estão diretamente relacionadas ao NF- κ B. A nicotina inibe a expressão de indutores apoptóticos como a Bax e a caspase-3, e regula positivamente a proteína antiapoptótica Bcl-2, no hipocampo e no córtex, pela inibição da via da MAPK/NF- κ B (Mai *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007). Além disso, a nicotina estimula a heterodimerização de Bcl-2/Bax inibindo a função proapoptótica de Bax (Oltvai *et al.*, 1993; Mai *et al.*, 2003). Outra proteína importante e relacionada à apoptose e ao ciclo celular é a c-Myc. O NF- κ B possui dois sítios de ligação no promotor de c-Myc e esse fator, bem como a IL-1 e o TNF, medeiam a sua ativação (Bourgarel-Rey *et al.*, 2001). A nicotina inibe, mesmo que parcialmente, a expressão de c-Myc, mediada pela MAPK e pelo NF- κ B (Liu *et al.*, 2007), porém, outras vias podem também modular essa resposta.

Outras cascatas de sinalização mediadas pela ativação do receptor $\alpha 7$ também têm tido bastante destaque. Estudos realizados em cultura de células PC12 de rato mostraram que a nicotina induz a formação de um complexo entre o receptor $\alpha 7$ e a enzima fosforilada JAK2, que leva à ativação da via citoprotetora de PI-3-K (*phosphatidylinositol-3-kinase*) e de seu efetor, o Akt. Dados mostram que o peptídeo β A é capaz de interagir com o receptor $\alpha 7$, mas que ele não ativa significativamente a via JAK2 e

que na presença de nicotina o peptídeo é deslocado do receptor. Além disso, a ativação de JAK2 inibe a via da caspase-3 que é ativada na presença do peptídeo β A (Shaw *et al.*, 2002). Em conjunto, a nicotina induz a produção de Bcl-2 por meio da ativação do receptor α 7 que induz a fosforilação de JAK2 e ativação de PI-3-K/Akt e dos fatores de transcrição NF- κ B e STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) em células neuronais. A STAT3 é capaz de se ligar a sua região promotora no DNA ou de interagir com o NF- κ B modulando a sua atividade. Estudos realizados em células mesangiais de camundongos em cultura demonstraram que há uma interação entre esses dois fatores e que a ligação entre STAT3 e a subunidade p65 do NF- κ B leva a uma inibição da indução de iNOS por citocinas como, por exemplo, a IL-1 β e pelo próprio LPS (Yu *et al.*, 2002).

Além disso, a ativação do NF- κ B requer o recrutamento de múltiplas proteínas coativadoras, como o CBP (*CREB binding protein*) e seu homólogo p300 que interagem com a subunidade p65 e ativam promotores de genes responsivos (Hua *et al.*, 2006). Demonstrou-se em células granulares do cerebelo que a interação CBP/NF- κ B é responsável por reduzir as taxas de apoptose nessas células (Yalcin *et al.*, 2003). Entretanto, o complexo CBP/p300 interage com diversos fatores de transcrição (CREB, p53, c-jun) levando, portanto, a diferentes respostas biológicas, porém sua participação em cada uma dessas vias ainda precisa ser melhor esclarecida.

Sendo assim, é importante ressaltar que o NF- κ B apresenta um efeito dual na resposta celular, da sobrevivência à morte, sendo a sua modulação

um alvo a ser tratado com cautela. Uma vez que outros fatores de transcrição como, o E2F1(Zheng *et al.*, 2009), a STAT3 (Choi *et al.*, 2009) e o IRF-1(Bowie *et al.*, 2008), além do próprio NF- κ B participam de respostas que envolvem a proliferação e a morte celular, é o *crosstalk* entre as vias que leva à homeostase do sistema. É interessante citar que experimentos envolvendo câncer em murinos, demonstraram que a metástase era estimulada pela administração de LPS e que isso estaria sendo controlado pela produção de TNF por células hematopoiéticas do hospedeiro e pela ativação do NF- κ B nas células tumorais. A supressão do NF- κ B tanto em células de carcinoma em cólon quanto em mamárias converteram a resposta de crescimento induzida por LPS em regressão do tumor induzida por LPS. Essa resposta de regressão seria independente de TNF, mas dependente de TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*). O LPS induz o receptor de TRAIL em células deficientes em NF- κ B (Aggarwal *et al.*, 2004). Esse fato contribui para o efeito dual desse fator de transcrição, já que na sua ausência pode-se ter um aumento da apoptose, ou seja, um desbalanço das vias paralelas, que pode ou não ser um efeito benéfico dependendo da situação.

Estudos realizados em ratos e camundongos infectados pelo vírus influenza e tratados com nicotina, apresentaram uma imunossupressão marcante que culminou por aumentar de forma significativa a titulação dos vírus no pulmão, uma vez que na presença desse fármaco a migração leucocitária estava suprimida (Razani-Boroujerdi *et al.*, 2004). Diante disso, a base do uso da nicotina deve ser uma imunomodulação ao invés de

imunossupressão. A resposta imune é importante para manter o organismo em homeostase com seus agentes infecciosos internos e externos, e bloqueá-lo pode levar a uma potenciação dos efeitos gerados por diferentes agentes potencialmente danosos ao nosso organismo.

Dessa forma, nossos dados apontam para um importante efeito imunomodulador da nicotina que devem ser considerado em casos que envolvam, por exemplo, doenças neurológicas de cunho neuroinflamatório.

6. Conclusões

Nosso trabalho demonstrou que a nicotina crônica é capaz de modular negativamente a atividade do NF- κ B na presença de um estímulo inflamatório tanto no cerebelo quanto no hipocampo. Além disso, alguns dos principais mediadores inflamatórios regulados por esse fator de transcrição, TNF, IL-1 β e iNOS tiveram sua expressão reduzida na presença desse alcalóide, uma resposta dependente da ativação dos receptores nicotínicos principalmente $\alpha 7$ no hipocampo e aparentemente heteroméricos no cerebelo. Além disso, demonstramos que a expressão de TLR4 está inibida na presença da nicotina sugerindo que esse fármaco estaria regulando o número desses receptores disponíveis para ativação na membrana celular, modulando a cascata de sinalização *downstream* ao receptor TLR-4.

7. Referências

"When a man writes from his own mind, he writes very rapidly. The greatest part of a writer's time is spent in reading, in order to write; a man will turn over half a library to make one book."

Samuel Johnson

- Abbruscato, T. J., S. P. Lopez, K. S. Mark, B. T. Hawkins and T. P. Davis (2002). "Nicotine and cotinine modulate cerebral microvascular permeability and protein expression of ZO-1 through nicotinic acetylcholine receptors expressed on brain endothelial cells." J Pharm Sci **91**(12): 2525-38.
- Aggarwal, B. B., U. Bhardwaj and Y. Takada (2004). "Regulation of TRAIL-induced apoptosis by ectopic expression of antiapoptotic factors." Vitam Horm **67**: 453-83.
- Aicher, A., C. Heeschen, M. Mohaupt, J. P. Cooke, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2003). "Nicotine strongly activates dendritic cell-mediated adaptive immunity: potential role for progression of atherosclerotic lesions." Circulation **107**(4): 604-11.
- Albuquerque, E. X., E. F. Pereira, M. Alkondon and S. W. Rogers (2009). "Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function." Physiol Rev **89**(1): 73-120.
- Albuquerque, E. X., E. F. Pereira, A. Mike, H. M. Eisenberg, A. Maelicke and M. Alkondon (2000). "Neuronal nicotinic receptors in synaptic functions in humans and rats: physiological and clinical relevance." Behav Brain Res **113**(1-2): 131-41.
- Allan, S. M., L. C. Parker, B. Collins, R. Davies, G. N. Luheshi and N. J. Rothwell (2000). "Cortical cell death induced by IL-1 is mediated via actions in the hypothalamus of the rat." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(10): 5580-5.
- Amano, H., K. Oishi, F. Sonoda, M. Senba, A. Wada, H. Nakagawa and T. Nagatake (2000). "Role of cytokine-induced neutrophil chemoattractant-2 (CINC-2) alpha in a rat model of chronic bronchopulmonary infections with *Pseudomonas aeruginosa*." Cytokine **12**(11): 1662-8.
- Andoh, T., H. Kishi, K. Motoki, K. Nakanishi, Y. Kuraishi and A. Muraguchi (2008). "Protective effect of IL-18 on kainate- and IL-1 beta-induced cerebellar ataxia in mice." J Immunol **180**(4): 2322-8.
- Andreasen, N. C. (1995). "Symptoms, signs, and diagnosis of schizophrenia." Lancet **346**(8973): 477-81.
- Baeuerle, P. A. and D. Baltimore (1996). "NF-kappa B: ten years after." Cell **87**(1): 13-20.
- Baldacara, L., J. G. Borgio, A. L. de Lacerda and A. P. Jackowski (2008). "Cerebellum and psychiatric disorders." Rev Bras Psiquiatr **30**(3): 281-9.
- Baldwin, A. S., Jr. (1996). "The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights." Annu Rev Immunol **14**: 649-83.
- Barnes, P. J. and M. Karin (1997). "Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases." N Engl J Med **336**(15): 1066-71.
- Barton, G. M. and R. Medzhitov (2003). "Toll-like receptor signaling pathways." Science **300**(5625): 1524-5.
- Basak, S., V. F. Shih and A. Hoffmann (2008). "Generation and activation of multiple dimeric transcription factors within the NF-kappaB signaling system." Mol Cell Biol **28**(10): 3139-50.
- Bate, L. and M. Gardiner (1999). "Molecular genetics of human epilepsies." Expert Rev Mol Med **1999**: 1-22.
- Bencherif, M., K. Fowler, R. J. Lukas and P. M. Lippiello (1995). "Mechanisms of up-regulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in clonal cell lines and primary cultures of fetal rat brain." J Pharmacol Exp Ther **275**(2): 987-94.
- Benowitz, N. L. (2009). "Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics." Annu Rev Pharmacol Toxicol **49**: 57-71.
- Benwell, M. E., D. J. Balfour and J. M. Anderson (1988). "Evidence that tobacco smoking increases the density of (-)-[3H]nicotine binding sites in human brain." J Neurochem **50**(4): 1243-7.
- Bhatti, B. S., J. P. Strachan, S. R. Breining, C. H. Miller, P. Tahiri, P. A. Crooks, N. Deo, C. S. Day, et al. (2008). "Synthesis of 2-(pyridin-3-yl)-1-azabicyclo[3.2.2]nonane, 2-(pyridin-3-

- yl)-1-azabicyclo[2.2.2]octane, and 2-(pyridin-3-yl)-1-azabicyclo[3.2.1]octane, a class of potent nicotinic acetylcholine receptor-ligands." *J Org Chem* **73**(9): 3497-507.
- Billiar, T. R., R. D. Curran, D. J. Stuehr, J. Stadler, R. L. Simmons and S. A. Murray (1990). "Inducible cytosolic enzyme activity for the production of nitrogen oxides from L-arginine in hepatocytes." *Biochem Biophys Res Commun* **168**(3): 1034-40.
- Black, C. E., N. Huang, P. C. Neligan, R. H. Levine, J. E. Lipa, S. Lintlop, C. R. Forrest and C. Y. Pang (2001). "Effect of nicotine on vasoconstrictor and vasodilator responses in human skin vasculature." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**(4): R1097-104.
- Bourgarel-Rey, V., S. Vallee, O. Rimet, S. Champion, D. Braguer, A. Desobry, C. Briand and Y. Barra (2001). "Involvement of nuclear factor kappaB in c-Myc induction by tubulin polymerization inhibitors." *Mol Pharmacol* **59**(5): 1165-70.
- Bowie, M. L., C. Ibarra and V. L. Seewalt (2008). "IRF-1 promotes apoptosis in p53-damaged basal-type human mammary epithelial cells: a model for early basal-type mammary carcinogenesis." *Adv Exp Med Biol* **617**: 367-74.
- Bredt, D. S. and S. H. Snyder (1992). "Nitric oxide, a novel neuronal messenger." *Neuron* **8**(1): 3-11.
- Breese, C. R., M. J. Lee, C. E. Adams, B. Sullivan, J. Logel, K. M. Gillen, M. J. Marks, A. C. Collins, et al. (2000). "Abnormal regulation of high affinity nicotinic receptors in subjects with schizophrenia." *Neuropsychopharmacology* **23**(4): 351-64.
- Breese, C. R., M. J. Marks, J. Logel, C. E. Adams, B. Sullivan, A. C. Collins and S. Leonard (1997). "Effect of smoking history on [3H]nicotine binding in human postmortem brain." *J Pharmacol Exp Ther* **282**(1): 7-13.
- Brueckmann, M., U. Hoffmann, E. Dvortsak, S. Lang, J. J. Kaden, M. Borggreffe and K. K. Haase (2004). "Drotrecogin alfa (activated) inhibits NF-kappa B activation and MIP-1-alpha release from isolated mononuclear cells of patients with severe sepsis." *Inflamm Res* **53**(10): 528-33.
- Busse, R. and A. Mulsch (1990). "Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells." *FEBS Lett* **275**(1-2): 87-90.
- Buttini, M., S. Limonta and H. W. Boddeke (1996). "Peripheral administration of lipopolysaccharide induces activation of microglial cells in rat brain." *Neurochem Int* **29**(1): 25-35.
- Carlson, N. G., W. A. Wieggl, J. Chen, A. Bacchi, S. W. Rogers and L. C. Gahring (1999). "Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways." *J Immunol* **163**(7): 3963-8.
- Carmody, R. J. and Y. H. Chen (2007). "Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling." *Cell Mol Immunol* **4**(1): 31-41.
- Chan, F. K., H. J. Chun, L. Zheng, R. M. Siegel, K. L. Bui and M. J. Lenardo (2000). "A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling." *Science* **288**(5475): 2351-4.
- Choi, H. J., J. H. Lee, S. Y. Park, J. H. Cho and J. S. Han (2009). "STAT3 is involved in phosphatidic acid-induced Bcl-2 expression in HeLa cells." *Exp Mol Med* **41**(2): 94-101.
- Choi, S. J., K. H. Lee, H. S. Park, S. K. Kim, C. M. Koh and J. Y. Park (2005). "Differential expression, shedding, cytokine regulation and function of TNFR1 and TNFR2 in human fetal astrocytes." *Yonsei Med J* **46**(6): 818-26.
- Conze, D. B., C. J. Wu, J. A. Thomas, A. Landstrom and J. D. Ashwell (2008). "Lys63-linked polyubiquitination of IRAK-1 is required for interleukin-1 receptor- and toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation." *Mol Cell Biol* **28**(10): 3538-47.
- Cordero-Erausquin, M., L. M. Marubio, R. Klink and J. P. Changeux (2000). "Nicotinic receptor function: new perspectives from knockout mice." *Trends Pharmacol Sci* **21**(6): 211-7.

- Corringer, P. J., J. Sallette and J. P. Changeux (2006). "Nicotine enhances intracellular nicotinic receptor maturation: a novel mechanism of neural plasticity?" J Physiol Paris **99**(2-3): 162-71.
- Darsow, T., T. K. Booker, J. C. Pina-Crespo and S. F. Heinemann (2005). "Exocytic trafficking is required for nicotine-induced up-regulation of alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptors." J Biol Chem **280**(18): 18311-20.
- de Jonge, W. J. and L. Ulloa (2007). "The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation." Br J Pharmacol **151**(7): 915-29.
- Dehmer, T., J. Lindenau, S. Haid, J. Dichgans and J. B. Schulz (2000). "Deficiency of inducible nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity in vivo." J Neurochem **74**(5): 2213-6.
- Didier, M., S. A. Berman, J. Lindstrom and S. Bursztajn (1995). "Characterization of nicotinic acetylcholine receptors expressed in primary cultures of cerebellar granule cells." Brain Res Mol Brain Res **30**(1): 17-28.
- Djordjevic, M. V. and K. A. Doran (2009). "Nicotine content and delivery across tobacco products." Handb Exp Pharmacol(192): 61-82.
- Dowling, O., B. Rochelson, K. Way, Y. Al-Abed and C. N. Metz (2007). "Nicotine inhibits cytokine production by placenta cells via NFkappaB: potential role in pregnancy-induced hypertension." Mol Med **13**(11-12): 576-83.
- Feitelson, J. B., P. P. Rowell, C. S. Roberts and J. T. Fleming (2003). "Two week nicotine treatment selectively increases bone vascular constriction in response to norepinephrine." J Orthop Res **21**(3): 497-502.
- Ferrari, M. F. and D. R. Fior-Chadi (2007). "Chronic nicotine administration. Analysis of the development of hypertension and glutamatergic neurotransmission." Brain Res Bull **72**(4-6): 215-24.
- Flores, C. M., S. W. Rogers, L. A. Pabreza, B. B. Wolfe and K. J. Kellar (1992). "A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alpha 4 and beta 2 subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment." Mol Pharmacol **41**(1): 31-7.
- Freedman, R., C. E. Adams and S. Leonard (2000). "The alpha7-nicotinic acetylcholine receptor and the pathology of hippocampal interneurons in schizophrenia." J Chem Neuroanat **20**(3-4): 299-306.
- Fu, Y., S. G. Matta, V. B. Kane and B. M. Sharp (2003). "Norepinephrine release in amygdala of rats during chronic nicotine self-administration: an in vivo microdialysis study." Neuropharmacology **45**(4): 514-23.
- Fujii, Y. X., H. Fujigaya, Y. Moriwaki, H. Misawa, T. Kasahara, S. A. Grando and K. Kawashima (2007). "Enhanced serum antigen-specific IgG1 and proinflammatory cytokine production in nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit gene knockout mice." J Neuroimmunol **189**(1-2): 69-74.
- Gahring, L. C. and S. W. Rogers (2005). "Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells." Aaps J **7**(4): E885-94.
- Gallowitsch-Puerta, M. and V. A. Pavlov (2007). "Neuro-immune interactions via the cholinergic anti-inflammatory pathway." Life Sci **80**(24-25): 2325-9.
- Gao, H. M., B. Liu, W. Zhang and J. S. Hong (2003). "Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease." Trends Pharmacol Sci **24**(8): 395-401.
- Gao, Y. J., A. C. Holloway, L. Y. Su, K. Takemori, C. Lu and R. M. Lee (2008). "Effects of fetal and neonatal exposure to nicotine on blood pressure and perivascular adipose tissue function in adult life." Eur J Pharmacol **590**(1-3): 264-8.
- Garthwaite, J. and C. L. Boulton (1995). "Nitric oxide signaling in the central nervous system." Annu Rev Physiol **57**: 683-706.
- Gay, E. A., R. C. Klein, M. A. Melton, P. J. Blackshear and J. L. Yakel (2008). "Inhibition of native and recombinant nicotinic acetylcholine receptors by the myristoylated alanine-rich C kinase substrate peptide." J Pharmacol Exp Ther **327**(3): 884-90.

- Ghia, J. E., P. Blennerhassett, H. Kumar-Ondiveeran, E. F. Verdu and S. M. Collins (2006). "The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model." *Gastroenterology* **131**(4): 1122-30.
- Ghosh, S. and M. S. Hayden (2008). "New regulators of NF-kappaB in inflammation." *Nat Rev Immunol* **8**(11): 837-48.
- Ghosh, S., M. J. May and E. B. Kopp (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." *Annu Rev Immunol* **16**: 225-60.
- Gibson, R. M., N. J. Rothwell and R. A. Le Feuvre (2004). "CNS injury: the role of the cytokine IL-1." *Vet J* **168**(3): 230-7.
- Girod, R., G. Crabtree, G. Ernstom, J. Ramirez-Latorre, D. McGehee, J. Turner and L. Role (1999). "Heteromeric complexes of alpha 5 and/or alpha 7 subunits. Effects of calcium and potential role in nicotine-induced presynaptic facilitation." *Ann N Y Acad Sci* **868**: 578-90.
- Girod, R. and L. W. Role (2001). "Long-lasting enhancement of glutamatergic synaptic transmission by acetylcholine contrasts with response adaptation after exposure to low-level nicotine." *J Neurosci* **21**(14): 5182-90.
- Glezer, I., C. D. Munhoz, E. M. Kawamoto, T. Marcourakis, M. C. Avellar and C. Scavone (2003). "MK-801 and 7-Ni attenuate the activation of brain NF-kappa B induced by LPS." *Neuropharmacology* **45**(8): 1120-9.
- Gotti, C. and F. Clementi (2004). "Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology." *Prog Neurobiol* **74**(6): 363-96.
- Gotti, C., M. Moretti, A. Gaimarri, A. Zanardi, F. Clementi and M. Zoli (2007). "Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors." *Biochem Pharmacol* **74**(8): 1102-11.
- Gotti, C., M. Zoli and F. Clementi (2006). "Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance." *Trends Pharmacol Sci* **27**(9): 482-91.
- Grove, M. and M. Plumb (1993). "C/EBP, NF-kappa B, and c-Ets family members and transcriptional regulation of the cell-specific and inducible macrophage inflammatory protein 1 alpha immediate-early gene." *Mol Cell Biol* **13**(9): 5276-89.
- Guan, Z. Z., A. Nordberg, M. Mousavi, J. O. Rinne and E. Hellstrom-Lindahl (2002). "Selective changes in the levels of nicotinic acetylcholine receptor protein and of corresponding mRNA species in the brains of patients with Parkinson's disease." *Brain Res* **956**(2): 358-66.
- Hanson, D. R. and Gottesman, II (2005). "Theories of schizophrenia: a genetic-inflammatory-vascular synthesis." *BMC Med Genet* **6**: 7.
- Hua, B., M. Tamamori-Adachi, Y. Luo, K. Tamura, M. Morioka, M. Fukuda, Y. Tanaka and S. Kitajima (2006). "A splice variant of stress response gene ATF3 counteracts NF-kappaB-dependent anti-apoptosis through inhibiting recruitment of CREB-binding protein/p300 coactivator." *J Biol Chem* **281**(3): 1620-9.
- Husebye, H., O. Halaas, H. Stenmark, G. Tunheim, O. Sandanger, B. Bogen, A. Brech, E. Latz, et al. (2006). "Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity." *Embo J* **25**(4): 683-92.
- Jack, C., F. Ruffini, A. Bar-Or and J. P. Antel (2005). "Microglia and multiple sclerosis." *J Neurosci Res* **81**(3): 363-73.
- Jacob, P., 3rd, M. Ulgen and J. W. Gorrod (1997). "Metabolism of (-)-(S)-nicotine by guinea pig and rat brain: identification of cotinine." *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **22**(4): 391-4.
- Janssens, S. P., A. Shimouchi, T. Quertermous, D. B. Bloch and K. D. Bloch (1992). "Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase." *J Biol Chem* **267**(21): 14519-22.
- Jerala, R. (2007). "Structural biology of the LPS recognition." *Int J Med Microbiol* **297**(5): 353-63.

- Jones, G. M., B. J. Sahakian, R. Levy, D. M. Warburton and J. A. Gray (1992). "Effects of acute subcutaneous nicotine on attention, information processing and short-term memory in Alzheimer's disease." *Psychopharmacology (Berl)* **108**(4): 485-94.
- Jones, S., S. Sudweeks and J. L. Yakel (1999). "Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function." *Trends Neurosci* **22**(12): 555-61.
- Kagan, J. C., T. Su, T. Horng, A. Chow, S. Akira and R. Medzhitov (2008). "TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta." *Nat Immunol* **9**(4): 361-8.
- Kaibori, M., H. Yanagida, H. Nakanishi, T. Ozaki, H. Yoshida, K. Matsui, T. Hijikawa, Y. Kamiyama, et al. (2006). "Hepatocyte growth factor stimulates the induction of cytokine-induced neutrophil chemoattractant through the activation of NF-kappaB in rat hepatocytes." *J Surg Res* **130**(1): 88-93.
- Kaltschmidt, B., M. Uherek, B. Volk, P. A. Baeuerle and C. Kaltschmidt (1997). "Transcription factor NF-kappaB is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(6): 2642-7.
- Kawamoto, E. M., C. D. Munhoz, I. Glezer, V. S. Bahia, P. Caramelli, R. Nitrini, R. Gorjao, R. Curi, et al. (2005). "Oxidative state in platelets and erythrocytes in aging and Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* **26**(6): 857-64.
- Kelton, M. C., H. J. Kahn, C. L. Conrath and P. A. Newhouse (2000). "The effects of nicotine on Parkinson's disease." *Brain Cogn* **43**(1-3): 274-82.
- Khiroug, S. S., P. C. Harkness, P. W. Lamb, S. N. Sudweeks, L. Khiroug, N. S. Millar and J. L. Yakel (2002). "Rat nicotinic ACh receptor alpha7 and beta2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels." *J Physiol* **540**(Pt 2): 425-34.
- Kihara, T., S. Shimohama, M. Urushitani, H. Sawada, J. Kimura, T. Kume, T. Maeda and A. Akaike (1998). "Stimulation of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors inhibits beta-amyloid toxicity." *Brain Res* **792**(2): 331-4.
- Kilbourn, R. G. and P. Belloni (1990). "Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon gamma in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1, or endotoxin." *J Natl Cancer Inst* **82**(9): 772-6.
- Koyama, T., C. Kimura, S. J. Park, M. Oike and Y. Ito (2002). "Functional implications of Ca²⁺ mobilizing properties for nitric oxide production in aortic endothelium." *Life Sci* **72**(4-5): 511-20.
- Kumar, A., Y. Takada, A. M. Boriek and B. B. Aggarwal (2004). "Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease." *J Mol Med* **82**(7): 434-48.
- Lee, M., C. Martin-Ruiz, A. Graham, J. Court, E. Jaros, R. Perry, P. Iversen, M. Bauman, et al. (2002). "Nicotinic receptor abnormalities in the cerebellar cortex in autism." *Brain* **125**(Pt 7): 1483-95.
- Lehnardt, S., C. Lachance, S. Patrizi, S. Lefebvre, P. L. Follett, F. E. Jensen, P. A. Rosenberg, J. J. Volpe, et al. (2002). "The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS." *J Neurosci* **22**(7): 2478-86.
- Leonard, S., C. Breese, C. Adams, K. Benhammou, J. Gault, K. Stevens, M. Lee, L. Adler, et al. (2000). "Smoking and schizophrenia: abnormal nicotinic receptor expression." *Eur J Pharmacol* **393**(1-3): 237-42.
- Levin, E. D. (2002). "Nicotinic receptor subtypes and cognitive function." *J Neurobiol* **53**(4): 633-40.
- Levin, E. D., A. Bradley, N. Addy and N. Sigurani (2002). "Hippocampal alpha 7 and alpha 4 beta 2 nicotinic receptors and working memory." *Neuroscience* **109**(4): 757-65.
- Liberatore, G. T., V. Jackson-Lewis, S. Vukosavic, A. S. Mandir, M. Vila, W. G. McAuliffe, V. L. Dawson, T. M. Dawson, et al. (1999). "Inducible nitric oxide synthase stimulates

- dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease." Nat Med **5**(12): 1403-9.
- Limon, I. D., A. Diaz, L. Mendieta, G. Chamorro, B. Espinosa, E. Zenteno and J. Guevara (2009). "Amyloid-beta(25-35) impairs memory and increases NO in the temporal cortex of rats." Neurosci Res **63**(2): 129-37.
- Liu, Q., H. Kawai and D. K. Berg (2001). "beta -Amyloid peptide blocks the response of alpha 7-containing nicotinic receptors on hippocampal neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(8): 4734-9.
- Liu, Q., J. Zhang, H. Zhu, C. Qin, Q. Chen and B. Zhao (2007). "Dissecting the signaling pathway of nicotine-mediated neuroprotection in a mouse Alzheimer disease model." Faseb J **21**(1): 61-73.
- Liu, S. F., X. Ye and A. B. Malik (1999). "Inhibition of NF-kappaB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents In vivo expression of proinflammatory genes." Circulation **100**(12): 1330-7.
- Lockman, P. R., G. McAfee, W. J. Geldenhuys, C. J. Van der Schyf, T. J. Abbruscato and D. D. Allen (2005). "Brain uptake kinetics of nicotine and cotinine after chronic nicotine exposure." J Pharmacol Exp Ther **314**(2): 636-42.
- Lucas, S. M., N. J. Rothwell and R. M. Gibson (2006). "The role of inflammation in CNS injury and disease." Br J Pharmacol **147 Suppl 1**: S232-40.
- Lyons, C. R., G. J. Orloff and J. M. Cunningham (1992). "Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line." J Biol Chem **267**(9): 6370-4.
- Madretsma, G. S., G. J. Donze, A. P. van Dijk, C. J. Tak, J. H. Wilson and F. J. Zijlstra (1996). "Nicotine inhibits the in vitro production of interleukin 2 and tumour necrosis factor-alpha by human mononuclear cells." Immunopharmacology **35**(1): 47-51.
- Maggio, R., M. Riva, F. Vaglini, F. Fornai, R. Molteni, M. Armogida, G. Racagni and G. U. Corsini (1998). "Nicotine prevents experimental parkinsonism in rodents and induces striatal increase of neurotrophic factors." J Neurochem **71**(6): 2439-46.
- Mai, H., W. S. May, F. Gao, Z. Jin and X. Deng (2003). "A functional role for nicotine in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis." J Biol Chem **278**(3): 1886-91.
- Marks, M. J., J. B. Burch and A. C. Collins (1983). "Effects of chronic nicotine infusion on tolerance development and nicotinic receptors." J Pharmacol Exp Ther **226**(3): 817-25.
- Marks, M. J., J. R. Pauly, S. D. Gross, E. S. Deneris, I. Hermans-Borgmeyer, S. F. Heinemann and A. C. Collins (1992). "Nicotine binding and nicotinic receptor subunit RNA after chronic nicotine treatment." J Neurosci **12**(7): 2765-84.
- Marletta, M. A., P. S. Yoon, R. Iyengar, C. D. Leaf and J. S. Wishnok (1988). "Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate." Biochemistry **27**(24): 8706-11.
- Martin-Ruiz, C. M., J. A. Court, E. Molnar, M. Lee, C. Gotti, A. Mamalaki, T. Tsouloufis, S. Tzartos, et al. (1999). "Alpha4 but not alpha3 and alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunits are lost from the temporal cortex in Alzheimer's disease." J Neurochem **73**(4): 1635-40.
- Mastropaolo, J., R. B. Rosse and S. I. Deutsch (2004). "Anabasine, a selective nicotinic acetylcholine receptor agonist, antagonizes MK-801-elicited mouse popping behavior, an animal model of schizophrenia." Behav Brain Res **153**(2): 419-22.
- McAllister-Sistilli, C. G., A. R. Caggiula, S. Knopf, C. A. Rose, A. L. Miller and E. C. Donny (1998). "The effects of nicotine on the immune system." Psychoneuroendocrinology **23**(2): 175-87.
- McGeer, P. L. and E. G. McGeer (2004). "Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease." Parkinsonism Relat Disord **10 Suppl 1**: S3-7.

- Meberg, P. J., W. R. Kinney, E. G. Valcourt and A. Routtenberg (1996). "Gene expression of the transcription factor NF-kappa B in hippocampus: regulation by synaptic activity." Brain Res Mol Brain Res **38**(2): 179-90.
- Metherate, R. (2004). "Nicotinic acetylcholine receptors in sensory cortex." Learn Mem **11**(1): 50-9.
- Metherate, R., C. L. Cox and J. H. Ashe (1992). "Cellular bases of neocortical activation: modulation of neural oscillations by the nucleus basalis and endogenous acetylcholine." J Neurosci **12**(12): 4701-11.
- Meyer, E. L., Y. Xiao and K. J. Kellar (2001). "Agonist regulation of rat alpha 3 beta 4 nicotinic acetylcholine receptors stably expressed in human embryonic kidney 293 cells." Mol Pharmacol **60**(3): 568-76.
- Minana, M. D., C. Montoliu, M. Llansola, S. Grisolia and V. Felipo (1998). "Nicotine prevents glutamate-induced proteolysis of the microtubule-associated protein MAP-2 and glutamate neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons." Neuropharmacology **37**(7): 847-57.
- Moncada, S. and J. P. Bolanos (2006). "Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration." J Neurochem **97**(6): 1676-89.
- Motoki, K., H. Kishi, E. Hori, K. Tajiri, H. Nishijo and A. Muraguchi (2009). "The direct excitatory effect of IL-1beta on cerebellar Purkinje cell." Biochem Biophys Res Commun **379**(3): 665-8.
- Nadeau, S. and S. Rivest (2000). "Role of microglial-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and nuclear factor kappa B activity in the brain during endotoxemia." J Neurosci **20**(9): 3456-68.
- Newman, M. B., G. W. Arendash, R. D. Shytle, P. C. Bickford, T. Tighe and P. R. Sanberg (2002). "Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS." Life Sci **71**(24): 2807-20.
- Nguyen, H. N., B. A. Rasmussen and D. C. Perry (2003). "Subtype-selective up-regulation by chronic nicotine of high-affinity nicotinic receptors in rat brain demonstrated by receptor autoradiography." J Pharmacol Exp Ther **307**(3): 1090-7.
- Ni, M., Y. Wang, M. Zhang, P. F. Zhang, S. F. Ding, C. X. Liu, X. L. Liu, Y. X. Zhao, et al. (2009). "Atherosclerotic Plaque Disruption Induced by Stress and Lipopolysaccharide in Apolipoprotein E Knockout Mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol.
- Nicholson, D. W. and N. A. Thornberry (1997). "Caspases: killer proteases." Trends Biochem Sci **22**(8): 299-306.
- O'Neill, L. A. and A. G. Bowie (2007). "The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **7**(5): 353-64.
- O'Neill, L. A. and C. Greene (1998). "Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants." J Leukoc Biol **63**(6): 650-7.
- O'Neill, L. A. and C. Kaltschmidt (1997). "NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function." Trends Neurosci **20**(6): 252-8.
- Oishi, N., K. Hashikawa, H. Yoshida, K. Ishizu, M. Ueda, H. Kawashima, H. Saji and H. Fukuyama (2007). "Quantification of nicotinic acetylcholine receptors in Parkinson's disease with (123)I-5IA SPECT." J Neurol Sci **256**(1-2): 52-60.
- Oltvai, Z. N., C. L. Millman and S. J. Korsmeyer (1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." Cell **74**(4): 609-19.
- Ono, K., K. Hasegawa, M. Yamada and H. Naiki (2002). "Nicotine breaks down preformed Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro." Biol Psychiatry **52**(9): 880-6.
- Orr-Urtreger, A., F. M. Goldner, M. Saeki, I. Lorenzo, L. Goldberg, M. De Biasi, J. A. Dani, J. W. Patrick, et al. (1997). "Mice deficient in the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor lack alpha-bungarotoxin binding sites and hippocampal fast nicotinic currents." J Neurosci **17**(23): 9165-71.

- Orr-Urtreger, A., M. Kedmi, S. Rosner, F. Karmeli and D. Rachmilewitz (2005). "Increased severity of experimental colitis in alpha 5 nicotinic acetylcholine receptor subunit-deficient mice." *Neuroreport* **16**(10): 1123-7.
- Ouaaz, F. (1995). "Nitric oxide in human haematopoiesis." *Res Immunol* **146**(9): 678-81.
- Pabst, M. J., K. M. Pabst, J. A. Collier, T. C. Coleman, M. L. Lemons-Prince, M. S. Godat, M. B. Waring and J. P. Babu (1995). "Inhibition of neutrophil and monocyte defensive functions by nicotine." *J Periodontol* **66**(12): 1047-55.
- Palombella, V. J., O. J. Rando, A. L. Goldberg and T. Maniatis (1994). "The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B." *Cell* **78**(5): 773-85.
- Papke, R. L., L. P. Dwoskin and P. A. Crooks (2007). "The pharmacological activity of nicotine and nornicotine on nAChRs subtypes: relevance to nicotine dependence and drug discovery." *J Neurochem* **101**(1): 160-7.
- Papke, R. L., L. P. Dwoskin, P. A. Crooks, G. Zheng, Z. Zhang, J. M. McIntosh and C. Stokes (2008). "Extending the analysis of nicotinic receptor antagonists with the study of alpha6 nicotinic receptor subunit chimeras." *Neuropharmacology* **54**(8): 1189-200.
- Papke, R. L., P. R. Sanberg and R. D. Shytle (2001). "Analysis of mecamylamine stereoisomers on human nicotinic receptor subtypes." *J Pharmacol Exp Ther* **297**(2): 646-56.
- Park, H. J., P. H. Lee, Y. W. Ahn, Y. J. Choi, G. Lee, D. Y. Lee, E. S. Chung and B. K. Jin (2007). "Neuroprotective effect of nicotine on dopaminergic neurons by anti-inflammatory action." *Eur J Neurosci* **26**(1): 79-89.
- Parks, J. K., T. S. Smith, P. A. Trimmer, J. P. Bennett, Jr. and W. D. Parker, Jr. (2001). "Neurotoxic Abeta peptides increase oxidative stress in vivo through NMDA-receptor and nitric-oxide-synthase mechanisms, and inhibit complex IV activity and induce a mitochondrial permeability transition in vitro." *J Neurochem* **76**(4): 1050-6.
- Patel, H. C., H. Boutin and S. M. Allan (2003). "Interleukin-1 in the brain: mechanisms of action in acute neurodegeneration." *Ann N Y Acad Sci* **992**: 39-47.
- Patton, G. W., D. A. Powell, A. Hakki, H. Friedman and S. Pross (2006). "Nicotine modulation of cytokine induction by LPS-stimulated human monocytes and coronary artery endothelial cells." *Int Immunopharmacol* **6**(1): 26-35.
- Pavlov, V. A. and K. J. Tracey (2004). "Neural regulators of innate immune responses and inflammation." *Cell Mol Life Sci* **61**(18): 2322-31.
- Peng, X., V. Gerzanich, R. Anand, F. Wang and J. Lindstrom (1997). "Chronic nicotine treatment up-regulates alpha3 and alpha7 acetylcholine receptor subtypes expressed by the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y." *Mol Pharmacol* **51**(5): 776-84.
- Perry, D. C., M. I. Davila-Garcia, C. A. Stockmeier and K. J. Kellar (1999). "Increased nicotinic receptors in brains from smokers: membrane binding and autoradiography studies." *J Pharmacol Exp Ther* **289**(3): 1545-52.
- Pettit, D. L., Z. Shao and J. L. Yakel (2001). "beta-Amyloid(1-42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice." *J Neurosci* **21**(1): RC120.
- Pfeilschifter, J., J. Leighton, W. Pignat, F. Marki and K. Vosbeck (1991). "Cyclic AMP mimics, but does not mediate, interleukin-1- and tumour-necrosis-factor-stimulated phospholipase A2 secretion from rat renal mesangial cells." *Biochem J* **273**(Pt 1): 199-204.
- Picciotto, M. R., B. J. Caldarone, S. L. King and V. Zachariou (2000). "Nicotinic receptors in the brain. Links between molecular biology and behavior." *Neuropsychopharmacology* **22**(5): 451-65.
- Picciotto, M. R., M. Zoli, C. Lena, A. Bessis, Y. Lallemand, N. Le Novere, P. Vincent, E. M. Pich, et al. (1995). "Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotine receptor in the brain." *Nature* **374**(6517): 65-7.

- Pickart, C. M. (1997). "Targeting of substrates to the 26S proteasome." *Faseb J* **11**(13): 1055-66.
- Pimlott, S. L., M. Piggott, J. Owens, E. Greally, J. A. Court, E. Jaros, R. H. Perry, E. K. Perry, et al. (2004). "Nicotinic acetylcholine receptor distribution in Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease, and vascular dementia: in vitro binding study using 5-[(125)I]-a-85380." *Neuropsychopharmacology* **29**(1): 108-16.
- Piubelli, C., D. Cecconi, H. Astner, F. Caldara, M. Tessari, L. Carboni, M. Hamdan, P. G. Righetti, et al. (2005). "Proteomic changes in rat serum, polymorphonuclear and mononuclear leukocytes after chronic nicotine administration." *Proteomics* **5**(5): 1382-94.
- Qin, H., C. A. Wilson, S. J. Lee, X. Zhao and E. N. Benveniste (2005). "LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF-kappaB and STAT-1alpha in macrophages and microglia." *Blood* **106**(9): 3114-22.
- Quik, M., T. Bordia and K. O'Leary (2007). "Nicotinic receptors as CNS targets for Parkinson's disease." *Biochem Pharmacol* **74**(8): 1224-34.
- Rainero, I., M. Bo, M. Ferrero, W. Valfre, G. Vaula and L. Pinessi (2004). "Association between the interleukin-1alpha gene and Alzheimer's disease: a meta-analysis." *Neurobiol Aging* **25**(10): 1293-8.
- Raivich, G. and R. Banati (2004). "Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease." *Brain Res Brain Res Rev* **46**(3): 261-81.
- Ravikumar, R., G. Flora, J. W. Geddes, B. Hennig and M. Toborek (2004). "Nicotine attenuates oxidative stress, activation of redox-regulated transcription factors and induction of proinflammatory genes in compressive spinal cord trauma." *Brain Res Mol Brain Res* **124**(2): 188-98.
- Razani-Boroujerdi, S., S. P. Singh, C. Knall, F. F. Hahn, J. C. Pena-Philippides, R. Kalra, R. J. Langley and M. L. Sopori (2004). "Chronic nicotine inhibits inflammation and promotes influenza infection." *Cell Immunol* **230**(1): 1-9.
- Reno, L. A., W. Zago and R. P. Markus (2004). "Release of [(3)H]-L-glutamate by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in rat cerebellar slices." *Neuroscience* **124**(3): 647-53.
- Rezvani, K., Y. Teng, D. Shim and M. De Biasi (2007). "Nicotine regulates multiple synaptic proteins by inhibiting proteasomal activity." *J Neurosci* **27**(39): 10508-19.
- Rolls, A., R. Shechter, A. London, Y. Ziv, A. Ronen, R. Levy and M. Schwartz (2007). "Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis." *Nat Cell Biol* **9**(9): 1081-8.
- Romanelli, M. N. and F. Gualtieri (2003). "Cholinergic nicotinic receptors: competitive ligands, allosteric modulators, and their potential applications." *Med Res Rev* **23**(4): 393-426.
- Rosemberg J, Rosemberg AMA, Moraes MA. Nicotina: droga universal. São Paulo: Secretaria da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica; 2003.
- Rothwell, N. (2003). "Interleukin-1 and neuronal injury: mechanisms, modification, and therapeutic potential." *Brain Behav Immun* **17**(3): 152-7.
- Sallete, J., S. Bohler, P. Benoit, M. Soudant, S. Pons, N. Le Novere, J. P. Changeux and P. J. Corringer (2004). "An extracellular protein microdomain controls up-regulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by nicotine." *J Biol Chem* **279**(18): 18767-75.
- Sallete, J., S. Pons, A. Devillers-Thiery, M. Soudant, L. Prado de Carvalho, J. P. Changeux and P. J. Corringer (2005). "Nicotine upregulates its own receptors through enhanced intracellular maturation." *Neuron* **46**(4): 595-607.
- Sanderson, E. M., A. L. Drasdo, K. McCrea and S. Wonnacott (1993). "Upregulation of nicotinic receptors following continuous infusion of nicotine is brain-region-specific." *Brain Res* **617**(2): 349-52.

- Sasagawa, S., K. Suzuki, T. Sakatani and T. Fujikura (1985). "Effects of nicotine on the functions of human polymorphonuclear leukocytes in vitro." *J Leukoc Biol* 37(5): 493-502.
- Schapira, M., R. Abagyan and M. Totrov (2002). "Structural model of nicotinic acetylcholine receptor isotypes bound to acetylcholine and nicotine." *BMC Struct Biol* 2: 1.
- Schutze, S., V. Tchikov and W. Schneider-Brachert (2008). "Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(8): 655-62.
- Schwartz, R. D. and K. J. Kellar (1983). "Nicotinic cholinergic receptor binding sites in the brain: regulation in vivo." *Science* 220(4593): 214-6.
- Shanley, T. P., H. Schmal, R. L. Warner, E. Schmid, H. P. Friedl and P. A. Ward (1997). "Requirement for C-X-C chemokines (macrophage inflammatory protein-2 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant) in IgG immune complex-induced lung injury." *J Immunol* 158(7): 3439-48.
- Shaw, S., M. Bencherif and M. B. Marrero (2002). "Janus kinase 2, an early target of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection against Abeta-(1-42) amyloid." *J Biol Chem* 277(47): 44920-4.
- Sheng, J. G., W. S. Griffin, M. C. Royston and R. E. Mrak (1998). "Distribution of interleukin-1-immunoreactive microglia in cerebral cortical layers: implications for neuritic plaque formation in Alzheimer's disease." *Neuropathol Appl Neurobiol* 24(4): 278-83.
- Shytle, R. D., T. Mori, K. Townsend, M. Vendrame, N. Sun, J. Zeng, J. Ehrhart, A. A. Silver, et al. (2004). "Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors." *J Neurochem* 89(2): 337-43.
- Siebenlist, U. (1997). "NF kappa B/I kappa B proteins. Their role in cell growth, differentiation and development. Madrid, Spain, July 7-10, 1996." *Biochim Biophys Acta* 1332(1): R7-13.
- Siegmund, B., E. Leitner and W. Pfannhauser (1999). "Determination of the nicotine content of various edible nightshades (Solanaceae) and their products and estimation of the associated dietary nicotine intake." *J Agric Food Chem* 47(8): 3113-20.
- Sims, J. E., C. J. March, D. Cosman, M. B. Widmer, H. R. MacDonald, C. J. McMahan, C. E. Grubin, J. M. Wignall, et al. (1988). "cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily." *Science* 241(4865): 585-9.
- Singh, S. P., R. Kalra, P. Puttfarcken, A. Kozak, J. Tesfaigzi and M. L. Sopori (2000). "Acute and chronic nicotine exposures modulate the immune system through different pathways." *Toxicol Appl Pharmacol* 164(1): 65-72.
- Sopori, M. L., W. Kozak, S. M. Savage, Y. Geng, D. Soszynski, M. J. Kluger, E. K. Perryman and G. E. Snow (1998). "Effect of nicotine on the immune system: possible regulation of immune responses by central and peripheral mechanisms." *Psychoneuroendocrinology* 23(2): 189-204.
- Sugano, N., K. Shimada, K. Ito and S. Murai (1998). "Nicotine inhibits the production of inflammatory mediators in U937 cells through modulation of nuclear factor-kappaB activation." *Biochem Biophys Res Commun* 252(1): 25-8.
- Suzuki, T., I. Hide, A. Matsubara, C. Hama, K. Harada, K. Miyano, M. Andra, H. Matsubayashi, et al. (2006). "Microglial alpha7 nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP3 pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role." *J Neurosci Res* 83(8): 1461-70.
- Takano, K. and H. Nakagawa (2001). "Contribution of cytokine-induced neutrophil chemoattractant CINC-2 and CINC-3 to neutrophil recruitment in lipopolysaccharide-induced inflammation in rats." *Inflamm Res* 50(10): 503-8.
- Tang, S. C., J. D. Lathia, P. K. Selvaraj, D. G. Jo, M. R. Mughal, A. Cheng, D. A. Siler, W. R. Markesbery, et al. (2008). "Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by

- amyloid beta-peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal." Exp Neurol **213**(1): 114-21.
- Tian, J., X. Lin, W. Zhou and J. Xu (2003). "Hydroxyethyl starch inhibits NF-kappaB activation and prevents the expression of inflammatory mediators in endotoxic rats." Ann Clin Lab Sci **33**(4): 451-8.
- Touzani, O., H. Boutin, J. Chuquet and N. Rothwell (1999). "Potential mechanisms of interleukin-1 involvement in cerebral ischaemia." J Neuroimmunol **100**(1-2): 203-15.
- Tracey, D., L. Klareskog, E. H. Sasso, J. G. Salfeld and P. P. Tak (2008). "Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review." Pharmacol Ther **117**(2): 244-79.
- Turek, J. W., C. H. Kang, J. E. Campbell, S. P. Arneric and J. P. Sullivan (1995). "A sensitive technique for the detection of the alpha 7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor antagonist, methyllycaconitine, in rat plasma and brain." J Neurosci Methods **61**(1-2): 113-8.
- Turner, L. N., R. Balasubramaniam, E. V. Hersh and E. T. Stoopler (2008). "Drug therapy in Alzheimer disease: an update for the oral health care provider." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **106**(4): 467-76.
- Turner, J. R. and K. J. Kellar (2005). "Nicotinic cholinergic receptors in the rat cerebellum: multiple heteromeric subtypes." J Neurosci **25**(40): 9258-65.
- Ulloa, L. and P. Wang (2007). "The neuronal strategy for inflammation." Novartis Found Symp **280**: 223-33; discussion 233-7.
- Utsuki, T., M. Shoaib, H. W. Holloway, D. K. Ingram, W. C. Wallace, V. Haroutunian, K. Sambamurti, D. K. Lahiri, et al. (2002). "Nicotine lowers the secretion of the Alzheimer's amyloid beta-protein precursor that contains amyloid beta-peptide in rat." J Alzheimers Dis **4**(5): 405-15.
- Van Der Zanden, E. P., G. E. Boeckstaens and W. J. de Jonge (2009). "The vagus nerve as a modulator of intestinal inflammation." Neurogastroenterol Motil **21**(1): 6-17.
- van Lieshout, A. W., M. C. Vonk, S. J. Bredie, L. B. Joosten, M. G. Netea, P. L. van Riel, R. Lafyatis, F. H. van den Hoogen, et al. (2009). "Enhanced interleukin-10 production by dendritic cells upon stimulation with Toll-like receptor 4 agonists in systemic sclerosis that is possibly implicated in CCL18 secretion." Scand J Rheumatol: 1-9.
- Vassallo, R., P. R. Kroening, J. Parambil and H. Kita (2008). "Nicotine and oxidative cigarette smoke constituents induce immune-modulatory and pro-inflammatory dendritic cell responses." Mol Immunol **45**(12): 3321-9.
- Vaupel, D. B., E. A. Stein and A. G. Mukhin (2007). "Quantification of alpha4beta2* nicotinic receptors in the rat brain with microPET and 2-[18F]F-A-85380." Neuroimage **34**(4): 1352-62.
- Villafane, G., P. Cesaro, A. Rialland, S. Baloul, S. Azimi, C. Bourdet, J. Le Houezec, I. Macquin-Mavier, et al. (2007). "Chronic high dose transdermal nicotine in Parkinson's disease: an open trial." Eur J Neurol **14**(12): 1313-6.
- Wang, F., M. E. Nelson, A. Kuryatov, F. Olale, J. Cooper, K. Keyser and J. Lindstrom (1998). "Chronic nicotine treatment up-regulates human alpha3 beta2 but not alpha3 beta4 acetylcholine receptors stably transfected in human embryonic kidney cells." J Biol Chem **273**(44): 28721-32.
- Wang, H., M. Yu, M. Ochani, C. A. Amella, M. Tanovic, S. Susarla, J. H. Li, H. Wang, et al. (2003). "Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation." Nature **421**(6921): 384-8.
- Warpman, U. and A. Nordberg (1995). "Epibatidine and ABT 418 reveal selective losses of alpha 4 beta 2 nicotinic receptors in Alzheimer brains." Neuroreport **6**(17): 2419-23.
- Wevers, A., L. Burghaus, N. Moser, B. Witter, O. K. Steinlein, U. Schutz, B. Achnitz, U. Krempel, et al. (2000). "Expression of nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's

- disease: postmortem investigations and experimental approaches." Behav Brain Res **113**(1-2): 207-15.
- White, H. K. and E. D. Levin (2004). "Chronic transdermal nicotine patch treatment effects on cognitive performance in age-associated memory impairment." Psychopharmacology (Berl) **171**(4): 465-71.
- Whiteaker, P., C. G. Sharples and S. Wonnacott (1998). "Agonist-induced up-regulation of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors in M10 cells: pharmacological and spatial definition." Mol Pharmacol **53**(5): 950-62.
- Wittebole, X., S. Hahm, S. M. Coyle, A. Kumar, S. E. Calvano and S. F. Lowry (2007). "Nicotine exposure alters in vivo human responses to endotoxin." Clin Exp Immunol **147**(1): 28-34.
- Wonnacott, S. (1997). "Presynaptic nicotinic ACh receptors." Trends Neurosci **20**(2): 92-8.
- Woolf, N. J. (1991). "Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord." Prog Neurobiol **37**(6): 475-524.
- Woolf, N. J. (1996). "The critical role of cholinergic basal forebrain neurons in morphological change and memory encoding: a hypothesis." Neurobiol Learn Mem **66**(3): 258-66.
- Wsol, A., A. Cudnoch-Jedrzejewska, E. Szczepanska-Sadowska, S. Kowalewski and L. Puchalska (2008). "Oxytocin in the cardiovascular responses to stress." J Physiol Pharmacol **59 Suppl 8**: 123-7.
- Xiao, D., Z. Xu, X. Huang, L. D. Longo, S. Yang and L. Zhang (2008). "Prenatal gender-related nicotine exposure increases blood pressure response to angiotensin II in adult offspring." Hypertension **51**(4): 1239-47.
- Yalcin, A., E. Koulich, S. Mohamed, L. Liu and S. R. D'Mello (2003). "Apoptosis in cerebellar granule neurons is associated with reduced interaction between CREB-binding protein and NF-kappaB." J Neurochem **84**(2): 397-408.
- Yoshikawa, H., M. Kurokawa, N. Ozaki, K. Nara, K. Atou, E. Takada, H. Kamochi and N. Suzuki (2006). "Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I-kappaB phosphorylation and nuclear factor-kappaB transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor alpha7." Clin Exp Immunol **146**(1): 116-23.
- Yu, Z., W. Zhang and B. C. Kone (2002). "Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) inhibits transcription of the inducible nitric oxide synthase gene by interacting with nuclear factor kappaB." Biochem J **367**(Pt 1): 97-105.
- Zanardi, A., G. Leo, G. Biagini and M. Zoli (2002). "Nicotine and neurodegeneration in ageing." Toxicol Lett **127**(1-3): 207-15.
- Zandi, E., D. M. Rothwarf, M. Delhase, M. Hayakawa and M. Karin (1997). "The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation." Cell **91**(2): 243-52.
- Zheng, C., Z. Ren, H. Wang, W. Zhang, D. V. Kalvakolanu, Z. Tian and W. Xiao (2009). "E2F1 Induces tumor cell survival via nuclear factor-kappaB-dependent induction of EGR1 transcription in prostate cancer cells." Cancer Res **69**(6): 2324-31.
- Zhou, H., B. M. Lapointe, S. R. Clark, L. Zbytnuik and P. Kubes (2006). "A requirement for microglial TLR4 in leukocyte recruitment into brain in response to lipopolysaccharide." J Immunol **177**(11): 8103-10.
- Zoli, M., C. Lena, M. R. Picciotto and J. P. Changeux (1998). "Identification of four classes of brain nicotinic receptors using beta2 mutant mice." J Neurosci **18**(12): 4461-72.
- Zughaier, S. M., W. M. Shafer and D. S. Stephens (2005). "Antimicrobial peptides and endotoxin inhibit cytokine and nitric oxide release but amplify respiratory burst response in human and murine macrophages." Cell Microbiol **7**(9): 1251-62.

8. Apêndice

APROVAÇÃO

RECEBIDO SPG 27/10/06
ASS: *[Assinatura]*

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 28.09.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **896/06**, intitulado: "Efeito da nicotina na ativação do fator de transcrição NF-κB no sistema nervoso central na vigência de estímulo inflamatório induzido por lipopolissacarídeos (LPS)" apresentado pela Área de FISIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador (a) Responsável: Dr.(a) **Tânia Marcourakis**

Pesquisador (a) Executante: Dr.(a) **Cecília Cerqueira Café Mendes**

Encaminhe-se à CPG-FMUSP

para as devidas providências.

S.P., 27/10/06

CAPPesq, 28 de Setembro de 2006.

[Assinatura]
Prof.ª Dra. Elia Garcia Caldini
Vice Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Fisiopatologia Experimental

[Assinatura]
PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa