

**MÁRCIA THÁIS POCHAPSKI**

**CONTROLE COLINÉRGICO SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS: INFLUÊNCIA  
NA MIGRAÇÃO CELULAR, RESPOSTA FEBRIL E LIBERAÇÃO DE TNF- $\alpha$  INDUZIDA  
POR LPS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, Curso  
de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de  
Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio

**CURITIBA  
2005**

“Só sei que nada sei”.

Sócrates

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônia e José, pelo incentivo, compreensão e apoio durante toda esta trajetória e especialmente ao meu namorado, Fábio, pelo companheirismo incondicional e por me fazer acreditar que nada é impossível.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio, pela oportunidade que me deu de trabalhar em seu laboratório e aprender com seu exemplar profissionalismo e constante busca pelo conhecimento.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza pela sua disposição em dividir seus conhecimentos e contribuir com valiosas sugestões.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Benigna Martinelli de Oliveira pela atenção e contribuição com importantes sugestões .

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Glória Emília Petto de Souza pela colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho, especialmente em relação ao estudo *in vitro*, permitindo a utilização de seu laboratório.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Cabrini pelo incentivo e contribuição durante os experimentos de cultura de células.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia pela sua contribuição na minha formação.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Lia Rieck que esteve ao meu lado em uma fase muito difícil do curso.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia, especialmente Alessandra, Cris, Nair e Lindacir, por estarem sempre dispostos a ajudar.

A Sílvia, minha “sogrinha”, por sua sempre boa vontade em contribuir com os cálculos das “terríveis” diluições e seu ombro amigo tanto nos momentos de alegria quanto de tristeza

Aos funcionários do Biotério, especialmente Candido e Luís, pela sua colaboração.

Aos animais pela sua significativa participação na realização deste trabalho.

Aos colegas do mestrado pelo companheirismo em todos os momentos.

Aos amigos do laboratório, Shirley, Renata, Daniel, Maria Fernanda e Juliana pela amizade, incentivo e principalmente pela ajuda nos momentos mais difíceis.

Ao meu “irmão” Eduardo (Du) que me estendeu sua mão em todos os momentos em que achei que não poderia levantar. Du, esta vitória é nossa

As novas amigas do laboratório Evelise, Kerly e Franciane pelo incentivo nos momentos finais.

Ao meu amigo Sílvio pelas oportunas sugestões.

Aos meus amigos Gibson e Denise que mesmo distantes sempre tiveram uma palavra de amizade para me confortar.

Ao meu irmão, Marcelo pela compreensão e apoio.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>iv</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
1.1 RESPOSTA INFLAMATÓRIA E REAÇÃO DE FASE AGUDA .....	01
1.2 MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS .....	02
1.3 RESPOSTA FEBRIL .....	09
1.4 MECANISMOS IMUNOSSENSORIAIS E NERVO VAGO .....	15
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>19</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
4.1 ANIMAIS .....	21
4.2 DROGAS, DOSES E SOLUÇÕES .....	21
4.3 ESTERILIZAÇÃO .....	22
4.4 CIRURGIA PARA IMPLANTAÇÃO DA CÂNULA INTRAPERITONEAL .....	22
4.5 AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS NA CAVIDADE PERITONEAL.....	24

4.6 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA FEBRIL .....	24
<b>5. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS .....</b>	<b>25</b>
5.1 EFEITO DE ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS RESIDENTES .....	25
5.2 EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO E SUBCRÔNICO DE ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR LPS .....	27
5.3 EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO E SUBCRÔNICO DE TUBOCURARINA SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS .....	28
5.4 EFEITO DO TRATAMENTO COM AGONISTA E ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS SOBRE A LIBERAÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS <i>IN VITRO</i> .....	28
5.5 VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DO MTT .....	29
5.6 DOSAGEM DE TNF- $\alpha$ .....	30
<b>6. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>31</b>
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
7.1 AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS RESIDENTES NA CAVIDADE PERITONEAL APÓS O IMPLANTE DA CÂNULA .....	32
7.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SUBCRÔNICA DOS ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS TUBOCURARINA E ATROPINA SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS RESIDENTES NA CAVIDADE PERITONEAL .....	34
7.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE ANTAGONISTAS	

COLINÉRGICOS TUBOCURARINA E ATROPINA SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS RESIDENTES NA CAVIDADE PERITONEAL .....	36
7.4 EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO COM ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS TUBOCURARINA, BUNGAROTOXINA E ATROPINA NA MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR LPS .....	38
7.5 EFEITO DO TRATAMENTO SUBCRÔNICO COM OS ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS TUBOCURARINA E ATROPINA SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS RESIDENTES NA CAVIDADE PERITONEAL .....	40
7.6 EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO COM O ANTAGONISTA COLINÉRGICO TUBOCURARINA NA RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS .....	42
7.7 EFEITO DO TRATAMENTO SUBCRÔNICO COM O ANTAGONISTA COLINÉRGICO TUBOCURARINA NA RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS .....	44
7.8 EFEITO DOS ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS TUBOCURARINA E ATROPINA SOBRE A LIBERAÇÃO IN VITRO DE TNF- $\alpha$ POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS .....	46
<b>8. DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>9. CONCLUSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>78</b>

## LISTA DE FIGURAS

ESQUEMA 1	INTERAÇÃO ENTRE LEUCÓCITOS E A CÉLULA ENDOTELIAL DURANTE ALTERAÇÃO VASCULAR.....	04
QUADRO 1	<b>FUNÇÃO DE ALGUMAS MOLÉCULAS DE ADESÃO.....</b>	06
PRANCHA 1	<b>PROCEDIMENTO CIRÚRGICO .....</b>	23
FIGURA 1 -	NÚMERO DE LEUCÓCITOS TOTAIS, NEUTRÓFILOS, MONONUCLEARES E EOSINÓFILOS NA CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS .....	34
FIGURA 2 -	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SUBCRÔNICA DE TUBOCURARINA E ATROPINA SOBRE O NÚMERO DE MONONUCLEARES RESIDENTES NA CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS .....	36
FIGURA 3 -	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE TUBOCURARINA E ATROPINA SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS RESIDENTES NA CAVIDADE PERITONEAL .....	38
FIGURA 4 -	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS INDUZIDA POR LPS PARA A CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS .....	40
FIGURA 5 -	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SUBCRÔNICA DE	

	ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E MONONUCLEARES INDUZIDA POR LPS PARA A CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS.....	42
FIGURA 6 -	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE TUBOCURARINA SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS.....	44
FIGURA 7 -	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SUBCRÔNICA DE TUBOCURARINA SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS .....	46
FIGURA 8 -	CURVA DOSE RESPOSTA DE LPS SOBRE A LIBERAÇÃO DE TNF- $\alpha$ POR MACRÓFAGOS .....	50
FIGURA 9 -	EFEITO DA ACETILCOLINA NA LIBERAÇÃO DE TNF- $\alpha$ INDUZIDA POR LPS EM MACRÓFAGOS .....	51
FIGURA 10 -	CURVA DOSE-RESPOSTA DE ACETILCOLINA SOBRE A LIBERAÇÃO DE TNF- $\alpha$ EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM LPS.....	52
FIGURA 11 -	EFEITO DOS ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS TUBOCURARINA E ATROPINA SOBRE A POTENCIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE TNF- $\alpha$ PROMOVIDA POR ACETILCOLINA EM MACRÓFAGOS TRATADOS COM LPS .....	53
FIGURA 12 -	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS	

PERITONEAIS .....	54
FIGURA 13 - EFEITO DO ANTAGONISTA COLINÉRGICO TUBOCURARINA SOBRE A POTENCIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE TNF- $\alpha$ PROMOVIDA POR ACETILCOLINA EM MACRÓFAGOS TRATADOS COM LPS (1 ng/mL) .....	55
FIGURA 14 - EFEITO DO ANTAGONISTA COLINÉRGICO TUBOCURARINA SOBRE A POTENCIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE TNF- $\alpha$ PROMOVIDA POR ACETILCOLINA EM MACRÓFAGOS TRATADOS COM LPS (10 $\mu$ g/mL) .....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACh – acetilcolina
- AChE - acetilcolinesterase
- ACTH – hormônio adrenocorticotrófico
- AT – atropina
- BTX – bungarotoxina
- C - controle
- cAMP – AMP cíclico
- CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
- COX – ciclooxigenase
- cPGES – prostaglandina E sintase citosólica
- CRH – hormônio liberador de corticotrofina
- CSF – fluido cérebro espinhal
- ECM – matriz extracelular
- EP<sub>3</sub> – receptor para PGE<sub>2</sub> do tipo 3
- ET-1 – endotelina-1
- ICAM-1 – molécula de aderência intercelular 1
- IFN – interferón
- IL – interleucina
- LTB<sub>4</sub> – leucotrieno B<sub>4</sub>
- LPS – lipopolissacarídeo
- M – meio de cultura

MIP – proteína inflamatória de macrófago  
MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio  
NEO – neostigmina  
NK – natural killer  
NMDA – N-metil-D-aspartato  
NO – óxido nítrico  
NPV – núcleo paraventricular  
NTS – núcleo do trato solitário  
OVLT – órgão vascular da lâmina terminal  
PAF – fator de agregação plaquetária  
PBS – salina tamponada em fosfato  
PGs – prostaglandinas  
PGE<sub>2</sub> – prostaglandina E<sub>2</sub>  
PGES – prostaglandina E sintase  
PGH<sub>2</sub> – prostaglandina H<sub>2</sub>  
PGS – prostaglandina sintase  
PMN – polimorfonuclear  
PO/HA – área pré-óptica do hipotálamo anterior  
RNA – ácido ribonucléico  
SAL – salina  
SDS – dodecil sulfato de sódio  
SDS – PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS  
SFO – órgão subfornical

SNC – sistema nervoso central

TC – tubocurarina

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral  $\alpha$

VCAM-1 – molécula de aderência às células vasculares 1

## RESUMO

A inflamação é uma resposta do organismo à lesão ou destruição de um tecido que envolve eventos celulares e vasculares. Mediadores liberados durante esta resposta atuam tanto localmente, desencadeando os sinais característicos deste processo como dor, calor, rubor e edema, quanto sistemicamente promovendo febre, aumento da produção de proteínas de fase aguda, leucocitose, ativação do sistema complemento, dentre outras. O nervo vago apresenta um papel importante na comunicação entre o sistema periférico e o sistema nervoso central. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel do controle colinérgico, utilizando os antagonistas nicotínicos tubocurarina (TC) e  $\alpha$ -bungarotoxina (BTX), e o muscarínico atropina (AT), sobre o número e a funcionalidade dos macrófagos peritoneais, avaliando a migração celular e a resposta febril, após a administração de baixas doses de LPS. Também avaliamos a participação colinérgica sobre a liberação de TNF- $\alpha$  por macrófagos estimulados com LPS *in vitro*. Para os experimentos *in vivo* foram utilizados ratos machos Wistar, pesando entre 160-240 g. Os experimentos *in vitro* foram realizados com macrófagos peritoneais de ratos, estimulados ou não previamente com tioglicolato. Os dados mostram % de redução e potenciação. Nos estudos agudos observamos que a administração de TC e AT (ambas 20 $\mu$ g/kg) não influenciaram o número de células residentes na cavidade peritoneal. Por outro lado a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por LPS (0,2 $\mu$ g/kg), foi reduzida tanto pela TC como pela BTX em 40 e 75%, respectivamente. A TC promoveu uma redução de 87% da resposta febril induzida por LPS (5 $\mu$ g/kg). Nos estudos subcrônicos observamos uma redução nas células residentes de 42 e 32%, provocada pela TC (2 e 20 $\mu$ g/kg, respectivamente), administrada durante cinco dias e de 37% nos animais tratados com a maior dose durante dez dias. A administração subcrônica de TC (2 $\mu$ g/kg) reduziu a migração de neutrófilos (59%) e mononucleares (44%) para a cavidade peritoneal. A resposta febril foi reduzida em 51% pelo tratamento com TC(2 $\mu$ g/kg, 5 dias). Quanto aos resultados *in vitro*, foi observado um aumento da liberação de TNF- $\alpha$  induzida por ACh (1, 3 e 10 nM) em macrófagos estimulados por LPS (1ng/ml). Esta resposta foi revertida pelo tratamento dos macrófagos com TC (50nM). No entanto, quando as células foram estimuladas com LPS (10 $\mu$ g/kg) a ACh reduziu 33% a liberação de TNF- $\alpha$  induzida pelo mesmo; este efeito foi revertido pela TC (500nM). O tratamento com atropina não modificou nenhuma das respostas avaliadas. Portanto, os resultados obtidos sugerem que a ACh, através de receptores nicotínicos, apresenta um papel pró-inflamatório frente a estimulação com LPS em baixas concentrações.

## ABSTRACT

Inflammation is a response of the body to injury or tissue destruction, which involves cellular and vascular events. Inflammatory mediators released during this process act both locally, initiating the characteristic signs of pain, redness and oedema, and sistemically, inducing fever, increasing the levels of acute phase proteins, leukocytosis, activation of the complement system and others. The vagus nerve has an essential role in the communication between the periphery and the central nervous system (CNS). Thus, the aim of this study was to evaluate the role of the cholinergic control employing drugs that act as antagonists at nicotinic receptors, like tubocurarine (TC),  $\alpha$ -bungarotoxin (BTX); and at muscarinic receptors, like atropine (AT), upon the number and the function of peritoneal macrophages evaluating the cell migration and fever after administration of low doses of lipopolyssacharide (LPS). It was also evaluated the cholinergic participation on the release of TNF- $\alpha$  from macrophages stimulated by LPS *in vitro*. Male Wistar rats weighing 160-240 g were used in all *in vivo* experiments. *In vitro* studies were performed with normal or thioglycollate-elicited rat peritoneal macrophages. Our data show maximum % of increase or reduction. Acute studies showed that the administration of TC or AT (20  $\mu$ g/Kg both) did not affect the number of resident cells in the peritoneal cavity. However, the neutrophil migration to the peritoneal cavity induced by LPS (0,2  $\mu$ g/Kg) was reduced by both TC and BTX (40 and 75%, respectively). TC promoted a reduction of 87% of the fever induced by LPS (5  $\mu$ g/Kg). We observed, in subchronic studies, a reduction of 42 and 32% after a 5-day period of TC administration (2 and 20  $\mu$ g/kg, respectively) on the migration of macrophages induced by PBS; and, after a 10-day period, the highest dose of TC decreased the migration 37%. TC 2  $\mu$ g/kg decreased neutrophil and macrophage migration to the peritoneal cavity 59 and 44%, respectively. Fever was reduced 51% after treatment with TC for a 5-day period. *In vitro* results showed an increase of TNF- $\alpha$  release induced by acethylcoline (ACh, 1; 3 and 10nM) in sensitized by LPS 1 (ng/mL) macrophages. This increase was reduced by TC (50 nM). However, when the cells were stimulated by LPS (10  $\mu$ g/kg), ACh decreased the TNF- $\alpha$  release induced by the former. This effect was reverted by TC 500 nM. Atropine adminisitation had no effect upon any of the evaluated responses. Thus, our results suggest that ACh, acting at nicotinic receptors, may have a pro-inflammatory role in a condition of low concentrations of the stimulus (LPS).

## 1) INTRODUÇÃO

### 1.1) A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E A REAÇÃO DE FASE AGUDA

A inflamação é uma resposta do organismo à lesão ou destruição de um tecido que envolve eventos celulares e vasculares, coordenados por múltiplos tipos de leucócitos, mediadores químicos e fatores de crescimento teciduais ou plasmáticos (WEAVER, 1995).

O processo inflamatório é iniciado e conduzido por mediadores de origem plasmática (cininas, C5a, fibrinopeptídeos e fator XII ativado) ou celular (histamina, eicosanóides, fator de agregação plaquetária (PAF), neuropeptídeos, óxido nítrico e citocinas) liberados a partir da ativação de células locais (mastócitos, células endoteliais e macrófagos) e migratórias (GALLIN et al., 1982). Os mediadores liberados atuam localmente desencadeando os sinais característicos desse processo, ou seja, dor, calor, rubor e tumor (edema), acompanhados ou não da perda de função do tecido ou órgão afetado (ROCHA e SILVA, 1978; SEDGWICK e WILLOUGHBY, 1985). Microscopicamente, esses sinais envolvem uma complexa série de eventos que incluem dilatação de arteríolas, capilares e vênulas com aumento da permeabilidade venular e fluxo sanguíneo, exsudação de fluidos e migração de leucócitos para o foco inflamatório.

Os vários mediadores inflamatórios normalmente atuam restringindo as conseqüências e a extensão do dano tecidual, induzindo somente os sinais locais. Entretanto, dependendo da persistência e/ou intensidade da lesão, alguns

mediadores podem difundir-se e mediar sinais e sintomas sistêmicos como febre, aumento da produção de proteínas de fase aguda, leucocitose, ativação do sistema complemento, aumento da produção de glicocorticóides, alterações metabólicas e das concentrações plasmáticas de metais como ferro, cobre e zinco. Esta resposta sistêmica é denominada reação de fase aguda e nessas situações pode-se observar que o sistema nervoso central e imune estão funcionalmente conectados e interagindo (STADNYK e GAULDIE, 1991).

A complexidade dessas respostas tem até hoje exigido constante investigação e nossos estudos têm procurado entender os mecanismos envolvidos na interação da resposta inflamatória e de fase aguda (WERNER et al.,2003). Em continuidade a estes estudos, este estudo terá como focos principais a migração de leucócitos, que faz parte da resposta inflamatória, e a resposta febril que faz parte da reação de fase aguda.

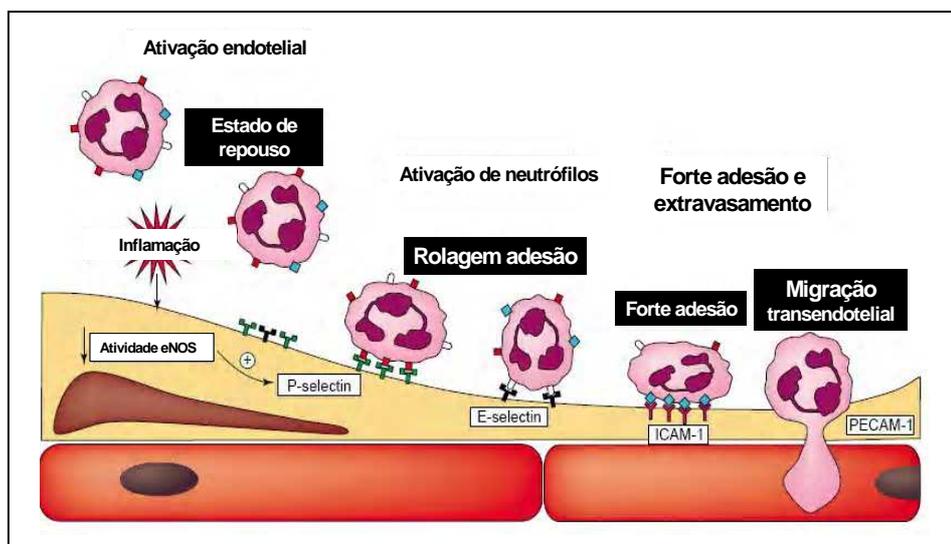
## 1.2) MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS

O sistema imune funciona como um sistema vigilante contra invasão de patógenos, toxinas, lesões ou danos ambientais que perturbam a homeostase do organismo, procurando realizar a destruição rápida e eficiente dos mesmos. As células do sistema imune são os leucócitos, células derivadas da medula óssea que incluem células mielóides (neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), monócitos, eosinófilos e basófilos) e linfócitos (células T, células B e células *natural killer* (NK) (BROWN, 1997).

Para realizar a função de defesa, as células do sistema imune devem migrar através dos tecidos. As células T, por exemplo, que circulam continuamente através dos tecidos, sangue e linfa à procura de antígenos invasores, atravessam repetidamente barreiras endoteliais e ao menos brevemente, entram em contato com matriz extracelular (ECM). Da mesma forma, os macrófagos normalmente migram através dos tecidos removendo células apoptóticas ou necróticas e proteínas desnaturadas. Todas as células do sistema imune podem migrar rapidamente junto a algum sítio inflamatório ou infeccioso. Então, uma das características principais do sistema imune é a migração de células, um processo que exige eventos de adesão transitórios, reguláveis e reversíveis (BROWN, 1997).

A seqüência de eventos que resulta na passagem dos leucócitos do vaso para os tecidos, chamado extravasamento, inclui três passos, (1) no vaso: marginação, rolagem e adesão; (2) transmigração através do endotélio (diapedese); (3) migração nos tecidos em direção a estímulos quimiotáticos. A marginação é causada por mudanças nas condições hemodinâmicas da circulação sanguínea e os leucócitos assumem uma posição periférica ao longo da superfície endotelial. Em seguida, os leucócitos aderem transitoriamente ao longo do endotélio (rolagem) e finalmente alguns pontos se aderem firmemente (adesão). Depois, os leucócitos inserem pseudópodos entre as junções das células endoteliais assumindo uma posição entre estas células e a membrana basal. Eventualmente, os leucócitos atravessam a membrana e passam para o

espaço extravascular (TRAVIS, 1993). Estes eventos estão representados no esquema 1.



Adaptado de KAKKAR, AK., LEFER, D.J. Leukocyte and endothelial adhesion molecule studies in knockout mice. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 4, p. 154-158, 2004

Esquema 1: Interação entre leucócitos e a célula endotelial durante alteração vascular. O passo inicial do recrutamento de leucócitos envolve a ativação de células endoteliais e expressão de selectina no endotélio. Os leucócitos tornam-se ativados e ocorrem o processo de rolagem via interação com P-selectina e E-selectina expressas no endotélio. Uma forte adesão dos leucócitos envolve sua interação com ICAM-1. Finalmente, a migração através do endotélio é mediada via PECAM-1.

A adesão e transmigração de leucócitos são determinadas pela ligação entre moléculas de adesão dos leucócitos e a superfície endotelial. Mediadores químicos – quimiotáticos e certas citocinas – afetam este processo modulando a expressão superficial destas moléculas de aderência (LIPOWSKY, 1996; SPRINGER, 1994). Os receptores de aderência envolvidos pertencem a quatro famílias moleculares: selectinas, imunoglobulinas, integrinas e glicoproteínas semelhantes à mucina (BRISCOE e COTRAM, 1993). As selectinas compreendem a E-selectina (CD62E, previamente conhecida como ELAM-1), que é confinada ao endotélio, a P-selectina (CD62P, previamente chamada de GMP140 ou PADGEM), presente no endotélio e plaquetas; e L-selectina (CD62L, previamente conhecida por LAM-1), presentes em muitos tipos de leucócitos. As selectinas ligam-se à oligossacarídeos que estão ligados, por sua vez, a várias glicoproteínas semelhantes à mucina (GlyCAM-1, PSGL-1, ESL-1 e CD34). As imunoglobulinas incluem duas moléculas de aderência endoteliais: molécula de aderência intercelular-1 (ICAM-1) e molécula de aderência às células vasculares 1 (VCAM-1). Ambas interagem com as integrinas encontradas nos leucócitos. As integrinas funcionam como receptores da matriz extracelular. Os principais receptores para a ICAM-1 são as  $\beta$ -integrinas LFA-1 e MAC-1, e aqueles para a VCAM-1 são as integrinas  $\alpha_4\beta_1$  (VLA-4). As diferentes famílias de moléculas de adesão bem como seus pares de interação estão representados no quadro 1.

QUADRO 1- FUNÇÃO DE ALGUMAS MOLÉCULAS DE ADESÃO			
Moléculas de Adesão	Nome	Distribuição Célula/Tecido	Ligantes
Selectina: Ligam carboidratos; Iniciam a interação Leucócito endotélio	Selectina P (PADGEN, CD62P)	Endotélio Ativado e Plaquetas	Sialil-Lewis <sup>x</sup> , PSGL-1
	Selectina E (ELAM- 1, CD62E)	Endotélio Ativado	Sialil-Lewis <sup>x</sup>
Integrinas: Ligam-se à moléculas de adesão celular e à matriz. Forte adesão	$\alpha_1:\beta_2$ (LFA-1, CD11a/CD18)	Monócitos, Linfócitos T, Macrófagos, Neutrófilos, Células Dendríticas	ICAMs
	$\alpha_M:\beta_2$ (Mac-1, CR3, CD11b/CD18)	Monócitos, Macrófagos, Neutrófilos	ICAM-1, iC3b, Fibrinogênio
	$\alpha_X:\beta_2$ (CR4, p150.95, CD11c/CD18)	Macrófagos, Neutrófilos, Células Dendríticas	IC3b
	$\alpha_1:\beta_1$ (VLA-5, CD49d/CD29)	Monócitos, Macrófagos	Fibronectina

<p>Imunoglobulinas: Vários papéis na adesão celular. Ligante para as integrinas</p>	ICAM-1 (CD54)	Endotélio ativado	LFA-1, Mac-1
	ICAM-2 (CD102)	Endotélio em repouso. Células dendríticas.	LFA-1
	VCAM-1 (106)	Endotélio ativado	VLA-4
	PECAM (CD31)	Leucócitos ativados, junção célula – célula endotelial	CD31

Adaptado- Janeway et al, 2001, Immunobiology, 5<sup>th</sup> ed.

Quando ocorre um estímulo inflamatório, os PMNs são as primeiras células que extravasam os vasos sanguíneos através da interação com a parede endotelial (PERRETTI, 1997). A migração de neutrófilos é um processo multimediado, regulado por vários mediadores liberados no foco inflamatório. Os PMNs apresentam receptores para diferentes estímulos quimiotáticos como o PAF, importante no processo de rolagem, leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) que pode influenciar na aderência à células endoteliais, proteína complemento C5a um potente agente quimiotático que, uma vez formado, pode se ligar imediatamente à PMNs circulantes além de quimiocinas como a IL-8, que funciona como um estímulo primário para migração em respostas inflamatórias observadas em humanos e coelhos (KOHL e BITTER-SUERMAN, 1993; ZIMMERMAN et al., 1996; NOHGAWA et al., 1997 e ROLLINS, 1997). Citocinas como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 (IL-1) liberadas por macrófagos/monócitos estimulados principalmente por lipopolissacarídeo (LPS) funcionam como citocinas pró-adesivas. Os PMNs respondem ao TNF- $\alpha$  e à IL-1 ativando e expressando integrinas, produzindo fator de ativação plaquetária (PAF) e outros mediadores. Já as células endoteliais respondem mobilizando selectinas, promovendo aumento de ICAM-1, além de ativar vias pró-coagulantes (TRACEY e CERAMI, 1993, TRACEY e CERAMI, 1994). Foi demonstrado que a utilização de antagonistas de receptores do TNF- $\alpha$  e IL-1, quando usados separadamente reduzem a migração de leucócitos induzida por LPS, porém uma inibição muito maior é observada quando estes antagonistas são administrados em associação (DAVENPECK et al., 1998).

Os agentes quimiotáticos podem ser produzidos por uma variedade de tipos celulares como células epiteliais e endoteliais, macrófagos, monócitos, linfócitos, plaquetas, PMNs e células parenquimais (DEMETERS et al., 1990, DEMETERS et al., 1991; HUBER et al., 1991). Porém, os macrófagos residentes são considerados células de alarme, responsáveis por iniciar a migração de neutrófilos no sítio inflamatório, uma vez que foi demonstrado que esta resposta, induzida por diversos estímulos, depende do número de macrófagos locais, pois a redução do seu número e/ou função através do uso de soro anti-macrófago provoca diminuição na migração de neutrófilos (FERREIRA, 1980; SOUZA e FERREIRA, 1985). A capacidade de macrófagos alveolares de diversas espécies, inclusive em humanos, em gerar fatores quimiotáticos para PMNs foi confirmado para uma variedade de estímulos, porém, este fato não é restrito à macrófagos alveolares, já que este evento foi observado na cavidade peritoneal em resposta ao lipopolissacarídeo (LPS) (HUNNINGHAKE et al., 1978; RUSSO, 1980).

A maioria dos macrófagos residentes derivam de monócitos circulantes, os quais são provenientes da divisão de células precursoras, os monoblastos, na medula óssea. Quando os monócitos deixam o sangue circulante e entram nos tecidos, tornam-se macrófagos. Estudos cinéticos quantitativos demonstraram que 72% dos monócitos que deixam a circulação tornam-se células de Kupffer (macrófagos localizados no fígado), 25% macrófagos do baço, 15% pulmonares e aproximadamente 7% macrófagos peritoneais (VAN FURTH, 1985). Estes macrófagos residentes demonstram modesta atividade proliferativa local,

contribuindo para manutenção das células nos tecidos em condições de equilíbrio.

### 1.3) RESPOSTA FEBRIL

A febre é um componente da reação de fase aguda que corresponde a elevação controlada da temperatura interna de um organismo para níveis acima dos normais, decorrente de uma alteração do ponto de regulação da temperatura corporal localizado na área pré-óptica no hipotálamo anterior (PO/HA) (DINARELLO et al., 1988). Nesta resposta há o envolvimento de hormônios, catecolaminas, prostaglandinas e pirógenos endógenos (KLUGER, 1991).

Mediadores liberados no sistema nervoso central e as citocinas são considerado pirógenos endógenos. As citocinas são liberadas por uma variedade de tipos celulares, como macrófagos residentes, células endoteliais e fibroblastos em resposta a pirógenos exógenos como endotoxinas bacterianas. As citocinas também são sintetizadas em diversos tipos celulares dentro do sistema nervoso central, como células gliais, neurônios (STERNBERG, 1988) e células da pituitária anterior (SPANGELO et al., 1990; KOENING et al, 1990).

Vários estudos têm demonstrado diferentes vias pelas quais citocinas liberadas periféricamente, que são grandes peptídeos hidrofílicos apresentando entre 15 a 20 kD, poderiam atravessar a barreira impermeável hematoencefálica, e exercer seus efeitos no SNC (STERNBERG, 1997; LICINIO e WONG; 1997; BLATTEIS et al., 1998; DE BOER e BREIMER, 1998). Sugere-se que esta passagem

ocorra através de: (1) transporte ativo e saturável que é específico para cada citocina (BANKS et al., 1995; BANKS e KASTIN, 1994); (2) acesso através de áreas ausentes de barreira hematoencefálica, chamadas coletivamente de órgãos circumventriculares, incluindo o órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), órgão subfornical (SFO), eminência mediana, neurohipófise, área postrema e órgão subcomissural. Provavelmente todas estas áreas permitem a entrada de sinais periféricos junto ao SNC, pois a febre induzida pela administração i.v. de LPS não é prevenida por lesões seletivas em um único órgão circumventricular (TAKAHASHI et al., 1997); (3) ligação a receptores específicos localizados em terminais de células gliais que se projetam junto ao espaço perivascular de órgãos circumventriculares ou a receptores na superfície de células endoteliais da vasculatura cerebral (MILTON, 1989); (4) através de tecidos periféricos, que são inervados pelo sistema nervoso autônomo, e enviam sinais ao SNC via nervos periféricos, especialmente o nervo vago (WATKINS et al., 1995; WERNER, et al., 2003).

Citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, proteína inflamatória de macrófago (MIP)-1 $\alpha$  e  $\beta$  e interferon  $\beta$  e  $\gamma$  (KLUGER, 1991; ZAMPRONIO et al., 1994; MIÑANO et al., 1996), atuam sobre estruturas fora ou dentro da barreira hematoencefálica iniciando a síntese e liberação de prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (MORIMOTO et al., 1987) e/ou liberação de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) do hipotálamo (ROTHWELL, et al., 1990), opióides endógenos (FAGARASAN et al., 1990; FRAGA et al, 2003) e endotelina-1 (ET-1) (NAMBI et al., 1994; FABRÍCIO et al., 1998) resultando em febre. Embora outros eicosanóides

como  $\text{PGF}_{2\alpha}$  também sejam considerados potentes indutores de febre e termogênese, a  $\text{PGE}_2$  parece ser o principal prostanóide envolvido nesta resposta (ROTHWELL, 1990).

A síntese de  $\text{PGE}_2$  é realizada em três fases enzimáticas, primeiro a fosfolipase  $A_2$  atua sobre a membrana plasmática clivando o ácido araquidônico; segundo, a enzima ciclooxigenase (COX), especialmente a sua forma induzida (COX-2) (KUJUBU et al., 1991), cataliza a reação de conversão do ácido araquidônico em  $\text{PGH}_2$ , um substrato comum para diversos tipos de PG sintase (PGS), incluindo a prostaglandina E sintase (PGES) que converte a  $\text{PGH}_2$  em  $\text{PGE}_2$  (SMITH et al., 1991). Em camundongos, a  $\text{PGE}_2$  atua em receptores do subtipo  $\text{EP}_3$  (USHIKUBI et al., 1998) presentes em neurônios sensíveis à temperatura na PO/HA (BOULANT, 1998). Esta ligação ativa uma proteína G que inibe a atividade da enzima adenilato ciclase, reduzindo os níveis de cAMP. O cAMP aumenta a sensibilidade térmica de neurônios sensíveis ao calor, portanto a sua redução pode levar ao aumento do ponto de regulação da temperatura corporal (STEINER et al., 2002).

Estudos que avaliam a atividade das PGES indicam que existem múltiplas isoformas destas enzimas, como a proteína microssomal humana (denominada mPGES) induzida na resposta inflamatória e reação de fase aguda e a PGES citosólica (cPGES) expressa constitutivamente em vários tecidos, porém ambas apresentam atividade enzimática dependente de glutatona (URADE et al., 1995; WATANABE et al., 1997; JAKOBSSON et al., 1999; TANIOKA et al., 2000; FORSBERG et al., 2000). A mPGES e a COX-2 estão juntamente co-expressas nas

células endoteliais cerebrais o que sugere que elas estão funcionalmente ligadas, sendo a maior fonte de PGE<sub>2</sub> durante a febre uma vez que a inibição da atividade da COX-2 resulta em supressão dos níveis de PGE<sub>2</sub> no fluido cérebro espinhal (CSF) (YAMAGATA et al., 2001). Recentemente foi demonstrado *in vitro* que células transfectadas com mPGES e COX-2 produzem PGE<sub>2</sub> em meio com concentrações de ácido araquidônico muito menores daquelas utilizadas nas amostras transfectadas com mPGES e COX-1 (MURAKAMI et al., 2000). No entanto, na área pré-óptica hipotalâmica, ambas isoformas de COX parecem estar envolvidas na geração e manutenção da resposta febril induzida por RANTES (regulado e ativado por células T, secretado e expresso), um pirógeno dependente de PGs que induz febre, já que este pirógeno apresenta um rápido início na resposta febril (menos que 30 minutos) e a indução de COX-2 é um processo que se inicia no mínimo 1 hora depois do estímulo (TAVARES e MIÑANO, 2002).

O hormônio liberador de corticotrofina (CRH), sintetizado nas células parvocelulares do núcleo paraventricular (NPV), é considerado o fator mais importante na liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da pituitária anterior que atua sobre a córtex adrenal para promover a liberação de glicocorticóides. O seu envolvimento na resposta febril é baseado no fato de que a administração i.c.v. deste peptídeo pode induzir termogênese em ratos (EMOTO et al., 1993), enquanto o antagonista de CRH,  $\alpha$ -helical CRH<sub>9-41</sub>, bloqueia o aumento da temperatura corpórea e consumo de oxigênio induzido por IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , mas não bloqueia a induzida por TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  ou PGE<sub>2</sub> em ratos

(ROTHWELL, 1989, ROTHWELL 1990). Sugere-se que o efeito do CRH na termogênese e temperatura corpórea está associado com a ativação do sistema nervoso simpático por meio de um efeito direto no sistema nervoso central, embora o local de ação seja desconhecido e independente da ativação do eixo pituitária-adrenal (ROTHWELL, 1990).

Alguns estudos têm demonstrado que a febre produzida pela IL-8 não é afetada pela indometacina, um antiinflamatório não esteroidal (ZAMPRONIO, et al., 1994), enquanto a dexametasona, um antiinflamatório esteroidal não modifica a febre induzida por MIP-1 $\beta$  (TAVARES e MIÑANO,1998). Estes estudos sugerem que o efeito pirogênico provocado por estas citocinas são, respectivamente, independentes da síntese de PGs e da liberação de outros mediadores, inclusive o CRH.

A possibilidade do envolvimento de opióides endógenos por meio de receptores opióides,  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$ , na regulação da temperatura tem sido investigada. Por enquanto não há evidências sobre a participação de receptores  $\delta$  nesta resposta. No entanto, a atuação de opióides endógenos através de receptores  $\mu$  na produção da febre é sugerida pelo fato de que o mRNA deste receptor têm sido observado em várias regiões cerebrais, incluindo a PO/HA (MANSOUR et al., 1995). A administração de um agonista seletivo de receptor  $\mu$ -opióide junto à PO/HA inibe a atividade de neurônios sensíveis ao calor, que regulam a perda de calor, e ativam neurônios sensíveis ao frio, que regulam o ganho de calor (resultando em elevação da temperatura corpórea) (BALDINO et al., 1980). A

naloxona, um antagonista não seletivo de receptores  $\mu$  opióide, previne o efeito pirogênico de citocinas como IL-6 e IFN- $\alpha$  sobre a atividade de neurônios termosensíveis hipotalâmicos (XIN e BLATTEIS, 1992; HORI et al., 1991). Ainda, a injeção central de CTAP, um antagonista seletivo de receptor  $\mu$  opióide previne a febre produzida pela administração central de TNF- $\alpha$  mas não modifica a febre induzida por IL-1 $\beta$ . Este mesmo antagonista bloqueia a febre induzida por MIP-1 $\beta$ , diminui a primeira fase da resposta febril induzida por CRH, porém não modifica a segunda fase da febre induzida por PGF $_{2\alpha}$  e não reverte a resposta induzida por PGE $_2$  (FRAGA, et al., 2003). Portanto, os opióides endógenos devem ser liberados após síntese/liberação de PGF e CRH, ativando receptores  $\mu$ . Por outro lado, agonistas de receptor  $\kappa$  parecem produzir somente hipotermia e o grau de seletividade ao receptor está diretamente relacionado à intensidade do efeito observado. Um agonista exógeno como U-50,488H, com grande afinidade ao receptor  $\kappa$  produz hipotermia dose-dependente assim como a dinorfina A $_{1-17}$ , o mais seletivo opióide endógeno para receptores  $\kappa$  (PILLAI e ROSS, 1986).

A elevação dos níveis de  $\beta$ -endorfina, outro opióide endógeno, no plasma, fluido cérebro espinhal e hipotálamo têm sido encontrada durante a febre produzida pelo LPS (CARR et al., 1982; MURPHY et al., 1983). A IL-1 induz a secreção de  $\beta$ -endorfina realizada por células pituitárias (FAGARASAN et al., 1990) e modula a sua ligação a receptores opióides no SNC (AHMED et al., 1985).

A participação do peptídeo endotelina (ET) na resposta febril foi demonstrada em coelhos a partir da sua administração i.v. (KOSHI et al., 1992),

sendo este efeito inibido de maneira dose dependente pelo inibidor da COX, indometacina. Um aumento nos níveis plasmáticos de ET-1 foi detectado após injeção de LPS, IL-1 ou TNF- $\alpha$  em várias espécies animais (NAMBI et al., 1994; VEMULAPALLI et al., 1994; KLEMM et al., 1995). Por outro lado, o próprio peptídeo é capaz de produzir pirógenos endógenos como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, MIP-1 em cultura de monócitos humanos (HELSET et al., 1993) e de IL-6 em células endoteliais de ratos e humanos (XIN et al., 1995; STANKOVA et al., 1996).

A ET-1 atua por meio de receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> (MASAKI et al., 1994) e pode ser considerado um importante mediador inflamatório, atuando no aumento da permeabilidade vascular (FILEP et al., 1995), ativação de leucócitos (ISHIDA et al., 1990) aumento da expressão de moléculas de adesão no endotélio (McCARRON et al., 1993), indução de degranulação de mastócitos (YAMAMURA et al., 1994) e dor (PIOVEZAM et al., 2000). Na resposta febril, somente receptores ET<sub>B</sub> parecem estar envolvidos, uma vez que o aumento de temperatura provocado pela administração i.c.v. de ET-1 é bloqueada somente pelo antagonista de receptor ET<sub>B</sub> (BQ788) e não pelo antagonista de receptor ET<sub>A</sub> (BQ123) o qual está envolvido no efeito vasoconstritor provocado pelo peptídeo. A endotelina liberada centralmente tem importante papel no desenvolvimento da febre induzida por LPS via ativação de um mecanismo independente de prostanóides, uma vez que o pré-tratamento i.p. com o inibidor da COX, indometacina, não modifica a resposta hipertérmica à ET-1 em ratos (FABRÍCIO et al., 2005).

#### 1.4) MECANISMOS IMUNOSENSORIAIS E NERVO VAGO

Os mecanismos imunossensoriais podem ser realizados basicamente através de duas vias: via de células especializadas residentes na região que representa uma barreira cerebral como endotélio cerebrovascular ou plexo coróide e órgãos circunventriculares ou via sensorial periférica associada com o nervo vago (SAPER e BREDEER, 1994). Juntos estes “mecanismos imuno-cerebrais” funcionam como um sistema quimiosensorial organizado para detectar tanto estímulos químicos gerados por células imunes como por patógenos.

Aparentemente, qualquer nervo periférico é capaz de realizar transmissão imunossensorial, já que este termo implica em resposta, por exemplo, na qual citocinas desencadeiam uma reação de fase aguda mediada pelo cérebro, como a febre. Porém, entre os nervos periféricos estudados, acredita-se que somente o nervo vago seja imunossensorial, já que a secção abdominal deste nervo bloqueia a resposta febril (WATKINS, et.al.,1995), indução central de RNAm de interleucinas (IL)-1 $\beta$  (LAYÉ, et.al.,1995), hiperalgesia e dor (WATKINS, et.al.,1995) entre outras respostas induzidas pela injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS) ou IL-1 $\beta$ .

Considerando anatômica e funcionalmente, o nervo vago está bem apropriado para desempenhar a função imunossensorial, uma vez que transporta uma variedade de sinais sensoriais, como aqueles relacionados à alimentação, além de suas fibras aferentes distribuírem-se pela maioria das estruturas viscerais, incluindo algumas que estão freqüentemente em contato com patógenos como pulmão e trato gastrointestinal.

Assim, pode-se assegurar que as fibras aferentes vagais estão posicionadas de maneira estratégica para detectar uma ativação imune em caso de infecção.

A transmissão aferente do nervo vago envolve neuropeptídeos como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e substância P (ICHIKAWA e HELKE, 1997) que estão envolvidos na modulação da atividade de macrófagos (KANG et al., 2001). A substância P pode induzir a expressão de Bcl-2 e a síntese de óxido nítrico que contribuem na prevenção dos sinais de apoptose em macrófagos (KANG, et al., 2001). Fortes evidências apontam para a participação de glutamato, por meio de receptores NMDA e não-NMDA, nas fibras aferentes vagais cardiovasculares (TALMAN et al., 1994). O sistema de vias aferentes vagais termina no complexo vagal dorsal da medula caudal. Este complexo é composto pela área postrema (um órgão circumventricular), núcleo trato solitário (NTS) e núcleo motor dorsal do vago. Juntos estes núcleos integram sinais sensoriais com uma via descendente, que controla os reflexos viscerais, e retransmitem as informações sensoriais para o núcleo associado com a rede autonômica central (SAPER, 1995).

Como se observa, as fibras aferentes do nervo vago mostram um importante papel sinalizador entre o sítio inflamatório e o cérebro, mas pouco se sabe a respeito das fibras eferentes vagais, que representam aproximadamente 25% do número total de fibras do nervo vago, na sinalização e modulação da resposta inflamatória (PRECHTL e POWLEY, 1990).

Recentemente demonstramos, que a integridade do nervo vago é importante, não somente para a febre, mas também, para o influxo de neutrófilos na cavidade peritoneal, através do controle do número e/ou atividade de células residentes nesta

cavidade (WERNER et.al., 2003). Neste estudo, dentre as hipóteses levantadas, sugerimos que a acetilcolina (ACh), principal neurotransmissor liberado pelas fibras eferentes vagais, poderia contribuir para a funcionalidade das células residentes, pois a vagotomia subdiafragmática, reduziu o número e/ou atividade dessas células. Porém, não se descarta a hipótese do envolvimento de outros neuropeptídeos como substância P e CGRP no desenvolvimento e manutenção da população de células residentes na cavidade peritoneal, já que 75% das fibras vagais subdiafragmáticas liberam essas substâncias (BERTHOUD et al., 2000).

No entanto, em outro estudo recente, observou-se que a ACh diminuiu significativamente, através da ativação de receptores nicotínicos, a liberação de citocinas *in vitro*, como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-18 em cultura de macrófagos humanos estimulados com LPS (BOROVIKOVA et. al., 2000). No mesmo estudo, os autores observaram que a síntese/liberação de TNF- $\alpha$  por hepatócitos e por células sanguíneas após a injeção de LPS em ratos, mostrava-se aumentada em animais vagotomizados. Este aumento podia ser bloqueado pela estimulação elétrica do vago. O mesmo grupo de pesquisadores confirmou, posteriormente, que o receptor nicotínico da ACh regula a síntese de citocinas. Neste segundo estudo, a estimulação elétrica do nervo vago inibiu a liberação de TNF- $\alpha$  em camundongos selvagens, porém não conseguiu inibir sua síntese em camundongos deficientes na subunidade  $\alpha 7$  do receptor nicotínico (WANG et al., 2003). Desta forma, contrapondo ao nosso estudo, a acetilcolina liberada pelo vago parece atenuar a resposta inflamatória e não contribuir para a manutenção de sua integridade.

É possível que a diferença entre estes dois estudos (WERNER et. al., 2003 e BOROVIKOVA et.al., 2000) resida na intensidade da resposta analisada. Enquanto que WERNER et.al, 2003 utilizaram doses baixas de LPS, BOROVIKOVA et.al, 2000 procuraram em seu estudo simular choque séptico, utilizando altas doses de LPS.

## **2) JUSTIFICATIVA**

Os dados apresentados acima levantam a possibilidade da existência de uma via colinérgica inflamatória contrapondo-se a uma via colinérgica anti-inflamatória já bem descrita. Para entender melhor este papel paradoxal da ACh, aventamos a hipótese de que este neurotransmissor possa atuar localmente com atividade pró-inflamatória e sistemicamente como anti-inflamatória. Portanto, nossos estudos foram desenvolvidos no intuito de avaliar esta hipótese.

### **3) OBJETIVOS**

#### **3.1) OBJETIVO GERAL**

Avaliar o papel do controle colinérgico sobre o número e funcionalidade dos macrófagos peritoneais, sobre a migração celular e resposta febril, após a administração de baixas doses de LPS em ratos.

#### **3.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Os estudos foram conduzidos no sentido de:

- a) Avaliar o efeito da administração aguda e subcrônica de antagonistas colinérgicos sobre o número de células residentes peritoneais;
- b) Avaliar o efeito da administração aguda e subcrônica de antagonistas colinérgicos sobre a migração celular induzida por LPS;
- c) Avaliar o efeito da administração aguda e subcrônica de antagonistas colinérgicos sobre a resposta febril induzida por LPS;
- d) Avaliar o efeito de agonistas e antagonistas colinérgicos sobre a liberação de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais, estimulados por LPS.

## **4) MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1) ANIMAIS**

Em todos os experimentos foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, machos, pesando entre 160-240 g, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná ou do Biotério Central da Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas, com as luzes acesas às 7:00) com livre acesso a ração e água antes dos experimentos. Os animais foram transferidos do biotério para a sala de ambientação no mínimo 2 dias antes dos experimentos e agrupados em um número máximo de 6 animais por caixa. Os experimentos foram realizados em sala silenciosa, mantendo o controle da temperatura e sempre durante o ciclo claro (09:00 às 18:00). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná.

### **4.2) DROGAS, DOSES E SOLUÇÕES**

A procedência e doses da drogas, bem como os componentes das soluções utilizadas encontram-se descritas no apêndice.

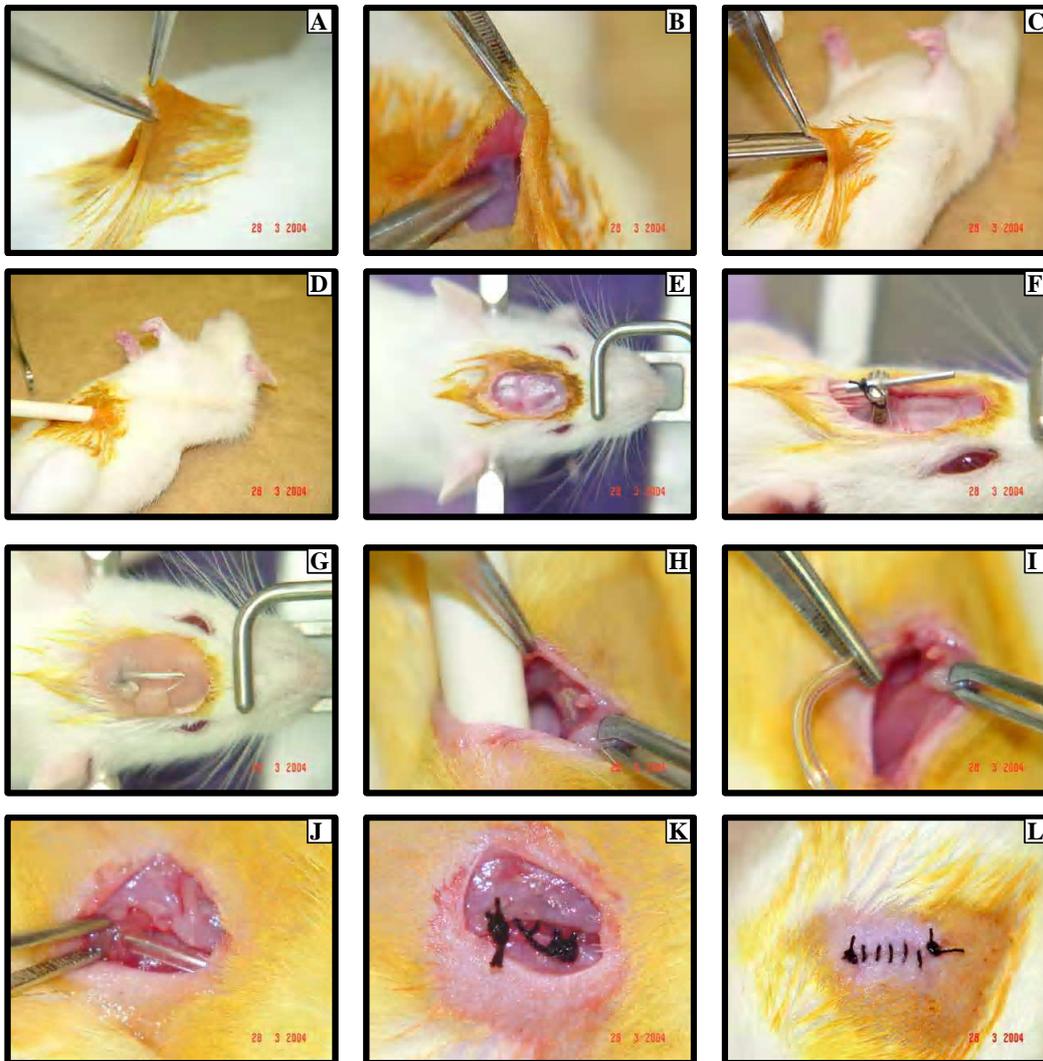
#### **4.3) ESTERILIZAÇÃO**

Os materiais foram autoclavados a 127°C por 30 minutos ou adquiridos estéreis.

#### **4.4) CIRURGIA PARA IMPLATAÇÃO DA CÂNULA INTRAPERITONEAL**

Esta cirurgia foi realizada com o objetivo de administrar os antagonistas colinérgicos de maneira subcrônica, a fim de evitar o estresse provocado nos animais pela injeção diária nesta cavidade.

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico ( $40 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p). Foi feita uma incisão superficial na pele de região abdominal inferior para introdução de um guia que conduziu tubo de polipropileno até a região da cabeça do animal, entre as orelhas. O animal foi fixado no aparelho estereotáxico e recebeu duas perfurações na calota craniana para colocação de parafusos que serviram de suporte para a resina acrílica de uso odontológico, a qual fixou o tubo na cabeça do animal. O tubo foi introduzido na cavidade abdominal através de uma incisão de aproximadamente 0,5 cm realizada nesta região. Após colocação da cânula, foram feitas as suturas internas, na cavidade abdominal, e externas na pele do animal. Ao final da cirurgia os animais foram tratados com oxitetraciclina ( $400 \text{ mg kg}^{-1}$ , s.c.) e os experimentos foram conduzidos após uma semana da realização da cirurgia (Prancha 1).



Prancha 1- Procedimento cirúrgico: A- Incisão com tesoura; B- Divulsão inicial; C- Divulsão dorsal; D- Guia para inserção da cânula até a região cervical; E- Estabilização no aparelho estereotáxico com exposição da calota craniana; F- Parafusos de fixação da cânula na calota craniana; G- Fixação da cânula com resina acrílica; H- Abertura da cavidade peritoneal; I- Inserção da cânula na cavidade peritoneal; J- Cânula inserida; K- Sutura interna com

Excluído: s

Excluído: s

#### **4.5) AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS NA CAVIDADE PERITONEAL**

Para avaliação do número de células na cavidade peritoneal, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a cavidade abdominal foi lavada com 10 ml de PBS contendo albumina 0,03% (p/v) e 5 U ml<sup>-1</sup> de heparina e o maior volume possível de fluido foi colhido. Para a contagem global de leucócitos em câmara de Neubauer, o fluido foi diluído em solução de Turk e para a contagem diferencial, o fluido foi centrifugado (1000g, 10 min, 4°C), as células ressuspendidas em solução de albumina 3% e colocadas em lâminas pré-preparadas que foram coradas com Corante Pancrômico de Rosenfeld e analisadas sob microscopia de luz.

#### **4.6) AVALIAÇÃO DA RESPOSTA FEBRIL**

A temperatura retal dos animais foi medida pela introdução de uma sonda (YSI, n° 402, USA) conectada a um teletermômetro (modelo 46 TUC, YSI, EUA) a 4,0 cm de profundidade no reto dos ratos, sem que os animais fossem retirados de suas respectivas caixas ou contidos. Os animais foram adaptados às condições experimentais por meio da realização desse procedimento duas vezes no dia anterior ao experimento, a fim de minimizar variações de temperatura induzidas por estresse decorrente do manuseio. No mínimo 72 h antes do início do experimento, os animais foram colocados em uma sala cuja temperatura ambiente foi controlada a 24±1°C e durante o experimento a temperatura ambiente foi controlada a 28±1°C. As temperaturas basais foram determinadas por 3 ou mais medidas, a intervalos de 30

min, antes de qualquer tratamento ou da administração do estímulo pirogênico. Somente os animais com temperatura estável e na faixa de 36,8 a 37,4°C foram utilizados. As medidas foram feitas a cada 30 min a durante 4h após a administração do estímulo.

## **5) PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS**

### **5.1) EFEITO DE ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS RESIDENTES**

Uma das fases dos experimentos envolveu o estabelecimento de um modelo para a administração subcrônica de antagonistas colinérgicos. Portanto, o procedimento cirúrgico proposto no item 4.4 foi testado através da contagem do número de células residentes na cavidade peritoneal, sete dias após a cirurgia conforme descrito no item 4.5.

O passo seguinte foi avaliar o efeito da administração subcrônica e aguda dos antagonistas colinérgicos nicotínico e muscarínico, tubocurarina e atropina, respectivamente. No estudo subcrônico, testamos a tubocurarina em três diferentes doses (0,2, 2 e 20µg/kg) durante cinco e dez dias. Este período de dez dias justifica-se, pois nesta fase é que a redução do número de células residentes em animais vagotomizados foi identificada (WERNER et al., 2003). A atropina foi utilizada na menor dose de tubocurarina que demonstrou ser efetiva (2µg/kg) somente no experimento de cinco dias. Estas doses de partida são menores que as doses necessárias para

bloquear as contrações da musculatura esquelética dos animais descritas por ANTONICA et al.,(1996). Em estudos preliminares esta faixa de doses mostrou-se eficiente em reduzir a migração de neutrófilos induzida por LPS sem alterar aparentemente a função motora. Foi realizada uma administração diária dos antagonistas através da cânula implantada na cavidade peritoneal, sempre pela manhã e a contagem de células residentes foi realizada 90 min após a última administração (item 4.5). Animais controle receberam PBS.

Como os melhores resultados obtidos no estudo subcrônico foram no período de cinco dias e com a dose de 2 $\mu$ g/kg, estas condições foram selecionadas para todos os próximos experimentos subcrônicos. Para os testes agudos optamos pela maior dose dos antagonistas utilizada no experimento subcrônico (20 $\mu$ g/kg).

No estudo agudo, foi realizada pela manhã, uma única administração dos antagonistas (20 $\mu$ g/kg. i.p.) ou salina (grupo controle) e a contagem de células residentes foi feita 90 min após a administração dos mesmos.

Para realização de todos os experimentos, as soluções foram preparadas previamente e congeladas à -20°C e somente minutos antes do experimento foram descongeladas.

## **5.2) EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO E SUBCRÔNICO DE ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR LPS**

Após estabelecidos, de acordo com o experimento anterior, o tempo (cinco dias) e as doses a serem utilizadas no experimento agudo (20 $\mu$ g/kg de tubocurarina ou doses equimolares no caso de outro antagonista) e subcrônico (2 $\mu$ g/kg), partimos para a avaliação do tratamento agudo dos antagonistas colinérgicos nicotínicos, tubocurarina e bungarotoxina e do antagonista muscarínico, atropina, na migração celular induzida por LPS. Neste experimento os animais receberam a injeção intraperitoneal de LPS (0,2 $\mu$ g/kg) ou salina (animais controle) 30 min após a injeção dos antagonistas. A coleta das células para avaliação da migração celular foi realizada quatro horas após o tratamento com LPS ou salina (os tempos foram estabelecidos a partir de protocolos padronizados previamente no laboratório).

Para avaliação do efeito do tratamento subcrônico dos antagonistas colinérgicos tubocurarina e atropina, os animais receberam através da cânula implantada na cavidade peritoneal uma injeção diária dos antagonistas ou PBS durante cinco dias. Apenas no sexto dia foi realizada, pela manhã, a injeção de LPS 0,2 $\mu$ g/kg ou salina através da cânula e a coleta das células para avaliação da migração celular foi feita quatro horas após a injeção do estímulo

A dose utilizada de LPS também foi obtida a partir de resultados prévios obtidos em nosso laboratório.

### **5.3) EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO E SUBCRÔNICO DE TUBOCURARINA SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS**

Para avaliação do efeito do tratamento agudo com tubocurarina na resposta febril induzida por LPS, os animais selecionados para o experimento receberam a injeção de tubocurarina (20µg/kg, i.p.) ou salina (i.p.) e após 30min foram estimulados com LPS (5µg/kg, i.p.) ou salina. As medidas da temperatura foram realizadas durante quatro horas em intervalos de 30min.

Na avaliação do tratamento subcrônico, os animais foram tratados com tubocurarina (2µg/kg) ou PBS durante cinco dias através da cânula intraperitoneal. No sexto dia os animais selecionados foram estimulados com LPS (5µg/kg) ou salina através da mesma via. Da mesma forma que no tratamento agudo, as medidas da temperatura foram realizadas durante quatro horas em intervalos de 30min.

### **5.4) EFEITO DO TRATAMENTO DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS SOBRE A LIBERAÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS *IN VITRO***

Macrófagos do exsudato peritoneal foram obtidos quatro dias após a injeção i.p. de 10 ml de tioglicolato 3% (p/v) ou sem a injeção prévia do mesmo. As células foram coletadas com 10 ml de meio de cultura RPMI 1640 contendo 5 U.I./ml de heparina, centrifugadas a 600g, 4°C por 10 min e em seguida lavadas com meio de cultura. Após

a lavagem, as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640, distribuídas em placas de cultura de 96 wells ( $8,5 \times 10^6$  células/well) e incubadas para aderência por 1 h, 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Após lavagem das células com meio de cultura, LPS foi adicionado às monocamadas nas concentrações de 1, 100 e 10000ng/ml e o sobrenadante foi coletado 4 h após a adição do LPS e armazenado a -70°C até a avaliação dos níveis de TNF- $\alpha$  por ELISA. Selecionada a dose de LPS (1 e 10000ng/ml), macrófagos aderidos (mesmas condições anteriores) foram tratados com acetilcolina (1, 3 e 10nM) 5 min antes da adição de LPS. Todos os experimentos usando acetilcolina incluíram o inibidor da acetilcolinesterase, brometo de neostigmina (1mM). Para experimentos com antagonistas colinérgicos, estes foram adicionados à monocamada 5 minutos antes da adição de acetilcolina 10nM nas concentrações de 50 nM, tanto para a tubocurarina quanto para a atropina. Controles adequados para cada um dos tratamentos separadamente foram feitos. Todos os tratamentos foram feitos pelo menos em sextuplicatas. Após a retirada das amostras foi acrescentado o MTT para avaliação da viabilidade das células conforme descrito abaixo.

### **5.5) VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DO MTT.**

Para avaliar a viabilidade celular, foi utilizado a análise colorimétrica com o corante MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Este corante na forma oxidada possui cor amarela na qual se torna reduzido e de coloração azulada em células ditas viáveis. Essa coloração é feita pelas mitocôndrias por desidrogenases mitocondriais (TADA et al., 1986). Nas placas utilizadas nos estudos *in vitro*, após o

período de quatro horas de incubação com macrófagos peritoneais (37°C, 5%CO<sub>2</sub>), tratados ou não com LPS (0,001, 0,01 e 10µg/ml), acetilcolina (1, 3 e 10µM) e tubocurarina ou atropina (50 nM), após a retirada das amostras, adicionou-se 100µl de MTT (1mg/ml) e a placa foi novamente incubada. Após vinte e quatro horas a reação foi bloqueada com solução de SDS 10% acídica. Esperou-se novamente vinte e quatro horas para a realização da medida da absorbância no comprimento de onda de 570 nm. em espectrofotômetro (Spekol 1100-Zeiss).

#### **5.6) DOSAGEM DE TNF- $\alpha$**

Os níveis de TNF- $\alpha$  foram avaliados no sobrenadante de monocamadas de macrófagos por ELISA. Para este teste utilizamos uma placa de 96 poços, a qual foi coberta com 100µL/poço com anticorpo de captura para TNF- $\alpha$  (1µg/mL, *R&D Systems*) e deixada à temperatura ambiente por 24 horas. No dia seguinte, a placa foi lavada três vezes com tampão de lavagem apropriado e então foi adicionado a cada poço 300µL/poço de tampão de bloqueio. A placa foi então incubada com este tampão por 1h à temperatura ambiente para bloqueio de sítios de ligação inespecíficos. Após este procedimento, a placa foi novamente lavada e, acrescentou-se 100 µL/poço das amostras (diluídas 1:2) e soluções padrão diluídas em 7 concentrações (2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2 pg/mL). A placa foi então incubada à temperatura ambiente por 24 h. Após este período, a placa foi lavada como descrito anteriormente e então adicionou-se 100µL/poço de anticorpo anti-TNF- $\alpha$  de detecção (biotinilado 50µg/mL,

*R&D Systems*) e a placa incubada à temperatura ambiente por mais 2 h. Em seguida a placa foi novamente lavada, acrescentou-se solução de estreptoavidina 100 $\mu$ L/poço e a placa foi então incubada por 20 min. Após nova lavagem, 100  $\mu$ l de solução para substrato da *R&D Systems* para ELISA foi adicionada. A placa foi mantida no escuro por aproximadamente 25 min para o desenvolvimento de cor e em seguida a reação colorimétrica foi parada através da adição de ácido sulfúrico (1M - 50 $\mu$ L/poço). A leitura foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450nm com filtro de correção de 540 ou 570nm.

## 6) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram avaliados por análise de variância com um critério (*ANOVA – One way*), caso encontradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), o teste de comparações múltiplas de Bonferroni foi aplicado. O nível de significância adotado foi de 5% ( $\alpha = 0,05$ ). Para comparações entre dois grupos somente foi utilizado Test T de Student para dados não pareados. Todos os cálculos foram realizados utilizando o *Software* estatístico *GraphPad Prism version 3.00 for Windows*, San Diego Califórnia, EUA.

## **7) RESULTADOS**

### **7.1) AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS RESIDENTES NA CAVIDADE PERITONEAL APÓS O IMPLANTE DA CÂNULA**

Uma vez padronizada a execução da cirurgia, partimos para a avaliação do impacto que este processo cirúrgico teria sobre a cavidade peritoneal, ou seja, avaliamos se a intervenção cirúrgica estaria provocando uma resposta inflamatória local de magnitude suficiente para influenciar outras respostas subseqüentes. A avaliação foi feita sete dias após a cirurgia, tempo adequado para a recuperação do animal. Na análise das células residentes da cavidade, não foram observadas diferenças significativas do número total de leucócitos da cavidade peritoneal entre animais operados e não operados (Fig. 1A), bem como quando se avaliou o número diferencial de leucócitos presentes no peritônio, ou seja, não houve diferenças em relação ao número de neutrófilos (Fig. 1B), mononucleares (Fig. 1C) e eosinófilos (Fig. 1D) entre os dois grupos avaliados. Portanto, mesmo com o processo cirúrgico as condições normais de todas as células residentes peritoneais são mantidas.

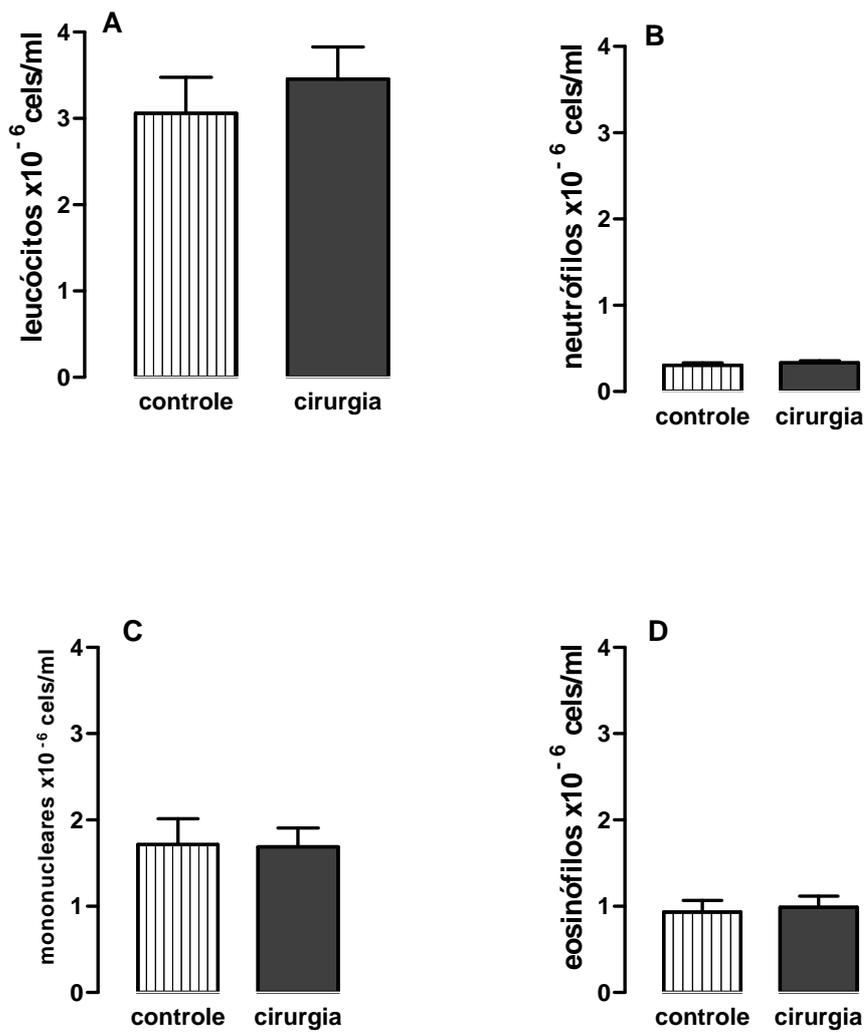


Fig 1.: Número total de leucócitos (painel A), neutrófilos (painel B), mononucleares (painel C) e eosinófilos (painel D) de ratos submetidos ou não (controle) ao procedimento de implante de cânula intraperitoneal. O número de células da cavidade peritoneal foi avaliado sete dias após a cirurgia. As barras indicam a média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.) do número de células  $\times 10^{-6}$ /ml de 6 animais.

## 7.2) EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SUBCRÔNICA DOS ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS TUBOCURARINA E ATROPINA SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS RESIDENTES DA CAVIDADE PERITONEAL

A injeção de PBS durante cinco e dez dias provocou um aumento de três e cinco vezes, respectivamente, no número de mononucleares da cavidade peritoneal quando comparados ao grupo que sofreu apenas a cirurgia para implantação da cânula intraperitoneal (Fig. 2A e 2B).

A administração de tubocurarina durante cinco dias nas doses de 2 e 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  reduziu significativamente a migração de mononucleares na cavidade peritoneal, (42 e 32%, respectivamente), enquanto que a dose de 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ , não provocou modificação nesta resposta. Por outro lado, a atropina, utilizada somente no experimento de cinco dias, não interferiu na migração de mononucleares induzida por PBS (Fig. 2A).

A administração de tubocurarina durante dez dias na dose de 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  reduziu significativamente (37%) a migração de mononucleares na cavidade peritoneal enquanto que as doses de 0,2 e 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$  não foram efetivas (Fig. 2B).

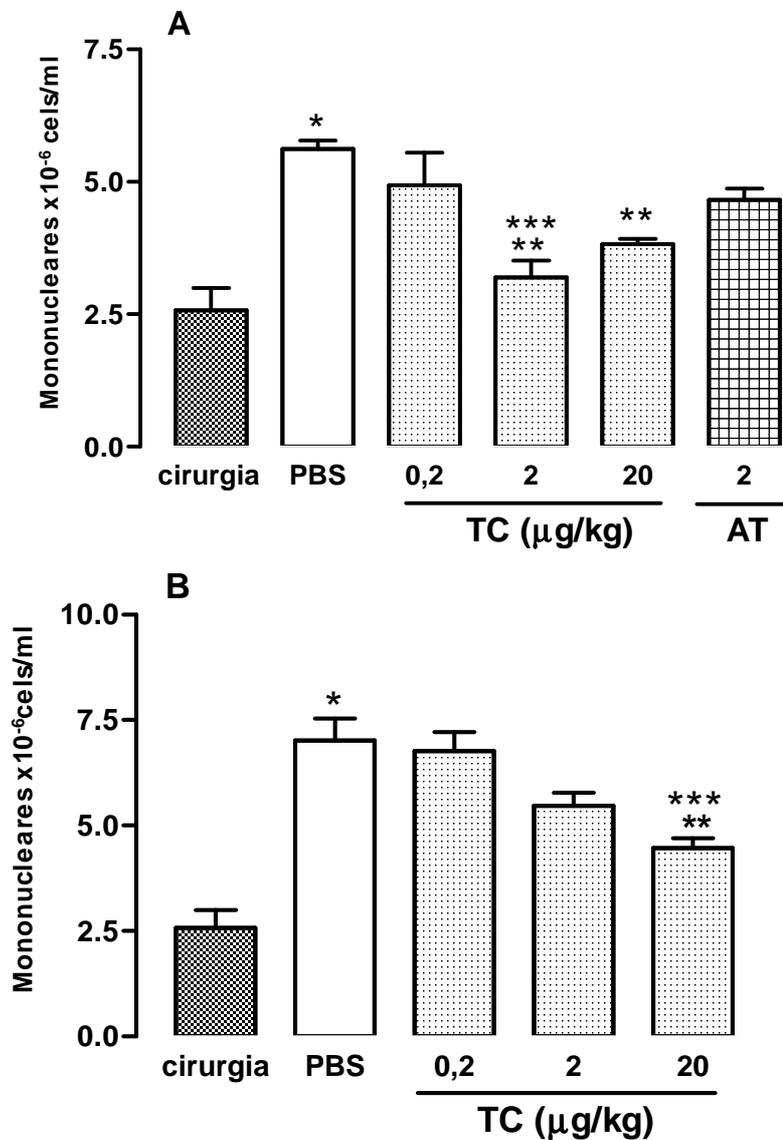


Fig. 2: Efeito da administração subcrônica de tubocurarina e atropina sobre o número de mononucleares residentes na cavidade peritoneal de ratos. Os animais receberam tubocurarina (TC 0,2, 2 e 20µg/kg) e atropina (AT 2µg/kg) durante cinco (painel A) ou dez (painel B) dias através da cânula intraperitoneal. Grupos de animais controle compreenderam animais submetidos unicamente à cirurgia, sem injeção diária de PBS (CIRURGIA) e após a injeção diária de PBS por cinco dias (PBS). As barras indicam a média ± erro padrão da média (e.p.m.) do número total de mononucleares x10<sup>-6</sup>/ml de 6 animais. \* p<0,05 em relação ao grupo cirurgia; \*\* p<0,05 em relação ao grupo que recebeu PBS e \*\*\*p<0,05 em relação ao grupo que recebeu TC 0,2µg/kg.

### 7.3) EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS TUBOCURARINA E ATROPINA SOBRE NÚMERO DE CÉLULAS RESIDENTES DA CAVIDADE PERITONEAL

Os animais que receberam a injeção aguda de salina apresentaram uma média do número total de leucócitos em torno de  $3,8 \pm 0,55 \times 10^6$  cels/ml e aproximadamente  $2,5 \pm 0,35 \times 10^6$  cels/ml de mononucleares. A administração aguda de tubocurarina e atropina, ambas na dose de 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  não modificou o número de leucócitos totais ( $5,1 \pm 1,01$  para tubocurarina e  $4,03 \pm 0,54 \times 10^6$  cels/ml para atropina, Fig. 3A) e nem de mononucleares residentes da cavidade peritoneal ( $3,15 \pm 0,76$  e  $2,66 \pm 0,47 \times 10^6$  cels/ml, Fig. 3B), para tubocurarina e atropina, respectivamente.

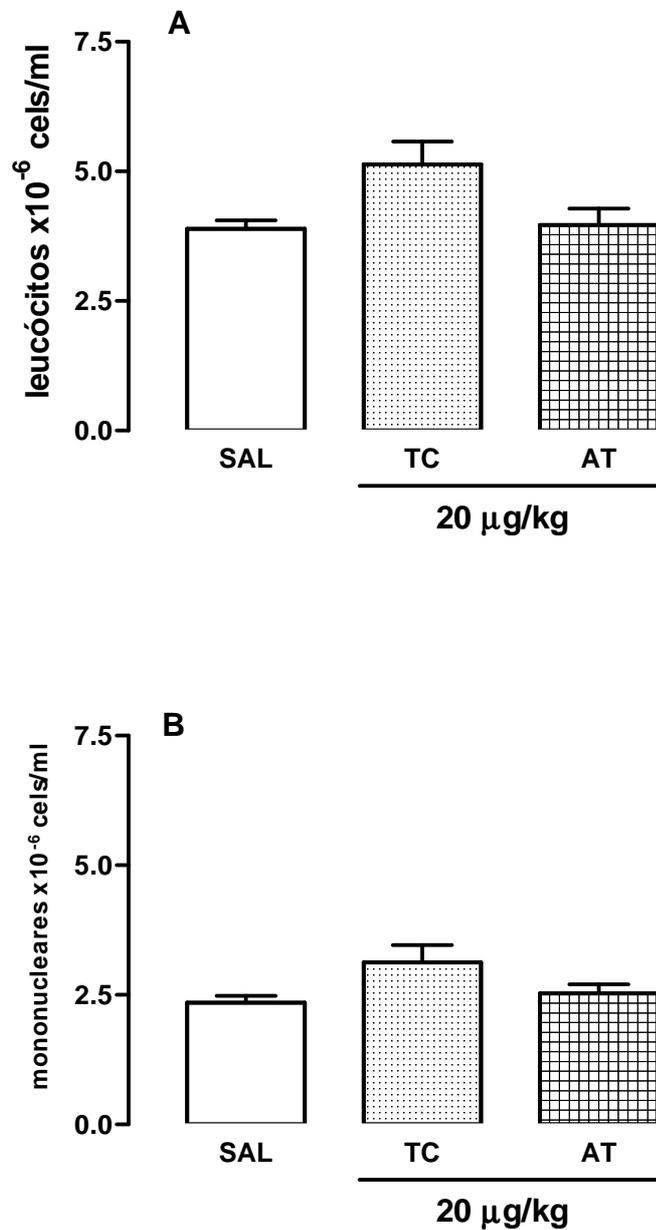


Fig. 3: Efeito da administração aguda de tubocurarina e atropina sobre o número de células residentes na cavidade peritoneal de ratos. Os animais receberam tubocurarina (TC) e atropina (AT) na dose de  $20\mu\text{g/kg}$  (i.p.) e o número de leucócitos (painel A) e mononucleares (painel B) da cavidade peritoneal foi avaliado após 2h. Animais controle receberam salina (SAL). As barras indicam a média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.) do número total de células  $\times 10^{-6}/\text{ml}$  de 6 animais.

#### **7.4) EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO COM ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS TUBOCURARINA, BUNGAROTOXINA E ATROPINA NA MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR LPS**

Neste experimento procedemos à avaliação do efeito da administração aguda dos antagonistas colinérgicos nicotínicos tubocurarina e bungarotoxina e muscarínico, atropina, sobre a migração de neutrófilos induzida por LPS.

A administração de LPS aumentou em cinco vezes o número de neutrófilos da cavidade peritoneal dos animais quando comparado ao grupo controle (salina+salina) (Fig. 4).

A prévia administração de tubocurarina e bungarotoxina reduziu a migração de neutrófilos para da cavidade peritoneal em 40 e 75%, respectivamente. Já o antagonista muscarínico, atropina, não influenciou no aumento do número de neutrófilos na cavidade peritoneal promovida por LPS.

Não houve variações significativas no número de outras células encontradas na cavidade peritoneal.

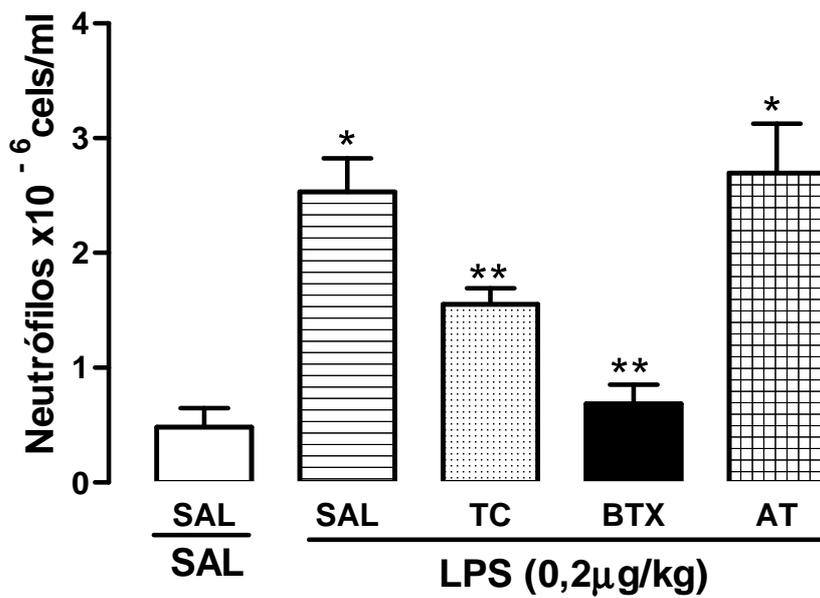


Fig. 4: Efeito da administração aguda de antagonistas colinérgicos sobre a migração de neutrófilos induzida por LPS para a cavidade peritoneal de ratos. Os animais receberam tubocurarina (TC, 20 $\mu$ g/kg), bungarotoxina (BTX, 20 $\mu$ g/kg), atropina (AT, 20 $\mu$ g/kg) ou salina (sal) por via i.p 30 min antes da administração de LPS (0,2 $\mu$ g/kg,i.p.) ou SAL (1ml/kg, i.p.). As barras indicam a média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.) do número total de neutrófilos  $\times 10^{-6}$ /ml de 6 animais. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo sal+sal; \*\* $p < 0,05$  em relação ao grupo sal+LPS

### **7.5) EFEITO DO TRATAMENTO SUBCRÔNICO COM ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS TUBOCURARINA E ATROPINA NA MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR LPS**

O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito da administração subcrônica do antagonista colinérgico nicotínico (tubocurarina) e muscarínico (atropina), sobre a migração de neutrófilos e mononucleares induzida por LPS (0,2µg/kg). Para isso os animais receberam os antagonistas através da cânula intraperitoneal durante cinco dias e somente no sexto dia receberam LPS para avaliação da migração celular.

A administração de LPS aumentou oito vezes o número de neutrófilos da cavidade peritoneal dos animais. Por outro lado, a administração de tubocurarina reduziu a migração de neutrófilos para da cavidade peritoneal em 59%. Já o antagonista muscarínico, atropina, não influenciou no aumento do número de neutrófilos na cavidade peritoneal promovida por LPS (Fig. 5A).

Com relação ao número de mononucleares da cavidade peritoneal, o LPS aumentou três vezes o número destas células. A administração de tubocurarina provocou uma redução de 44% da migração de mononucleares induzida pelo LPS. Da mesma maneira que no número de neutrófilos, a atropina não interferiu na migração de mononucleares induzida por LPS (Fig. 5B).

Não foram observadas variações nos números de outras células na cavidade peritoneal.

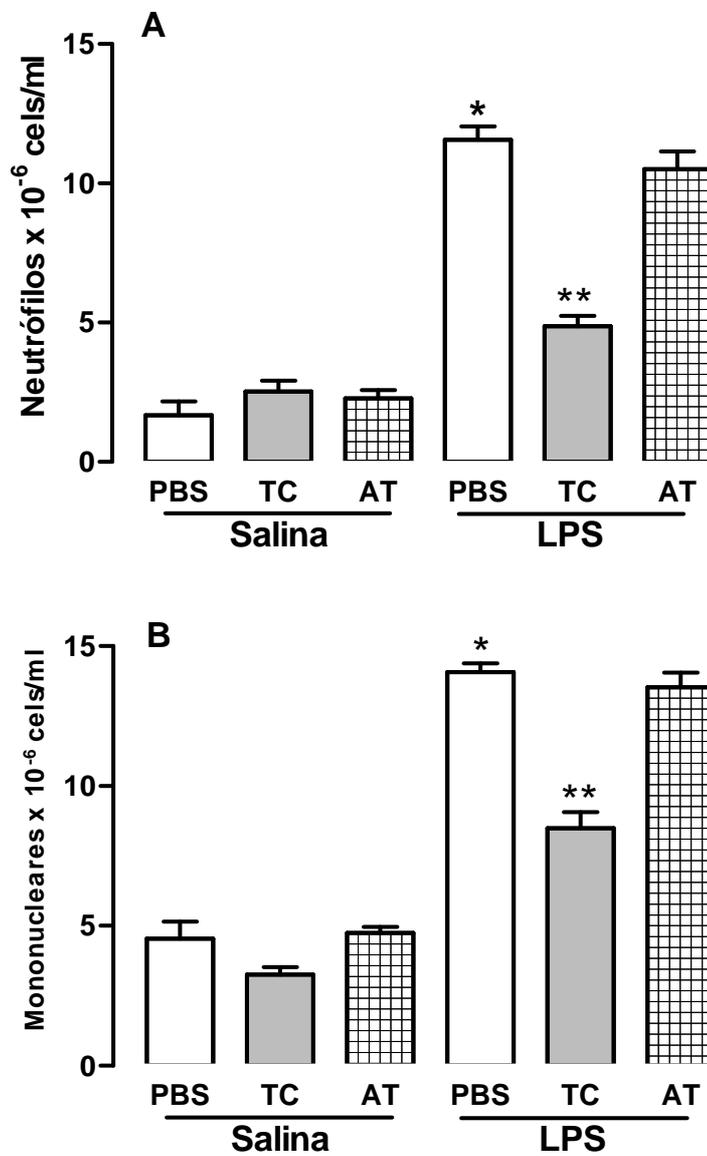


Fig. 5: Efeito da administração subcrônica de antagonistas colinérgicos sobre a migração de neutrófilos (painel A) e mononucleares (painel B) induzida por LPS para a cavidade peritoneal de ratos. Os animais receberam tubocurarina (TC, 2 $\mu$ g/kg) e atropina (AT, 2 $\mu$ g/kg) ou salina (sal) através da cânula i.p durante cinco dias e no sexto dia, LPS (0,2 $\mu$ g/kg,i.p.) ou SAL através da mesma via. As barras indicam a média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.) do número total de células x10<sup>-6</sup>/ml de 6 animais. \* p<0,05 em relação ao grupo PBS+salina; \*\*p<0,05 em relação a PBS+LPS 0,2 $\mu$ g/kg.

#### **7.6) EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO COM O ANTAGONISTA COLINÉRGICO TUBOCURARINA NA ESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS**

A administração de salina ou TC (20 $\mu$ g/kg) não provocou modificação significativa na temperatura basal dos animais. Entretanto, a administração de LPS (5 $\mu$ g/kg i.p.) promoveu um aumento significativo da temperatura (0,7 $^{\circ}$ C) a partir de uma hora e meia até a 3,5h após a injeção do mesmo. A administração de TC 20 $\mu$ g/kg reduziu a resposta febril induzida por LPS em 87% (Fig. 6).

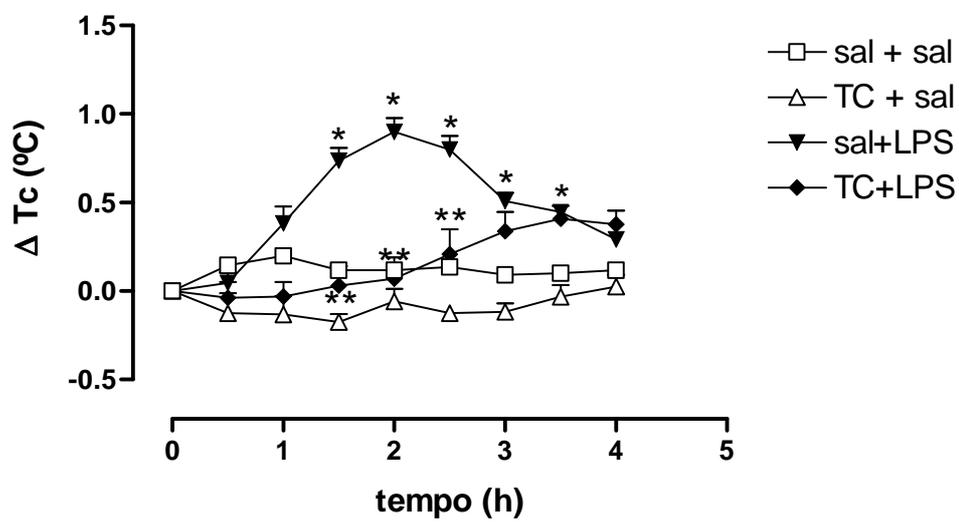


Fig. 6: Efeito da administração aguda de tubocurarina sobre a resposta febril induzida por LPS. Os animais receberam tubocurarina (TC 20 $\mu$ g/kg) ou o mesmo volume de salina i.p. 30 min antes da administração de LPS (5 $\mu$ g/kg) ou salina i.p. Os pontos representam a média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.) da variação da temperatura corporal ( $^{\circ}$ C) dos animais (n=6). \* p<0,05 em relação ao grupo sal+sal, \*\*p<0,05 em relação ao grupo sal+LPS.

### **7.7) EFEITO DO TRATAMENTO SUBCRÔNICO COM ANTAGONISTA COLINÉRGICO TUBOCURARINA NA ESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS**

Os animais foram tratados durante cinco dias com a tubocurarina e somente no sexto dia foi avaliada a resposta febril. A administração de salina não provocou modificação significativa na temperatura basal dos animais. Entretanto, a administração de LPS (5µg/kg i.p.) promoveu um aumento significativo da temperatura (0,9°C) a partir de uma hora e meia até a quarta hora após a injeção do mesmo. (Fig. 7).

A injeção de tubocurarina (2µg/kg) durante 5 dias reduziu a resposta febril induzida por LPS em 51%.

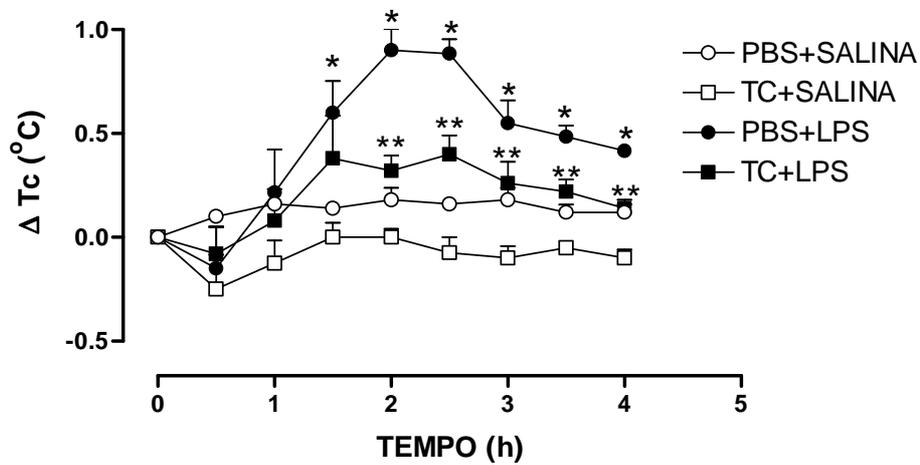


Fig. 7: Efeito da administração subcrônica de tubocurarina sobre a resposta febril induzida por LPS. Os animais receberam tubocurarina ( $2\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ou PBS durante cinco dias através da cânula intraperitoneal. No sexto dia, receberam LPS ( $5\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ou salina através da mesma via. As barras indicam a média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.) da variação da temperatura corporal ( $^{\circ}\text{C}$ ) dos animais ( $n=6$ ). \*  $p<0,05$  em relação ao grupo PBS+salina, \*\*  $p<0,05$  em relação ao grupo PBS+LPS.

### **7.8) EFEITO DE ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS TUBOCURARINA E ATROPINA SOBRE A LIBERAÇÃO IN VITRO DE TNF- $\alpha$ POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS**

Nesta série de experimentos, o primeiro passo foi determinar uma dose submáxima de LPS para ser utilizada nos demais experimentos. Para isso adicionamos LPS em diferentes concentrações (1, 100 e 10000 ng/ml), durante um período de quatro horas, aos macrófagos colhidos da cavidade peritoneal de ratos tratados previamente com tioglicolato.

Macrófagos tratados apenas com meio de cultura apresentaram uma pequena liberação basal de TNF- $\alpha$ . A estimulação dos macrófagos com LPS 1, 100 e 10000 ng/ml induziu uma liberação de TNF- $\alpha$  de aproximadamente 270, 750 e 600 pg/ml, respectivamente (Fig.8).

O próximo passo foi avaliar o efeito da ACh sobre a liberação de TNF- $\alpha$  induzida por LPS (1 e 100 ng/ml). Para isso adicionamos ACh na concentração teste de 10nM, durante um período de quatro horas, ao sobrenadante de macrófagos colhidos da cavidade peritoneal de ratos tratados com tioglicolato.

O grupo controle apresentou uma liberação quase nula de citocina enquanto que a ACh aumentou em 230% a liberação de TNF- $\alpha$  produzida pelo LPS 1, ou 100 ng/ml (Fig. 9).

Após selecionarmos uma dose mais adequada de LPS (1ng/ml), optamos por fazer uma curva dose resposta de ACh a partir da dose teste

utilizada no experimento anterior. Neste caso utilizamos a ACh nas seguintes concentrações: 1, 3 e 10 nM.

A estimulação dos macrófagos promoveu liberação de TNF- $\alpha$  de aproximadamente 250 pg/ml. Enquanto a ACh 1 e 3nM aumentaram a liberação de citocina em 130%, a ACh 10nM provocou um aumento de 400% na liberação da mesma (Fig. 10).

Como a ACh aumentou a liberação de citocina provocada por LPS, finalmente avaliamos o efeito dos antagonistas colinérgicos tubocurarina (TC) e atropina (AT) na potenciação desta resposta causada pela ACh.

A TC reduziu em 60% o aumento da liberação de TNF- $\alpha$  provocada por ACh nos grupos tratados com LPS enquanto que a atropina não modificou esta resposta (Fig.11).

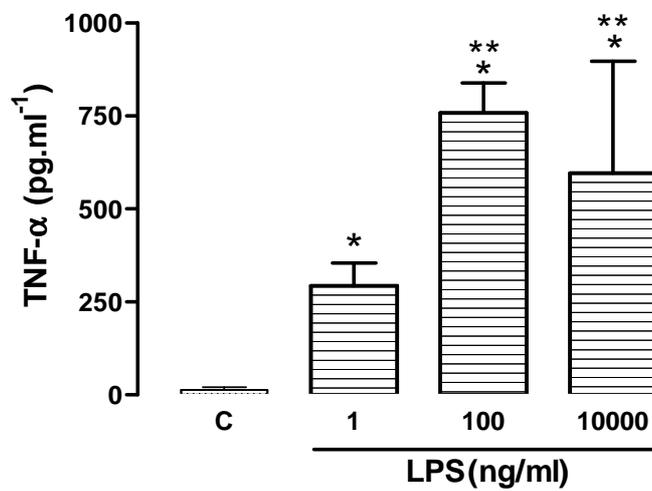
A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT, descrita anteriormente. Este teste foi realizado com o objetivo de eliminar a possibilidade de que as alterações ocorridas na liberação de citocina tenham ocorrido em função de morte celular. Todas as células tratadas com LPS (1ng/ml ou 10 $\mu$ g/ml) apresentaram uma redução significativa de aproximadamente 10% na viabilidade celular quando comparada ao grupo controle. Outros tratamentos como ACh, TC, AT e neostigmina (NEO) não promoveram alteração na viabilidade celular (Fig.12). Resultados similares de viabilidade foram obtidos em todos os outros experimentos.

A fim de descartar a possibilidade de que este efeito da ACh ocorreria somente em macrófagos provenientes de uma pré-estimulação com tioglicolato,

avaliamos a influência da TC (50nM) sobre o aumento da liberação de TNF- $\alpha$  provocada pela Ach (10nM) nos macrófagos provenientes de cavidades normais e estimulados com LPS (1ng/ml).

A estimulação com LPS promoveu a liberação de aproximadamente 250pg/ml de TNF- $\alpha$ . De maneira similar ao observado anteriormente, a ACh aumentou em dez vezes esta resposta enquanto que a tubocurarina reverteu o aumento provocado pela acetilcolina a valores próximos do LPS (300pg/ml) (Fig. 13).

Em uma outra série de experimentos utilizamos doses 10000 vezes maiores de LPS. Macrófagos do grupo controle praticamente não liberaram TNF. As células tratadas com LPS 10 $\mu$ g/ml liberaram em torno de 750pg/ml. Diferentemente das outras situações, a acetilcolina 100nM não aumentou a liberação de TNF e sim reduziu a mesma em 33% quando comparada às células tratadas com LPS. Finalmente, o grupo tratado com TC reverteu a resposta provocada pela ACh a valores similares à do LPS (Fig.14).



**Fig 8: Curva dose resposta de LPS sobre a liberação de TNF- $\alpha$  por macrófagos.** Macrófagos da cavidade peritoneal de animais tratados com tioglicolato foram incubados ou não com LPS em diferentes concentrações durante quatro horas. Monocamadas controle (C) receberam somente meio de cultura. O sobrenadante foi recolhido após 4h e os níveis de TNF- $\alpha$  avaliados por ELISA. As barras indicam a média  $\pm$  e.p.m. da concentração de TNF- $\alpha$  em pg/ml para valores em quadruplicata. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo (C) e \*\* $p < 0,05$  em relação ao grupo LPS 1 ng/ml.

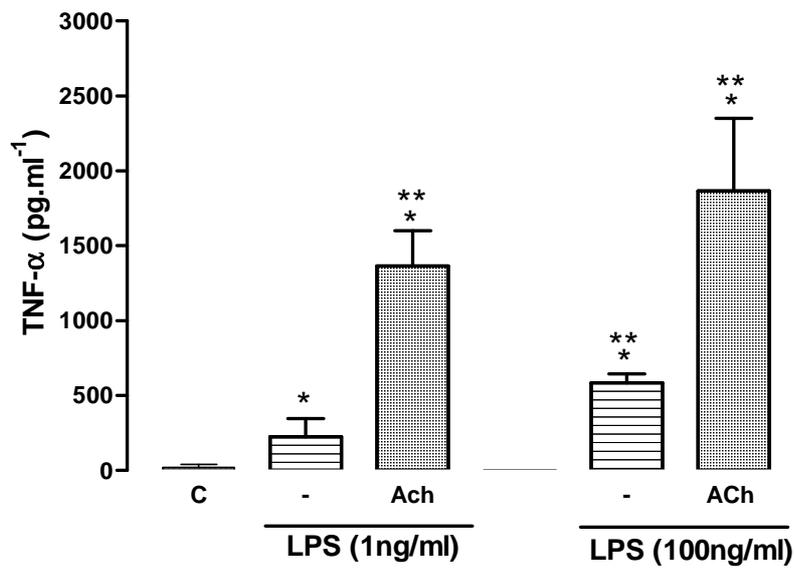


Fig 9: Efeito da acetilcolina (ACh) na liberação de TNF- $\alpha$  induzida por LPS em macrófagos. Macrófagos da cavidade peritoneal de animais tratados com tioglicolato foram incubados ou não com ACh na concentração de 10nM durante quatro horas e estimulados com diferentes concentrações de LPS (1 e 100 ng/ml). Monocamadas controle receberam somente meio de cultura (C). O sobrenadante foi recolhido e os níveis de TNF- $\alpha$  avaliados por ELISA. As barras indicam a média  $\pm$  e.p.m. da concentração de TNF- $\alpha$  em pg/ml para valores em quadruplicata. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo controle (C), \*\* $p < 0.05$  em relação ao grupo tratado com LPS.

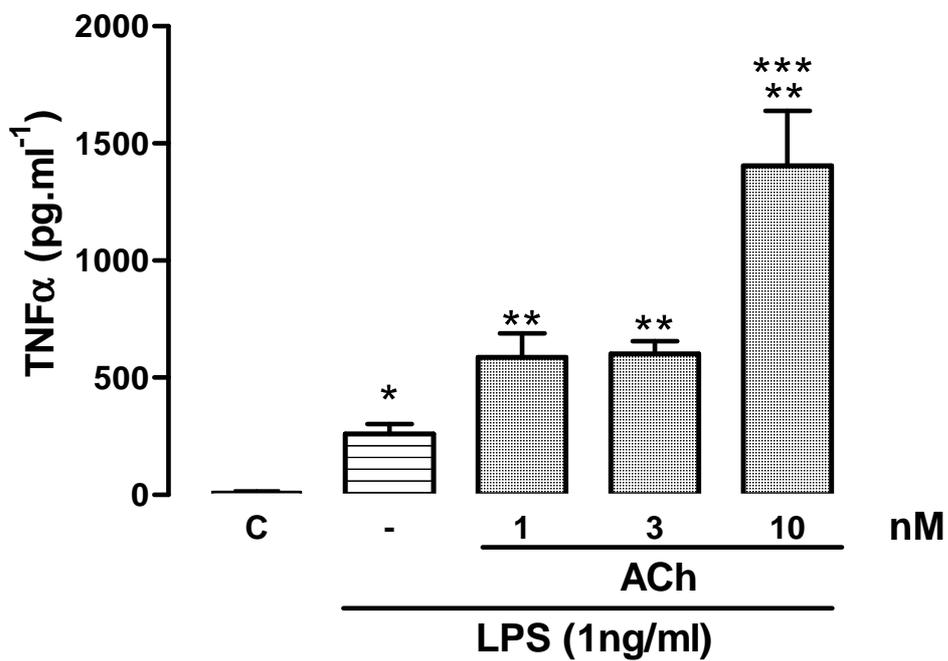


Fig 10: Curva dose resposta de acetilcolina (ACh) sobre a liberação de TNF- $\alpha$  em macrófagos estimulados com LPS. Macrófagos foram estimulados com LPS (1ng/ml) na ausência de ACh ou tratados com ACh (1, 3 e 10nM), durante quatro horas. Monocamadas controle receberam somente meio de cultura (C). O sobrenadante foi recolhido e os níveis de TNF- $\alpha$  avaliados por ELISA. As barras representam a média  $\pm$  e.p.m. da concentração em pg/ml para valores em quadruplicata. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (C), \*\* $p < 0,05$  em relação ao grupo estimulado com LPS (-), \*\*\* $p < 0,05$  em relação ao grupo estimulado com LPS e tratado com ACh 3nM.

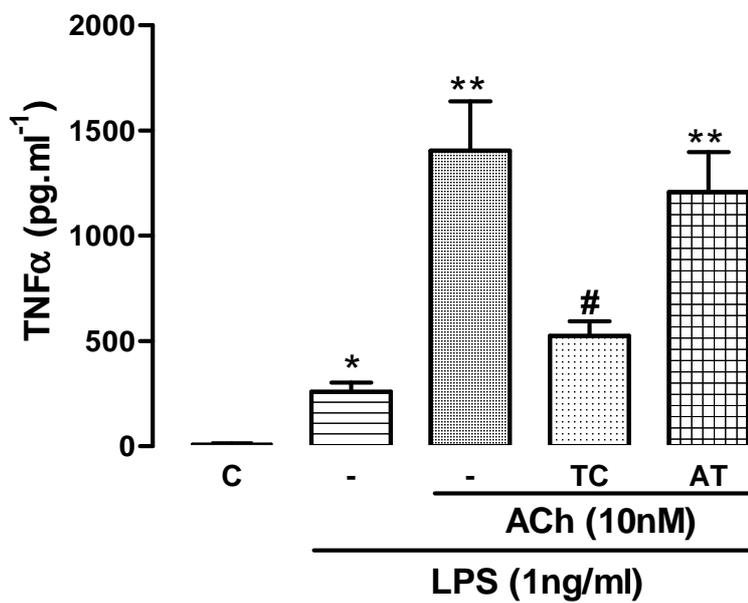


Fig 11: Efeito dos antagonistas colinérgicos tubocurarina e atropina sobre a potenciação da liberação de TNF- $\alpha$  promovida por acetilcolina (ACh) em macrófagos tratados com LPS. Macrófagos da cavidade peritoneal de animais tratados com tioglicolato foram estimulados com LPS (1ng/ml) na presença ou ausência de ACh (10nM) e incubados com tubocurarina (TC) ou atropina (AT) na concentração de 50nM durante quatro horas. Monocamadas controle receberam somente meio de cultura (C).O sobrenadante foi recolhido e os níveis de TNF- $\alpha$  avaliados por ELISA. As barras representam a média  $\pm$  e.p.m. da concentração em pg/ml para valores em sextuplicata. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (C), \*\* $p < 0,05$  em relação ao grupo estimulado com LPS (-), # $p < 0,05$  em relação ao grupo estimulado com LPS e tratado com ACh 10nM.

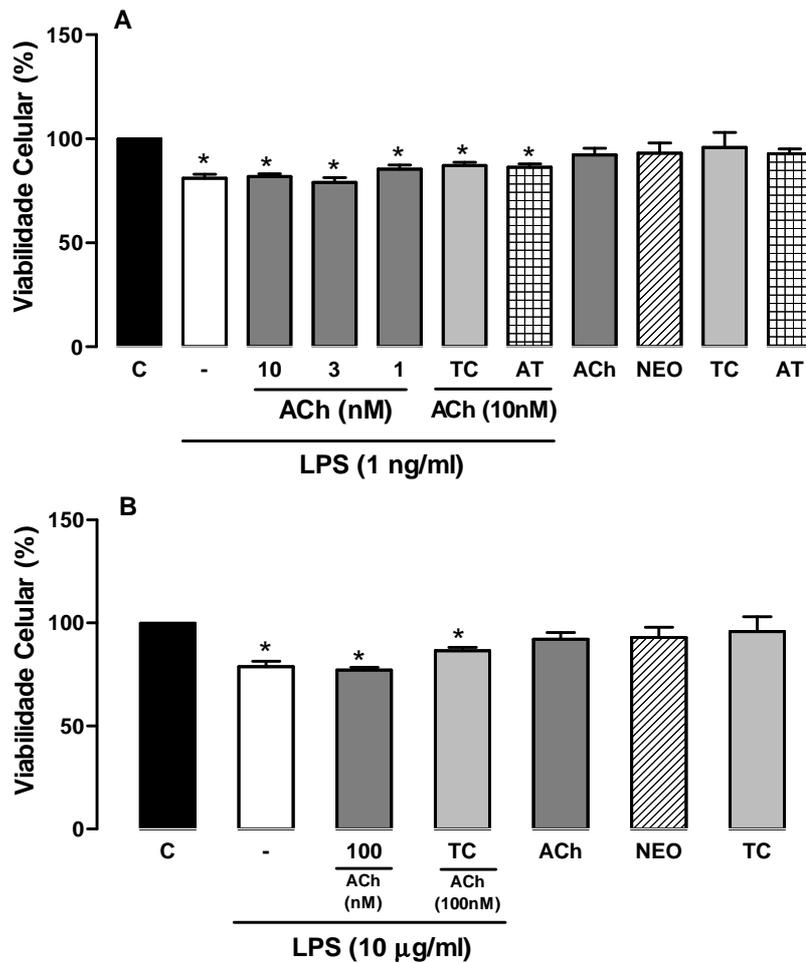


Fig 12: Avaliação da viabilidade celular de macrófagos peritoneais. Macrófagos aderentes foram tratados com as diferentes soluções indicadas (ACh 10, 3 e 1nM; TC e AT 50nM; neostigmina -NEO - 1µM e LPS 1 ng/ml - painel A ou ACh 100 nM; TC 500nM; NEO - 10 µM e LPS 10 µg/ml - painel B) durante quatro horas. Monocamadas controle receberam somente meio de cultura (C). A viabilidade celular foi avaliada por MTT. As barras representam a média  $\pm$  e.p.m. de sextuplicatas. 100% de viabilidade corresponde à viabilidade celular determinada para as células cultivadas apenas em meio de cultura.\* $p < 0,05$  em relação grupo controle (C).

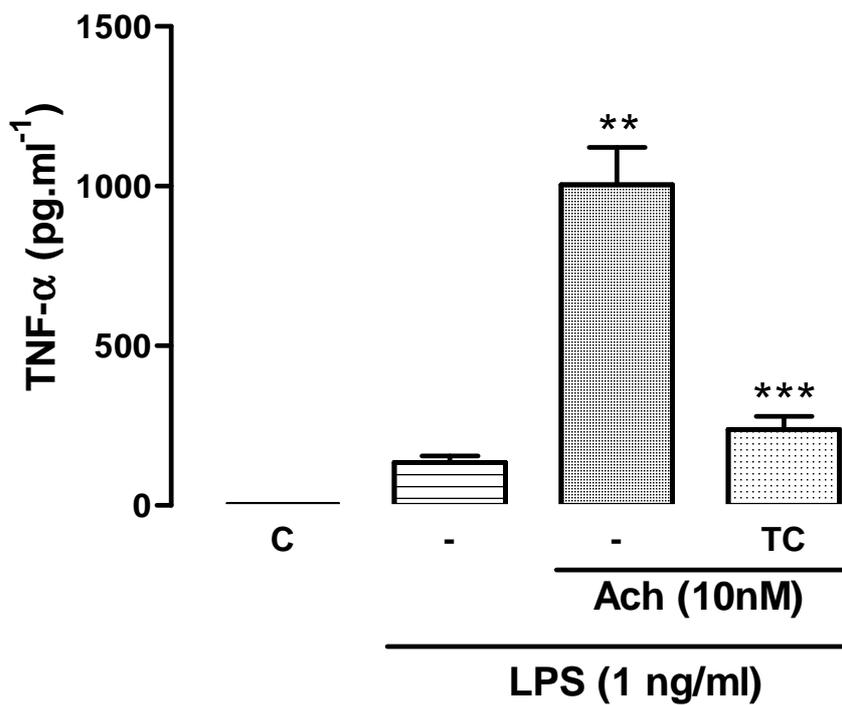


Fig 13: Efeito do antagonista colinérgico tubocurarina (TC) sobre a potenciação da liberação de TNF- $\alpha$  promovida por acetilcolina (ACh) em macrófagos tratados com LPS. Macrófagos da cavidade peritoneal não estimulados com tioglicolato foram estimulados com LPS (1ng/ml) (-) na presença ou ausência de ACh na concentração de 10nM e incubados ou não com (TC) na concentração de 50nM durante quatro horas. Monocamadas controle receberam somente meio de cultura (C). O sobrenadante foi recolhido e os níveis de TNF- $\alpha$  avaliados por ELISA. As barras representam a média  $\pm$  e.p.m. da concentração em pg/ml para valores em sextuplicata. \*\*p<0,05 em relação ao grupo estimulado com LPS (-), \*\*\*p<0,05 em relação ao grupo estimulado com LPS e tratado com ACh 10nM.

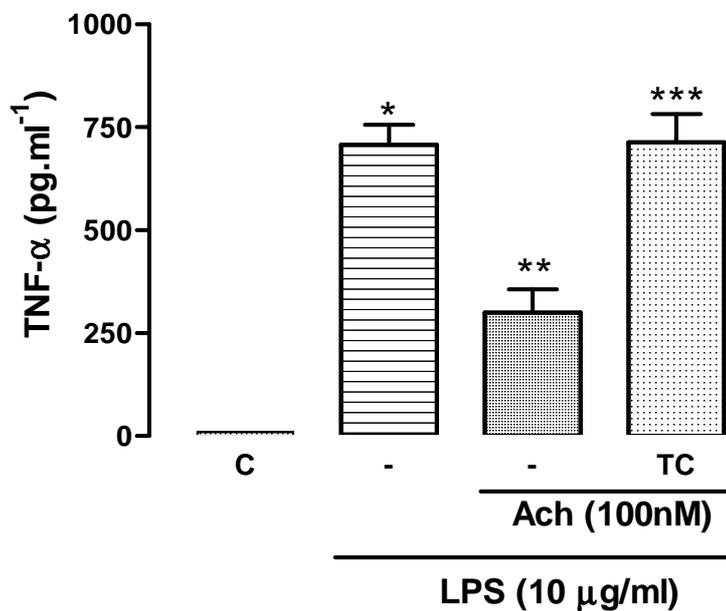


Fig 14: Efeito do antagonista colinérgico tubocurarina (TC) sobre a redução da liberação de TNF- $\alpha$  promovida por acetilcolina (ACh) em macrófagos tratados com LPS. Macrófagos da cavidade peritoneal tratados com tioglicolato foram estimulados com LPS (10 $\mu$ g/ml) (-) na presença ou ausência de (ACh) na concentração de 100nM e incubados ou não com (TC) na concentração de 500nM durante quatro horas. Monocamadas controle receberam somente meio de cultura (C). O sobrenadante foi recolhido e os níveis de TNF- $\alpha$  avaliados por ELISA. As barras representam a média  $\pm$  e.p.m. da concentração em pg/ml para valores em sextuplicata. \* $p < 0,05$  em relação grupo controle (C), \*\* $p < 0,05$  em relação ao grupo estimulado com LPS (-), \*\*\* $p < 0,05$  em relação ao grupo estimulado com LPS e tratado com ACh 100nM.

## 8) DISCUSSÃO

O sistema imune funciona como um sistema vigilante contra invasão de patógenos, toxinas, lesões ou danos ambientais que perturbam a homeostase do organismo, procurando realizar a destruição rápida e eficiente dos mesmos. Este sistema é dependente da liberação de mediadores como fator de agregação plaquetária (PAF), leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>); proteína complemento C5a, citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1, além de quimiocinas como a IL-8, (ZIMMERMAN et al., 1996; NOHGAWA et al., 1997; KOHL e BITTER-SUERMAN, 1993; ROLLINS, 1997). Estes mediadores em geral atuam localmente. Entretanto, dependendo da persistência ou intensidade do estímulo, eles alcançam a corrente sanguínea e desencadeiam manifestações sistêmicas como a febre e neutrofilia. Os macrófagos residentes são considerados células de alarme, responsáveis por iniciar a liberação de parte dos mediadores envolvidos nesta resposta (SOUZA e FERREIRA, 1985). A maioria destes macrófagos residentes derivam de monócitos circulantes, os quais são provenientes da divisão de células precursoras, os monoblastos, na medula óssea. Quando os monócitos deixam o sangue circulante e entram nos tecidos, tornam-se macrófagos. Estudos cinéticos quantitativos demonstraram que 72% dos monócitos que deixam a circulação tornam-se células de Kupffer, 25% macrófagos do baço, 15% pulmonares e aproximadamente 7% macrófagos peritoneais (VAN FURTH, 1985). Estes macrófagos residentes demonstram modesta atividade proliferativa local, contribuindo para manutenção das células nos tecidos em condições de equilíbrio.

Em 2003, WERNER e cols. demonstraram que quando os animais eram submetidos a vagotomia subdiafragmática, o número destes macrófagos residentes se mostrava diminuído na cavidade peritoneal. Este resultado levou-nos a acreditar que o nervo vago poderia liberar fatores importantes para a manutenção do número e/ou da funcionalidade das células residentes no peritônio. O nervo vago é constituído de fibras eferentes e aferentes sendo o principal neurotransmissor liberado pelas fibras eferentes a ACh enquanto que as fibras aferentes são neurônios bipolares, com o corpo celular localizado no gânglio da raiz dorsal e que liberam diversos neurotransmissores como Substância P e CGRP (ZHUO et al., 1997; ICHIKAWA e HELKE, 1997).

Neste estudo, decidimos avaliar a participação colinérgica neste processo de manutenção do número e da funcionalidade dos macrófagos peritoneais residentes.

Portanto, o primeiro passo foi verificar se a administração de antagonistas colinérgicos poderia alterar o número de células residentes. Como o efeito observado por WERNER e cols (2003) apareceu alguns dias após a vagotomia decidimos administrar os antagonistas por um período superior a uma única administração. Neste sentido foi necessário padronizar um modelo de cânula intraperitoneal para evitar o traumatismo diário provocado na cavidade em função da injeção diária dos antagonistas.

Dados da literatura demonstram que a injeção i.p. de tioglicolato causa um aumento significativo no número de macrófagos peritoneais, quatro dias após a administração do mesmo (RIBEIRO, et al., 2000; FERNANDEZ et al., 1999). Em adição,

OTTO & AGILIRE (1998) observaram que 14 dias após a colocação de diferentes tipos de partículas cerâmicas na cavidade peritoneal, somente a do tipo fosfato de cálcio aumentou o número de macrófagos nesta cavidade. Estes dados sugerem que a estimulação crônica ou subcrônica na cavidade peritoneal, quando provoca uma resposta inflamatória, esta pode ser identificada com um aumento no número de macrófagos presentes na cavidade. Portanto, se o implante da cânula intraperitoneal estivesse causando uma resposta inflamatória depois de sete dias, observaríamos um aumento do número de macrófagos na cavidade. No entanto, sete dias após o implante da cânula, não observamos diferenças nas contagens diferenciais de células leucocitárias, inclusive mononucleares, quando comparamos animais operados e não operados antes da injeção de qualquer substância. Assim, podemos sugerir que o processo cirúrgico, por si só, não causou uma resposta inflamatória crônica na cavidade peritoneal, o que nos permitiu dar seqüência em nossos estudos, utilizando esta cânula para administrações consecutivas nesta cavidade.

Como os estudos in vivo de BOROVIKOVA et.al., (2000) sugeriam a presença de receptores nicotínicos em macrófagos, selecionamos inicialmente a tubocurarina, um antagonista destes receptores, para iniciarmos o estudo de administração subcrônica utilizando a cânula intraperitoneal. Como doses de partida selecionamos doses de tubocurarina 1000 a 10 vezes menores do que as doses necessárias para bloquear completamente as contrações na musculatura esquelética (ANTONICA et al., 1996). A administração subcrônica de tubocurarina nas três doses testadas (0,2, 2 e 20 µg/kg) não promoveu nenhum déficit motor aparente nos animais. Por outro lado, a administração diária de PBS, seja por cinco ou dez dias promoveu um aumento

significativo do número de mononucleares na cavidade peritoneal sem alterar o número de eosinófilos, neutrófilos e basófilos.

Como discutido anteriormente, a migração de macrófagos para os tecidos é favorecida e está diretamente relacionada à liberação de substâncias quimiotáticas produzidas durante a resposta inflamatória subcrônica ou crônica. Não encontramos dados na literatura que justifiquem a migração de mononucleares para a cavidade peritoneal em função da injeção de PBS. No entanto, é possível que a estimulação física do volume de PBS injetado ou a alta concentração de sais diariamente na cavidade peritoneal represente um estímulo inflamatório suficiente para causar migração celular. É improvável que o aumento do número de mononucleares na cavidade se deva à contaminação presente no PBS, uma vez que estes experimentos foram repetidos em diferentes ocasiões, cuidados extremos com a preparação do tampão foram tomados e, em experimentos agudos este tampão não foi capaz de promover migração de neutrófilos.

No entanto, mesmo nestas condições experimentais, a administração subcrônica de tubocurarina nas concentrações de 2 e 20 $\mu$ g/kg durante cinco dias reduziu o número de mononucleares que migraram para cavidade peritoneal. Resposta similar foi obtida somente com a maior dose de tubocurarina no grupo que recebeu a droga durante dez dias.

Embora não tenhamos conseguido avaliar, com o implante da cânula, o efeito da tubocurarina sobre as células residentes (uma vez que houve migração celular induzida pela administração diária de PBS), nossos resultados sugerem que a acetilcolina, através de receptores nicotínicos pode ser importante para a migração

celular. Pelo menos em parte, estes dados estão de acordo com a literatura, uma vez que WERNER et al. (2003), demonstraram que a vagotomia subdiafragmática reduz também a migração de neutrófilos, sugerindo que tal fato tenha sido influenciado pela ausência das fibras aferente e eferentes vagais. Em primeiro lugar é preciso considerar que embora WERNER et al. (2003) tenham observado uma diminuição no número de macrófagos residentes, os autores não atribuem a redução da migração de neutrófilos somente a este fato, ou seja, poderia estar ocorrendo também uma alteração na atividade destas células. Em segundo lugar, os autores sugerem que esta redução da migração de neutrófilos, seja por redução do número de macrófagos residentes, seja por alteração de sua atividade frente a um estímulo, poderia se dar pela ausência das fibras eferentes do vago, que liberam ACh ou pela ausência de outros neurotransmissores liberados pelas fibras aferentes vagais como a substância P e CGRP. Ainda, os autores ressaltam que a substância P e o CGRP estão envolvidos na modulação da atividade de macrófagos, modulando a síntese de citocinas (ICHIKAWA e HELKE, 1997). Além disso, existem evidências que mostram que a substância P pode induzir a expressão de Bcl-2 e óxido nítrico que contribuem na prevenção dos sinais de apoptose em macrófagos (BERTHOUD e NEUHUBER, 2000).

Deste modo nossos resultados acrescentam dados adicionais ao estudo de WERNER et al. (2003). Embora os resultados obtidos não nos permitam avaliar se a ACh contribua para a diminuição do número de células (uma vez que a administração de PBS induziu migração celular), eles sugerem uma redução na sua atividade/funcionalidade. A participação de receptores muscarínicos neste processo é improvável, uma vez que os nossos resultados mostram que a atropina não se mostrou

efetiva na dose utilizada. Podemos ainda sugerir que esta redução não se trata de um efeito citotóxico da tubocurarina sobre os macrófagos uma vez que, uma única administração dos antagonistas, nas maiores doses testadas não promoveu alterações no número de células residentes.

Em função da diminuição do número de mononucleares não ser maior durante o período mais prolongado de administração, optamos pelo período de cinco dias para realizar os próximos experimentos. Com relação à dose, selecionamos a de 2µg/kg, uma vez que a de 20µg/kg não mostrou uma redução maior no número de mononucleares da cavidade peritoneal para os estudos subcrônicos, e a maior dose 20µg/kg, para os estudos agudos.

Direcionamos, portanto, nossos estudos no sentido de investigar o papel da ACh em resposta a doses baixas de LPS, situações em que podemos observar migração de leucócitos e resposta febril, respostas na maioria das vezes ausentes em presença de altas doses de LPS, como as utilizadas por BOROVIKOVA et al. (2000).

RUSSO, em 1980 demonstrou o envolvimento de macrófagos na migração de neutrófilos junto à cavidade peritoneal em resposta ao LPS. Posteriormente, SOUZA e FERREIRA (1985) demonstraram que a migração de polimorfonucleares neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos pode ser bloqueada pelo tratamento dos animais com soro antimacrófagos. O LPS é um dos mais potentes indutores da liberação de citocinas como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (TRACEY e CERAMI, 1993,1994; BEMELMANS et al., 1996) e estas citocinas atuam promovendo a expressão de moléculas importantes na adesão de neutrófilos às células endoteliais, processo inicial da migração celular. No entanto, ROCHA e FERREIRA (1986) também demonstraram que altas doses de LPS

inibem a migração celular. É possível que esta diminuição do número de neutrófilos no fluido peritoneal ocorra pelo fato de que altas doses de LPS induzem macrófagos a liberarem mediadores na circulação que inibem a migração de leucócitos para o foco inflamatório (SOUZA et al., 1988).

Diversos estudos sugerem que o LPS e alguns destes mediadores pro-inflamatórios como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  ativam uma via neural aferente vagal que estimula a liberação de corticotrofina (ACTH), indução de IL-1 $\beta$  em diferentes regiões do SNC e febre (LAYÉ et al., 1995; WERNER et al., 2003). Em adição a esta função sensorial do nervo vago, existem diversos estudos que descrevem um mecanismo neuronal, neste caso eferente ou motor, pelo qual a ACh, o principal neurotransmissor do nervo vago, inibe a síntese de citocinas de macrófagos residentes teciduais, denominada via colinérgica anti-inflamatória (BOROVIKOVA et al., 2000; BERNIK et al., 2002). Nos diversos estudos onde os autores demonstraram a existência de desta via anti-inflamatória, a estimulação deu-se através de estímulos elétricos no nervo ou através de estimulação farmacológica (BOROVIKOVA et al., 2000; BERNIK et al., 2002, WANG et al., 2003). Portanto, os mecanismos fisiopatológicos pelos quais a ativação desta via, com conseqüente liberação de ACh, ocorre não são completamente conhecidos.

Demonstramos que a administração aguda de tubocurarina 20 $\mu$ g/kg reduziu de maneira significativa a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por LPS. A bungarotoxina, um outro antagonista de receptores nicotínicos, também reduziu significativamente a migração de neutrófilos induzida por LPS, e de maneira muito mais pronunciada que a tubocurarina, possivelmente por se ligar mais fortemente ao receptor nicotínico (CHANG, 1999). O mesmo não aconteceu com a atropina, um antagonista

colinérgico muscarínico. Estes dados sugerem que a administração de LPS promoveu a liberação de ACh que por sua vez contribuiu para o processo de migração através de receptores nicotínicos. Assim, o bloqueio da ação da ACh por tubocurarina e  $\alpha$ -bungarotoxina, foram capazes de reduzir a migração celular. Não está claro para nós, como esta ACh é liberada, nem mesmo se a sua origem é vagal como no caso dos estudos de BOROVIKOVA et al. (2000), BERNIK et al. (2002) WANG et al. (2003), uma vez que, como dito anteriormente, neste estudos a ACh tem um papel anti-inflamatório enquanto que nossos resultados apontam para um efeito pro-inflamatório deste neurotransmissor.

Existem diversas possibilidades pelas quais a ACh poderia facilitar o processo de migração celular. A primeira a se considerar seria a atuação da ACh sobre o endotélio vacular. As células endoteliais possuem, reconhecidamente, receptores muscarínicos (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980) e existem evidências da expressão de receptores nicotínicos colinérgicos em células endoteliais (MOCCIA, et al., 2004). A vasodilatação promovida pela ativação de receptores muscarínicos por ACh poderia contribuir para a migração celular, mas este efeito não seria bloqueado por tubocurarina. Deste modo podemos afastar a possibilidade da ativação de receptores muscarínicos na célula endotelial, com conseqüente vasodilatação, como uma possível hipótese para explicar nossos resultados. Com relação aos receptores nicotínicos, presentes nessas células, pouco se conhece. MOCCIA et al. (2004) sugerem que estes canais podem contribuir para as mudanças na permeabilidade vascular induzidas por nicotina, embora tal papel não esteja muito claro.

Uma outra possibilidade seria que a ACh contribuísse para o aumento da expressão de moléculas de adesão. No entanto, SAEED et al. (2005) demonstraram que a administração de um agonista de receptores nicotínicos, a nicotina, *in vivo*, reduziu a expressão do RNAm de VCAM-1 e E-selectina, expressas durante a ativação endotelial e importantes no processo de migração celular. Portanto, estes dados não explicam nossos resultados uma vez que, o bloqueio dos receptores nicotínicos por tubocurarina, tenderia a evitar esta redução favorecendo a migração de neutrófilos, o que não ocorreu.

Um terceiro ponto a ser considerado é o efeito da ACh na síntese/liberação de citocinas, como TNF- $\alpha$  IL-1 $\beta$ , que exercem um papel importante no processo de migração celular. A utilização de antagonistas dos receptores destes mediadores inibem parcialmente a rolagem de leucócitos na parede endotelial (WESSLER et al., 2003; DAVENPECK, et al., 1998). No entanto, grande parte das evidências também sugerem que a ACh através de receptores nicotínicos, sensíveis a  $\alpha$ -bungarotoxina, presentes em macrófagos promovem a redução da síntese de citocinas, especialmente do TNF- $\alpha$  (BOROVIKOVA et al., 2000; BERNIK et al., 2002; WANG et al., 2003; WANG et al., 2004; VAN WESTERLOO, 2005).

Ao contrário das evidências acima, nossos resultados apontam para um papel pro-inflamatório da ACh, e não anti-inflamatório. Nossos dados apontam ainda para o fato de que poderia estar ocorrendo uma mudança nos macrófagos provocada pela ausência diária de ACh. A ACh seria importante no que chamamos de funcionalidade da célula mais do que na atividade. Funcionalidade descreveria o aspecto desta célula manter sua função de proteger o tecido, enquanto que o termo atividade estaria mais

relacionado ao momento em que a célula é estimulada e começa a produzir citocinas. Para melhor explicar esta hipótese, devemos considerar que a tubocurarina possui uma meia-vida bastante curta de aproximadamente 2,2 h (FISHER et al., 1982). Observamos que a administração de tubocurarina durante cinco dias e avaliação da migração celular induzida por LPS no sexto dia, portanto na ausência de tubocurarina, também houve uma reversão da migração de neutrófilos e mononucleares. Assim, a ausência de ACh por um período de tempo modifica o processo de migração, provavelmente por modificar a funcionalidade das células e não só a atividade das mesmas.

**O LPS, além da migração celular, também é amplamente usado em modelos experimentais de resposta febril sendo este efeito dependente da dose e via de administração (BLATTEIS e LI, 2000). Entretanto, pirógenos exógenos, como o LPS, não causam febre diretamente e sim induzem a produção e liberação de mediadores endógenos, especialmente TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 através de um sistema fagocítico mononuclear (revisado por KLUGER, et al., 1998). Portanto, a resposta febril ocorre em função da ação destas citocinas pro-inflamatórias liberadas periféricamente, as quais chegam ao SNC através de um transporte ativo, específico para cada citocina ou através de áreas ausentes de barreira hematoencefálica (órgãos circunventriculares) ou através da ligação a receptores específicos localizados na superfície de células endoteliais ou em terminais de células gliais que projetam-se junto ao espaço perivascular de órgãos circunventriculares (BANKS et al., 1995; BANKS e KASTIN, 1994; PLOTKIN et al., 1996). Ainda, estas citocinas podem ativar nervos periféricos, especialmente o nervo vago (WATKINS, et al., 1995). Os neurônios sensoriais vagais expressam**

receptores para mediadores derivados do sistema imune como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (ELMQUIST et al., 1996). A ativação desses receptores induzem a expressão de Fos, um produto protéico do gene c-fos e indicador de atividade neuronal, em neurônios sensoriais do gânglio inferior vagal e núcleo trato solitário (principal centro de entrada de informações víscero-sensoriais provenientes do nervo vago) (ELMQUIST et al., 1996). Em adição, a participação do nervo vago como um veículo de transferência dos sinais imunes periféricos ao SNC derivam do fato de que a vagotomia subdiafragmática atenua a resposta febril provocada pela injeção intraperitoneal ou intravenosa de doses moderadas de LPS ou citocinas pro-inflamatórias (BLUTHE, et al., 1996, WERNER et al., 2003). Portanto, assim como a migração celular, a resposta febril depende da integridade vagal.

Em nossos resultados, a administração aguda (20  $\mu$ g/kg) ou subcrônica (2 $\mu$ g/kg/dia durante cinco dias e avaliação da resposta febril no sexto dia) de TC apontou uma redução significativa da resposta febril. Assim, de maneira similar ao observado para a migração celular, estes dados sugerem que a administração de LPS promove a liberação de ACh e que esta é importante para a resposta febril. Ainda, da mesma forma que na migração celular, este efeito da ACh se daria através de receptores nicotínicos. Com relação à resposta febril, pontos adicionais aos considerados para a migração celular devem ser levantados. O primeiro deles é a participação da ACh na regulação da temperatura corporal. A estimulação colinérgica por organofosforados determina uma diminuição do ponto de regulação da temperatura corporal em ratos (MEETER, 1971; GORDON, 1994). Deste modo, a administração de tubocurarina poderia não alterar ou

provocar um aumento do ponto de regulação da temperatura. Nossos dados sugerem que a tubocurarina, nas doses utilizadas neste estudo, não modifica o controle da temperatura corporal uma vez que não houveram variações significativas na temperatura corporal de animais que receberam somente tubocurarina em relação ao grupo que recebeu somente o veículo, seja esta tubocurarina administrada de maneira aguda ou crônica. Com relação a participação da Ch no desenvolvimento da resposta febril não encontramos dados na literatura que possam explicar o efeito da TC observado.

Assim, tanto os resultados obtidos com a migração celular como com a febre sugerem que o LPS estimula a liberação de ACh que contribuiria para estes processos uma vez que estas respostas são reduzidas por antagonistas nicotínicos. Por outro lado, existem evidências de que a ACh, em algumas situações, poderia estar atuando como anti-inflamatória, principalmente reduzindo a liberação de TNF- $\alpha$  por macrófagos, também através da ativação de receptores nicotínicos (BOROVIKOVA et al., 2000; BERNIK et al., 2002; WANG et al., 2003). A grande diferença entre nosso estudo e estes últimos estudos citados se deve ao fato de que estes estudos sugerirem sempre que esta via anti-inflamatória seria ativada em situações de sepse, condição diferente daquela em questão neste estudo, uma vez que utilizamos baixas doses de LPS. Deste modo, resolvemos avaliar como a ACh poderia modificar diferentemente a liberação de citocinas em baixas doses de LPS.

Como o TNF- $\alpha$  é uma citocina pro-inflamatória importante na expressão de moléculas de adesão que participam da migração celular e na resposta febril,

dependendo da dose e via de administração de LPS, é a primeira citocina que aparece na corrente sanguínea, decidimos avaliar a relação entre a ativação de receptores colinérgicos nicotínicos presentes em macrófagos e liberação de TNF- $\alpha$  *in vitro*.

O TNF- $\alpha$  foi descoberto em 1975 por CARSWELL e colaboradores no soro de camundongos infectados com o *Bacillus Calmette-Guérin*. Atualmente sabe-se que o TNF- $\alpha$  é produzido primariamente por macrófagos (MANNEL et al., 1980), porém outros tipos celulares, como linfócitos e células natural killer, têm sido identificados como capazes de produzir esta citocina (SOUBA, 1994). O TNF desenvolve suas ações através da ligação a receptores específicos e dois receptores têm sido descritos, o tipo 1 (TNF-R1) e o tipo 2 (TNF-R2), sendo que ambos estão presentes na maioria dos tipos de células e tecidos (BROCKHAUS et al., 1990). Quando o TNF- $\alpha$  se liga ao TNF-R1 ocorre a indução à toxicidade, à atividade antiviral, à proliferação de fibroblastos e indução do NF- $\kappa$ B, eventos que normalmente resultam na ativação das caspases e apoptose (MAHALINGAM et al., 2002). A ligação do TNF- $\alpha$  ao TNF-R2 induz a proliferação de linfócitos T citotóxicos e timócitos (TARTAGLIA et al., 1993).

Como os macrófagos tornam-se ativados e secretam citocinas quando expostos ao LPS, torna-se compreensível a variação na quantidade de TNF- $\alpha$  liberada *in vitro* quando adicionamos diferentes concentrações de LPS aos macrófagos peritoneais aderidos à placa de cultura. DANIELSON et al. (2003) demonstraram valores semelhantes ao observado por nós na liberação desta

citocina frente ao estímulo de LPS nas mesmas concentrações. Dentre as três concentrações utilizadas, selecionamos para os experimentos seguintes a mais baixa capaz de liberar TNF- $\alpha$  (1 ng/ml).

A adição de ACh à cultura de macrófagos produziu um aumento significativo na liberação de TNF- $\alpha$  induzida por LPS. A concentração de ACh de 10 nM foi a que melhor representou este aumento, portanto esta foi utilizada para determinarmos através de qual receptor colinérgico estávamos obtendo este efeito. A TC, mas não a AT, reverteu a potenciação da liberação de TNF- $\alpha$  induzida por ACh em macrófagos estimulados com LPS. Estes dados sugerem que, em baixas concentrações de LPS a ACh pode, atuando em receptores nicotínicos, aumentar a liberação de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos. Com o objetivo de avaliar a resposta dos macrófagos residentes da cavidade peritoneal frente ao tratamento com ACh e seus antagonistas, realizamos o mesmo experimento em macrófagos de cavidades normais, visto que foi sobre estas células que observamos nossas respostas *in vivo*. Em nossos resultados observamos que os macrófagos residentes apresentaram uma resposta menor, porém, com o mesmo perfil apresentado pelos macrófagos obtidos de animais tratados previamente com tioglicolato, ou seja, nas células expostas ao LPS, a ACh provocou um aumento da liberação de TNF- $\alpha$  mediado via receptor nicotínico. Estes dados sugerem que o efeito da tubocurarina em reduzir a liberação de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais estimulados pelo LPS, poderia contribuir, pelo menos em parte, para

os efeitos observados *in vivo*, ou seja, redução da migração celular e da resposta febril.

De acordo com nossos resultados, o aumento de TNF produzido pela ACh em macrófagos peritoneais tratados com LPS parece ser mediado via receptores nicotínicos. Os receptores colinérgicos nicotínicos são uma família de canais catiônicos de diferentes subtipos, cada qual com uma farmacologia, fisiologia e distribuição anatômica particular. Esta família tem sido dividida em duas classes: os receptores nicotínicos sensíveis a  $\alpha$ -bungarotoxina e os receptores nicotínicos clássicos (GOTTI E CLEMENTI, 2004). Já há algum tempo que foi demonstrado que células fagocíticas apresentam receptores nicotínicos colinérgicos sensíveis à BTX. No entanto somente recentemente tornou-se evidente que macrófagos humanos apresentam a subunidade  $\alpha 7$  de receptores nicotínicos e que a ativação destes pela ACh reduz a liberação de TNF- $\alpha$ , IL-1 e 6 induzida por LPS (WANG et al., 2003).

Assim, a fim de comprovar realmente nossa hipótese de que a ACh apresenta um papel dual frente à situação de choque séptico e resposta local decidimos simular a situação provocada por BOROVIKOVA, et al. 2000, na qual estimulou os macrófagos com altas doses de LPS. Para isto utilizamos LPS 10 $\mu$ g/ml, ACh 100nM e TC 500nM. Nossos resultados demonstraram uma redução, pela ACh, de 33% da liberação de TNF induzida por LPS. Esta resposta é mediada também via receptor nicotínico, uma vez que foi revertida com a utilização do antagonista deste receptor, TC, confirmando os resultados obtidos por estes autores. Para observarmos este efeito inibitório da ACh, a concentração utilizada em nosso experimento foi cem vezes maior do que aquela

utilizada por BOROVIKOVA et al. (2000). Esta concentração se justifica porque estes autores utilizaram cultura de monócitos humanos enquanto nossos estudos foram realizados em monocamadas de macrófagos de ratos, que aparente são menos sensíveis aos efeitos do LPS. Enquanto estes autores observaram uma liberação de aproximadamente 4000 pg/ml de TNF- $\alpha$  por monócitos humanos, utilizando um número de células similar aquele utilizado por nós e a mesma concentração de LPS de E.coli 0111:B4, nós obtivemos uma liberação de aproximadamente 750 pg/ml de TNF- $\alpha$  utilizando macrófagos de ratos.

**É importante ressaltar que a redução da liberação de TNF- $\alpha$  provocada pela ACh não está relacionada com morte celular. Este fato foi comprovado pelo teste de viabilidade celular realizado com MTT. Neste teste observamos que apenas as células tratadas com LPS tiveram uma redução pequena, porém significativa, na viabilidade celular quando comparada ao grupo controle, ou seja, a ACh sozinha, ou qualquer dos outros tratamentos utilizados, não modificaram a viabilidade celular .**

**Portanto, através dos nossos resultados podemos sugerir que a ACh, através de receptores nicotínicos, apresenta um papel dual frente à um estímulo nocivo, comportando-se como pró-inflamatória na resposta inflamatória e como antiinflamatória no choque séptico.**

## 10) CONCLUSÃO

Nossos resultados nos permitem sugerir que o LPS funciona como um estímulo que leva a um aumento da liberação de ACh pelas fibras eferentes do vago e que esta, além de efeitos em outras estruturas, poderia também atuar em macrófagos, aumentando a liberação de TNF- $\alpha$  que certamente contribuiria para os processos de migração celular e febre. Por outro lado, a partir dos estudos subcrônicos, podemos sugerir que o bloqueio diário dos receptores nicotínicos dos macrófagos levam a uma alteração na funcionalidade destas células, uma vez que os experimentos de migração celular e resposta febril foram realizados no dia seguinte à última administração do antagonista, descartando a possibilidade de ser somente o resultado de um bloqueio temporário deste receptor como na resposta aguda. Ainda, nossos dados parecem confirmar os dados de BOROVIKOVA et al. (2000) de que quando as doses de LPS são elevadas, a ACh promove um efeito de redução dos níveis de TNF- $\alpha$ , atuando portanto como anti-inflamatória. Os eventos intracelulares que levariam a este papel dual da ACh no controle da liberação de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos através da ativação destes receptores niconíticos necessitam de mais estudos.

## 9) APÊNDICE

### 9.1) DROGAS, DOSES E SOLUÇÕES

- Atropina (Sigma, Chemicals & Co., EUA) 20µg/kg e 50nM (diluída em PBS);
- Acetilcolina (Merck, Sharpe & Dohme Ltd) 1, 3, 10 e 100nM (diluída em água destilada);
- D-tubocurarina (Sigma, Chemicals & Co., EUA) 0,2, 2 e 20µg/kg; 50 e 500nM (diluída em PBS);;
- Brometo de neostigmina (Sigma, Chemicals & Co., EUA) 1mM (diluída em água destilada);
- Lipopolissacarídeo *Escherichia coli* 0111:B4(Sigma, Chemicals & Co., EUA) 0,2 e 5µg/kg; 1, 100 e 10000ng/ml (diluído em salina estéril);
- Solução salina estéril 0,9%

### 9.2) SOLUÇÕES, TAMPÕES E MEIO DE CULTURA-

- **Solução mãe de PBS (salina tamponada em fosfato)**

NaCl .....	80 g
KCl .....	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	14,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2 g

Diluir em um litro de água bidestilada (mili-Q), depois autoclavar para armazenar.  
Acertar o pH para 7,2-7,4.

**- PBS para coletar o exsudato peritoneal**

PBS (diluído 1:10 em água mili-Q) .....300 ml  
Heparina (0,2 ml de heparina/100 ml de PBS diluído).....0,6 ml  
Albumina 3% (1 ml de albumina/100 ml de PBS diluído).....3,0 ml

**- Líquido de TURK (diluidor glóbulos brancos - rompe as hemácias)**

Água mili-Q .....500 ml  
Ácido acético glacial .....15 ml  
Azul de metileno 2% (ou violeta de genciana 2%) ..... 0,2 ml

**- Albumina bovina 3%**

Albumina .....3 g  
PBS diluído .....100 ml

**- Corante pancreômico de Rosenfeld**

Corante de Giensa (azul eosina – azul metileno) ..... 0,97g  
Corante de May-Gronwald (eosina – azul metileno) .....0,53 g  
Acrescentar em um litro de metanol P. A. e filtrar.

**Viabilidade celular por MTT**

MTT (Sigma) .....	250 mg
Solução salina tamponada sem $\text{Ca}^{+2}$ e $\text{Mg}^{+2}$ .....	50 ml

**Solução de SDS 10% acídica:**

Ácido clorídrico 1 M (BDH) .....	5,0 ml
SDS (Sigma) .....	50,0 g
Água destilada .....	q. s. p. 500,0 ml

**Meio de cultura**

RPMI 1640 com glutamina sem bicarbonato (Gibco) .....	10,40 g
Bicarbonato de sódio (Reagen) .....	0,67 g
HEPES (serva) .....	2,38 g
Água deionizada autoclavada .....	q. s. p. 1,0 litro

**Solução de tioglicolato 3%**

Meio fluido de tioglicolato desidratado (Difco).....	3,0 g
Água deionizada.....	100,0 ml

A solução foi aquecida até completa dissolução, sendo o tempo de fervura inferior a três minutos.

**Tampão de lavagem para ELISA**

PBS .....	1 litro
Tween 20 .....	500 µl

**Tampão de bloqueio para ELISA**

PBS .....	50ml
Albumina bovina .....	0,5 g
Sacarose .....	2,5 g
Azida .....	0,025 g

**Tampão diluente para ELISA**

NaCl .....	0,877 g
Trizma base .....	0,242 g
Água .....	q.s.p.100 ml
Acertar o pH para 7,3 com HCl e então adicionar	
Albumina bovina .....	0,100 g
Tween 20 .....	50 µl

**Tampão para estreptoavidina para ELISA**

PBS .....	11 ml
Albumina bovina .....	0,11 g

**Ácido sulfúrico 1 M**

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.....5,33 ml  
Água deionizada .....q.s.p.100 ml

## 11) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, M.S., LLANOS-Q, J., DINARELLO, C.A., BLATTEIS, C.M.; Interleukin 1 reduces opioid binding in guinea pig brain. **Peptides**. v. (6), p.1149-1154, 1985.

ANTONICA A, AYROLDI E, MAGNI F, PAOLOCCI N. Lymphocyte traffic changes induced by monolateral vagal denervation in mouse thymus and peripheral lymphoid organs **J Neuroimmunol**. v. 64, p. 115-122, 1996.

BALDINO, F. Jr, BECKEMAN, A.L., ADLER, M.W. Actions of iontophoretically applied morphine on hypothalamic thermosensitive units **Brain Res**. v.25; p. 199-208, 1980.

BANKS, W.A; KASTIN, AJ. Reversible association of the cytokines MIP-1 alpha and MIP-1 beta with the endothelia of the blood-brain barrier. **Am J Physiol**. v.266, p. 1670-1674, 1994.

BANKS, W.A; KASTIN, AJ.; BROADWELL, R.D. Passage of cytokines across the blood-brain barrier. **Neuroimmunomodulation**. v. 2, p.241-248, 1995.

BEMELMANS M.H.A, van TITS L.J.H e BUURMAN W.A. Tumor necrosis factor: Function, release and clearance. **Crit. Rev Immunol** v. 16, p. 1-11, 1996.

BERNIK TR, FRIEDMAN SG, OCHANI M, DIRAIMO R, ULLOA L, YANG H, SUDAN S, CZURA CJ, IVANOVA SM, TRACEY KJ. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. **J Exp Med**. v. 195, p. 25-28, 2002

BERTHOUD, H.R., NEUHUBER, W.L.; Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. **Auton Neurosci**. v. 85, p. 1-17, 2000.

BLATTEIS C.M.; SEHIC, E. LI, S. Afferent pathways of pyrogen signaling. **Ann N Y Acad Sci**. ; v. 856, p. 95-107, 1998.

BLATTEIS CM, SEHIC E, LI S. Pyrogen sensing and signaling: old views and new concepts. **Clin Infect Dis**. v. 5, p. 168-177, 2000.

BLATTEIS CM, LI S. Pyrogenic signaling via vagal afferents: what stimulates their receptors? **Auton Neurosci**. v. 85, p. 66-71, 2000

BLUTHE RM, MICHAUD B, KELLEY KW, DANTZER R. Vagotomy blocks behavioural effects of interleukin-1 injected via the intraperitoneal route but not via other systemic routes **Neuroreport**. v. 7, p. 2823-2827, 1996

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

BOULANT, J.A. Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature. **Ann N Y Acad Sci**. v.29; p. 108-115, 1998.

BRISCOE, D.M.; COTRAN, R.S. Role of leukocyte-endothelial cell adhesion molecules in renal inflammation: in vitro and in vivo studies. **Kidney Int Suppl**. v. 42, p. 27-34, 1993.

BROCKHAUS M, SCHOENFELD HJ, SCHLAEGER EJ, HUNZIKER W, LESSLAUER W, LOETSCHER H. Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. **Proc Natl Acad Sci** . v. 87, p. 3127-3131, 1990

BROWN, E.J. Adhesive interaction in the immune system. **Cell Biology**, v. 7, p.289-295, 1997.

CARR, D.B., BERGLAND, R., HAMILTON, A., BLUME, H., KASTING, N., ARNOLD, M., MARTIN, J.B., ROSENBLATT, M.. Endotoxin-stimulated opioid peptide secretion: two secretory pools and feedback control in vivo. **Science**. v. 217, p. 845-848, 1982.

CARSWELL EA, OLD LJ, KASSEL RL, GREEN S, FIORE N, WILLIAMSON B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc Natl Acad Sci** . v. 72, p. 3666-3670, 1975

CHANG CC. Looking back on the discovery of alpha-bungarotoxin **J Biomed Sci**. v. 6, p. :368-375, 1999.

DANIELSON DS, HEAGY W, NIEMAN KM, WEST MA. Relative hyperoxia augments lipopolysaccharide-stimulated cytokine secretion by murine macrophages **Surgery**. v. 133, p. 538-546, 2003

DAVENPECK KL, ZAGORSKI J, SCHLEIMER RP, BOCHNER BS. Lipopolysaccharide-induced leukocyte rolling and adhesion in the rat mesenteric microcirculation: regulation by glucocorticoids and role of cytokines. **J Immunol**. v. 12, p. 6861-6870, 1998.

DE BOER, AG; BREIMMER D.D.. Cytokines and blood-brain barrier permeability **Prog Brain Res**. v.115, p.425-451, 1998.

DEMETERS ,P.A., Lo, S.K., OLSEN-EGBERT, E., WALZ A., BAGGIOLINI, M. E COHN, Z.A. Neutrophil-activating protein1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. **J. Exp. Med.** v.171, p.1155-1162, 1990.

DEMETERS ,P.A., POWELL, D.E., WALZ A.,CLARK-LEWIS, I., BAGGIOLINI, M., e COHN, Z.A. Differential effects of neutrophil-activating peptide1/IL-8 and its homologues on leukocyte adhesion and phagocytosis. **J Immunol.**, v.147, p. 4211-4217, 1991.

DINARELLO, C.A.; CANNON, J.G.; WOLF, S.M. New concepts on the patogénesis of fever. **Rev. Infect. Dis.**, v.10, p.168-189, 1988.

ELMQUIST JK, SCAMMELL TE, JACOBSON CD, SAPER CB Distribution of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide administration. **J Comp Neurol.** v. 37, p. 85-103, 1996

EMOTO, H., YOKOO, M., YOSHIDA, M., TANAKA, M., Corticotropin-releasing factor enhances noradrenaline release in the rat hypothalamus assessed by intracerebral microdialysis. **Brain Res** v. 22, p. 286-288, 1993.

FABRICIO AS, VEIGA FH, CRISTOFOLETTI R, NAVARRA P, SOUZA GE.The effects of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors on endothelin-1-induced fever in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 3, p. 671-677, 2005.

FAGARASAN, M.O., AIELLO, F., MUEGGE, K., DURUM, S., AXELROD, J.; Interleukin 1 induces beta-endorphin secretion via Fos and Jun in AtT-20 pituitary cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 20, p.7871-7874, 1990.

FERNANDEZ ML, DURAN HA, O'CONNOR SE, CABRINI RL, MOLINARI BL. Role of distinct subpopulations of peritoneal macrophages in the regulation of reactive oxygen species release. **Free Radic Biol Med.** v. 7, p. 797-809, 1999

FERREIRA, S.H., Are macrophages the body alarm cells? **Agents And Actions** v. 10, p. 229-230, 1980.

FILEP, J.G., FOURNIER, A., FOLDES-FILEP, E.; Acute pro-inflammatory actions of endothelin-1 in the guinea-pig lung: involvement of ETA and ETB receptors. **Br J Pharmacol** v 2, p. 227-236, 1995.

FISHER DM, O'KEEFFE C, STANSKI DR, CRONNELLY R, MILLER RD, GREGORY GA. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of d-tubocurarine in infants, children, and adults **Anesthesiology.** v. 57, p. 203-208, 1982

FORSBERG, L., LEEB, L., THOREN, S., MORGENSTEM, R., JAKOBSSON, P.J. Human glutathione dependent prostaglandin E synthase: gene structure and regulation. **FEBS Lett. Apr** v. 7, p. 78-82, 2000.

FRAGA, D. Participação dos opióides endógenos na termorregulação e na resposta febril. Curitiba, Tese de mestrado em Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, UFPR, 2004.

FURCHGOTT RF, CHERRY PD, ZAWADZKI JV, JOTHIANANDAN D. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries **Cardiovasc Pharmacol.** v. 6, p. 336-343, 1984.

GALLIN, J.I.; GOLDSTEIN, I.M.; SNYDERMAN, R. **Inflammation**: basic principles and clinical correlates. 2. ed. New York: Raven Press, 1982.

GORDON CJ. Thermoregulation in laboratory mammals and humans exposed to anticholinesterase agents. **Neurotoxicol Teratol.** v. 16. p. 427-453, 1994

GOTTI C, CLEMENTI F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology **Prog Neurobiol.** v. 74, p. 363-396, 2004

HELSET, E., KJAEVE, J., HAUGE, A.; Endothelin-1-induced increases in microvascular permeability in isolated, perfused rat lungs requires leukocytes and plasma. **Circ Shock.** v.1, p. 15-20, 1993.

HORI, T., NAKASHIMA, T., TAKE, S., KAIZUKA, Y., MORI, T., KATAFUCHI, T., Immune cytokines and regulation of body temperature, food intake and cellular immunity. **Brain Res Bull.** v 27, p. 309-313, 1991.

HUBER, AR.; KUNKEL, S.L.; TODD, R.F. 3<sup>rd</sup>, WEISS, S.J. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. **Science.** v. 254, p. 1435-1440, 1991.

HUNNINGHAKE, G.W., GALLIN, J.I. e FAUCI, A.S. Immunologic reactivity of the lung. The in vivo and in vitro cultured human alveolar macrophages, **Am. Rev. Dis.** v.117, p.15-23, 1978.

ICHIKAWA, H., HELKE, C.J.; Coexistence of calcium-binding proteins in vagal and glossopharyngeal sensory neurons of the rat. **Brain Res.** v.1, p. 349-353, 1997.

ISHIDA K, TAKESHIGE K, MINAKAMI S. Endothelin-1 enhances superoxide generation of human neutrophils stimulated by the chemotactic peptide N-

formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 2, p. 496-500, 1990.

JAKOBSSON, P.J., THOREN, S., MORGENSTEM, R., SAMUELSON, B., Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. **Phys Rev Lett.** v. 77, p.1652-1655, 1999.

KANG BN, JEONG KS, PARK SJ, KIM SJ, KIM TH, KIM HJ, RYU SY. Regulation of apoptosis by somatostatin and substance P in peritoneal macrophages. **Regul Pept.** v. 15, p. 43-49, 2001.

KLEMM, P., WARNER, T.D., CORDER, R., VANE, J.R.; Endothelin-1 mediates coronary vasoconstriction caused by exogenous and endogenous cytokines. **J Cardiovasc Pharmacol Suppl** v.3, p.419-421, 1995.

KLUGER, M.J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiol Rev.** v. 7, p. 93-127, 1991.

KLUGER MJ, KOZAK W, LEON LR, CONN CA. The use of knockout mice to understand the role of cytokines in fever. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** v. 25, p. 141-14, 1998

KOENING, J.I.; SNOW, K.B.D.; CLARK B.D.; TONI, R.; CANNON, J.G; SHAW, A.R.; DINARELLO, CA; REICHLIN, S.L. LEE e LECHAN, R.M. Intrinsic pituitary interleukin-1 $\beta$  is induced by bacterial lipopolysaccharide. **Endocrinology.** v. 126, p. 3053-3058, 1990.

KOHL e BITTER-SUERMAN D. Anaphylotoxins, in Complement in Health and Disease WHALEY K., LOSS M. e WEILER J.M. (eds.), **Kluwer Academic Publishers**, v. 10, p. 299-324, 1993.

KOSHI, T., EDANO, T., ARAI, K., SUZUKI, C., EHARA, Y., HIRATA, M., OHKUCHI, M., OKABE, T.; Pyrogenic action of endothelin in conscious rabbit. **Biochem Biophys Res Commun.** v (3), p.1322-1326, 1992.

KUJUBU, D.A; FLETCHER, B.S.; VARNUM, B.C.; LIM, R.W., HERSCHMAN, H.R. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. **J Biol Chem.** v. 15, p. 12866-12872, 1991.

LAYÉ, S., BLUTHE, R.M., KENT, S., COMBE, C., MEDINA, C., PARNET, P., KELLEY, K., DANTZER, R.; Subdiaphragmatic vagotomy blocks induction of IL-1 beta mRNA in mice brain in response to peripheral LPS. **Am J Physiol.** v. 268, p. 1327-1331, 1995.

LICINIO, J.; WONG M.L Pathways and mechanisms for cytokine signaling of the central nervous system. **J. Clin Invest.** v. 12, p. 2941-2947, 1997.

LIPOWSKY, R. Adhesion of Membranes via Anchored Stickers. **Neurosci Lett.** v. 3, p. 202-206, 1996.

MAHALINGAM S, LIDBURY BA. Suppression of lipopolysaccharide-induced antiviral transcription factor (STAT-1 and NF-kappa B) complexes by antibody-dependent enhancement of macrophage infection by Ross River virus. **Proc Natl Acad Sci** . v. 99, p. 13819-13824., 2002

MANNEL DN, MOORE RN, MERGENHAGEN SE Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor-necrotizing factor). **Infect Immun.** v.30, p. 523-530, 1980

MANSOUR, A., FOX, C.A., BURKE, S., AKIL, H., WATSON, S.J. Immunohistochemical localization of the cloned mu opioid receptor in the rat CNS. **J Chem Neuroanat.** v. 8, p.283-305, 1995.

MARIMOTO, A; MURAKAMI, N.; TAKADA, M.; TESHIROGI, S.; WATANABE, T.; Fever and acute phase response induced in rabbits by human recombinant interferon-gamma. **J Physiol.** v. 391, p.:209-218, 1987.

MASAKI T. Endothelin in vascular biology. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 14, p. 496-500, 1990.

MEETER E. The effect of atropine on the hypothermia and the shift in set-point for heat release evoked by a cholinesterase inhibitor in the rat. - **Proc K Ned Akad Wet C** v. 74, p. 105-112, 1971

McCARRON, R.M., WANG, L., STANIMIROVIC, D.B., SPATZ, M.; Endothelin induction of adhesion molecule expression on human brain microvascular endothelial cells. **Neurosci Lett.** v 1, p. 31-34, 1993.

MILTON AS. Thermoregulatory actions of eicosanoids in the central nervous system with particular regard to the pathogenesis of fever. **Ann N Y Acad Sci.** v. 559, p. 392-410, 1989

MIÑANO, F.J.; FERNANDEZ-ALONSO, A; BENAMAR, K.; MYERS, R.K.; SANCIBRIAN, M.; RUIZ, R.M. Macrophage inflammatory protein-1beta (MIP-1beta) produced endogenously in brain during E. coli fever in rats. **Eur J Neurosci**. v. 8, p. 424-428, 1996

MOCCIA F, FROST C, BERRA-ROMANI R, TANZI F, ADAMS DJ. Expression and function of neuronal nicotinic ACh receptors in rat microvascular endothelial cells **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2004v. 286, p. 486-491, 2004

MURAKAMI, M., NARABA, H., TANIOKA, T., SEMMIO, N NAKATANI, Y., KOJIMA, F., IKEDA, T., FUEKI, M., UENO, A, OHS, KUDO, I., Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. **J Biol Chem**. v. 20, p. 32783-32792, 2000.

MURPHY, M.R., HUG, C.C., Jr., McCLAIN, D.A.; Dose-independent pharmacokinetics of fentanyl. **Anesthesiology**. v. 6, p. 537-540, 1983.

NAMBI, P.; PULLEN, M.; SLIVJAK, M.J.; OHLSTEIN, E.H.; STORE, B.; SMITH, E.F. 3 rd Identification of a novel endothelin receptor in *Xenopus laevis* liver. **Neuropeptides**. v. 26, p. 181-185, 1994.

NOHGAWA M., SASADA M., MAEDA A. ASAGOE K., HARAKAWA N., TACAÑO K., YAMAMOTO K.e OKUMA M. Leukotriene B<sub>4</sub> activated human endothelial cells promote transendothelial neutrophil migration. **J. Leuk Biol** v. 62, p. 203-209, 1997.

OTTO B, OGILVIE A. The response of peritoneal macrophages after implantation of several ceramics as measured by the change of ectoenzyme activity. **Biomaterials**. v. 11, p. 1049-1055, 1998.

PERRETTI, M. Endogenous mediators that inhibit the leukocyte-endothelium interaction, **TIPS**, v. 18, p 418-425, 1997.

PILLAI, N.P., ROSS, D.H., Interaction of kappa receptor agonists with Ca<sup>2+</sup> channel antagonists in the modulation of hypothermia. **Eur J Pharmacol**. v. 16, p. 237-244, 1986.

PIOVEZAN, A.P., D'ORLEANS-JUSTE, P., SOUZA, G.E., RAE, G.A.; Endothelin-1-induced ET(A) receptor-mediated nociception, hyperalgesia and oedema in the mouse hind-paw: modulation by simultaneous ET(B) receptor activation. **Br J Pharmacol**. v. 5, p 961-968, 2000.

PLOTKIN, S.R.; BANKS, W.<sup>a</sup>; KASTIN, A.J. Comparison of saturable transport and extracellular pathways in the passage of interleukin-1 alpha across the blood-brain barrier. **J Neuroimmunol.** v. 1, p. 41-47, 1996.

PRECHTL, J.C.; POWLEY, T.L.; The fiber composition of the abdominal vagus of the rat. **Anat Embryol (Berl).** v. 181, p. 101-115, 1990.

RIBEIRO RA, VALE ML, THOMAZZI SM, PASCHOALATO AB, POOLE S, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur J Pharmacol.** v. 11, p. 111-118, 2000

ROCHA e SILVA, M. A brief history of inflammation. In: Handbook of Experimental Pharmacology. VANE, J.R. e FERREIRA, S.H. (eds.), Springer-Verlag, v. 50, p. 6-25, 1978.

ROCHA NP, FERREIRA SH. Restoration by levamisole of endotoxin-inhibited neutrophil migration, oedema and increased vascular permeability induced by carrageenin. **Eur J Pharmacol.** v. 122, p. 87-92, 1986.

ROLLINS, B.J. **Chemokines.** Blood. v. 90, p. 909-928, 1997.

ROTHWELL, N.J. Central activation of thermogenesis by prostaglandins: dependence on CRF. **Horm Metab Res** v. 22, p. 616-618, 1990.

ROTHWELL, N.J. CRF is involved in the pyrogenic and thermogenic effects of interleukin 1 beta in the rat. **Am J Physiol.** v. 256, p. 111-115, 1989.

ROTHWELL, N.J.; Central activation of thermogenesis by prostaglandins: dependence on CRF. **Horm Metab Res.**; v. 22, p. 616-618, 1990.

RUSSO, M., The role of macrophages in the chemotactic response of polymorphonuclear leukocytes to bacteria lipopolysaccharides, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. v. 134, p. 326-330, 1980.

SAEED RW, VARMA S, PENG-NEMEROFF T, SHERRY B, BALAKHANEH D, HUSTON J, TRACEY KJ, AL-ABED Y, METZ CN. Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. **J Exp Med.** v. 201, p. 1113-1123, 2005.

SAPER CB. The spinoparabrachial pathway: shedding new light on an old path. **J Comp Neurol.** v. (4), p. 477-479, 1995.

SAPER, C.B., BREDER, C.D.; The neurologic basis of fever. **N Engl J Med.** v. 26, p. 1880-1886, 1994.

SEDGWICK, <sup>a</sup>D.; WILLOUGHBY, D.A . Initiation of the inflammatory response and its prevention. In: Handbook of inflammation. BONTA, I.L.; BRAY, M.A.; PARNHAM, M.J. (ed.), Elsevier, v.5, p.27-47, 1985.

SMITH, W.L.; MARNETT, L.J.; DE WITT, D.L.; Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. **Pharmacol Ther.** v. 49, p. 153-179, 1991.

SOUBA WW, SCOTT TE, WILMORE DW. Gut consumption of intravenously administered fuels. **Curr Surg.** v. 41, p. 461-464, 1984  
SOUZA, G.E.P., e FERREIRA, S.H. Blockade by anti-macrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity **Agents And Actions.** v. 1, p. 97-103, 1985.

SOUZA GE, CUNHA FQ, MELLO R, FERREIRA SH. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents Actions.** 1988 v. 24, p. 377-380, 1988.

SPANGELO, B.L.; ISAKSON, P.C. e MACLEOD, R.M. Production of interleukin-6 by anterior pituitary cells is stimulated by increased intracellular adenosine 3',5' -monophosphate and vasoactive intestinal peptide. **Endocrinology.** v. 127, p. 403-409, 1990.

SPRINGER T.A Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm, **Cell.** v. 76,;p. 301-314, 1994.

STADNYK, A.W. e GAULDIE, J. The acute phase protein response during parasitic infection. **Parasitology Today,** v.7, p. 7-12, 1991.

STANKOVA, J., D'ORLEANS-JUSTE, P., ROLA-PLESZCZYNSKI, M.; ET-1 induces IL-6 gene expression in human umbilical vein endothelial cells: synergistic effect of IL-1. **Am J Physiol.** v. 1, p. 1073-1078, 1996.

STEINER, P., SARRIA, J.C., GLAUSER, L., MAGNIN, S., CATSICAS, S., HIRLING, H., Modulation of receptor cycling by neuron-enriched endosomal protein of 21 kD. **J Cell Biol.** v. 24, p. 1197-1209, 2002.

STERNBERG, E.M.; Monokines, lymphokines and brain. In: **The Year of Immunology.** , v.5, p. 205-217, 1988.

STERNBERG, E.M; Neural-immune interactions in health and disease. **J Clin Invest.** ;v. 11, p. 2641-2647, 1997.

- TADA H, SHIHO O, KUROSHIMA K, KOYAMA M, TSUKAMOTO K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. **J Immunol Methods**. v. 93, p. 157-165, 1986
- TALMAN, W.T., WELLENDORF, L., MARTINEZ, D., ELLISON, S., LI, X., CASSEL, M., OHTA, H., Glycine elicits release of acetyl choline from the nucleus tractus solitarii in rat. **Brain Res**. v. 2, p 253-259, 1994.
- TAKAHASHI Y, SMITH P, FERGUSON A, PITTMAN QJ. Circumventricular organs and fever. **Am J Physiol**. v. 2, p. 1690-1695, 1997
- TANIOKA, T., NAKATANI, Y., SEMMIO, N., MURAKAMI, M., KUDO, I., Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. **J Biol Chem**. v. 20, p. 32775-32782, 2000.
- TARTAGLIA LA, GOEDEL DV, REYNOLDS C, FIGARI IS, WEBER RF, FENDLY BM, PALLADINO MA JR. Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. **J Immunol**. v. 151, p. 4637-4641, 1993
- TAVARES, E., MIÑANO F.J., Macrophage inflammatory protein-1beta induces dexamethasone-unresponsive fever in rats. **Neuroreport**. v.3, p. 2519-2522, 1998.
- TAVARES, E., MIÑANO F.J., Differential sensitivities of pyrogenic chemokine fevers to cyclooxygenase isozymes antibodies. **Brain Res Bull**. v. 30, p. 181-187, 2002.
- TAVARES, E., MIÑANO F.J., Macrophage inflammatory protein-1beta induces dexamethasone-unresponsive fever in rats. **Neuroreport**. v. 3, p. 2519-2522, 1998.
- TRACEY, K.J. e CERAMI, A. Tumor necrosis factor: A pleiotropic cytokine and therapeutic target. **Annu Rev Med**. v.45, p. 491-503, 1994.
- TRACEY, K.J. e CERAMI, A. Tumor necrosis factor: An updated review of its biology. **Crit. Care Med**. v.21, p. 415-422, 1993.
- TRAVIS, J.T. Biotech gets a grip on cell adhesion. **Science** v. 26, p. 906-915, 1993.
- URADE, Y., WATANABE, K., HAYAISHI, O . Prostaglandin D, E, and F synthases. **J Lipid Mediat Cell Signal**. v.12, p. 257-273, 1995.

USHIKUBI, F., SEGI, E., SUGIMOTO, Y., MURATA, T., MATSUOKA, T., KOBAYASHI, T., HIZAKI, H., TUBOI, K., KATSUYAMA, M., ICHEKAWA, A., TANAKA, T., YOSHIDA, A, NARUMUYA, S. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. **Nature**. v. 17, p. 281-284, 1998.

VAN FURTH, R., Monocyte production during inflammation. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, v.8, p. 205-211, 1985.

VAN WESTERLOO DJ, GIEBELEN IA, FLORQUIN S, DAALHUISEN J, BRUNO MJ, DE VOS AF, TRACEY KJ, VAN DER POLL T. The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis. **J Infect Dis**. v. 15, p. 2138-2148.

VEMULAPALLI, S., CHIU, P.J., GRISCTI, K., BROWN, A., KUROWSKI, S., SYBERTZ, E.J.; Phosphoramidon does not inhibit endogenous endothelin-1 release stimulated by hemorrhage, cytokines and hypoxia in rats. **Eur J Pharmacol**. v. 2, p. 95-102, 1994.

WANG, H.L., GAO, F., BREN, N., SINE, S.M.; Curariform antagonists bind in different orientations to the nicotinic receptor ligand binding domain. **J Biol Chem**. v. 278, p. 32284-32291, 2003.

WANG X, WANG BR, ZHANG XJ, DUAN XL, GUO X, JU G. Fos expression in the rat brain after intraperitoneal injection of Staphylococcus enterotoxin B and the effect of vagotomy. **Neurochem Res**. v. 29, p. 1667-1674, 2004

WATANABE, K., KURIHARA, K., TOKUNAGA, Y., HAYAISHI, O, Two types of microsomal prostaglandin E synthase: glutathione-dependent and -independent prostaglandin E synthases. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 9, p. 148-152, 1997.

WATKINS LR, GOEHLER LE, RELTON JK, TARTAGLIA N, SILBERT L, MARTIN D, MAIER SF. Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication. **Neurosci Lett**. v. 2, p. 27-31, 1995.

WEAVER, D. L. Normal inflammatory response to injury. In : **Inflammation I**, Singapore ed. Thornborough, v. 12, p. 13-68, 1995.

WERNER, M.F., FRAGA, D., MELO, M.C., SOUZA, G.E., ZAMPRONIO, A.R.; Importance of the vagus nerve for fever and neutrophil migration induced by intraperitoneal LPS injection. **Inflamm Res**. v. 52, p. 291-296, 2003 .

Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Unger R, Kirkpatrick CJ. The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology **Life Sci.** v. 72, p. 2055-2061, 2003

XIN, L., BLATTEIS, C.M., Hypothalamic neuronal responses to interleukin-6 in tissue slices: effects of indomethacin and naloxone. **Brain Res Bull.** v. 29, p. 27-35, 1992.

XIN, X., CAI, Y., MATSUMOTO, K., AGUI, T.; Endothelin-induced interleukin-6 production by rat aortic endothelial cells. **Endocrinology.** v. 1, p. 132-137, 1995.

YAMAGATA, K., MATSUMURA, K., INOUE, W., SHIRAKI, T., SUZUKI, K., YASUDA, S., SUGIURA, H., CAO, C., WATANABE, Y., KOBAYASHI, S. Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. **J Neurosci.** v. 8, p. 2669-2677, 2001.

YAMAMURA, H., NABE, T., KOHNO, S., OHATA, K.; Endothelin-1, one of the most potent histamine releasers in mouse peritoneal mast cells. **Eur J Pharmacol.** v. 265-261, p. 9-15, 1994.

ZAMPRONIO, A.R, SOUZA, G.E, SILVA, C.A., Interleukin-8 induces fever by a prostaglandin-independent mechanism. **Am J Physiol.** v. 266, p. 1670-1674, 1994.

ZIMMERMAN, G.A., ELSTAD, M.R., LORANT, D.E., McINTYRE, T.M., PRESCOTT, S.M., TOPHAN M.K., WEYRICH, A.S. e WHATLEY, R.E. Platelet-activating factor (PAF) signaling and adhesion in cell-cell interactions. **Adv Exp Med Biol.** v. 416, p. 269-304, 1996.

ZHUO H, ICHIKAWA H, HELKE CJ. Neurochemistry of the nodose ganglion. - **Prog Neurobiol.** v. 2, p. 79-107, 1997.