



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
CAMPUS DIADEMA**

**PAULA CASSANELLI SANTOS**

**ANÁLISE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM  
CAMUNDONGOS COM DEFICIÊNCIA COLINÉRGICA EM  
LONGO PRAZO**

**DIADEMA**

**2017**

**PAULA CASSANELLI SANTOS**

**ANÁLISE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM  
CAMUNDONGOS COM DEFICIÊNCIA COLINÉRGICA EM  
LONGO PRAZO**

Dissertação apresentada, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Química, ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema.  
**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Carla Máximo Prado

**DIADEMA**

**2017**

Santos, Paula Cassanelli

**Análise da resposta inflamatória em camundongos com  
deficiência colinérgica em longo prazo** / Paula Cassanelli Santos. --  
Diadema, 2017.

57 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia Química - Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Química) - Universidade Federal de São  
Paulo - Campus Diadema, 2017.

Orientador: Carla Máximo Prado

1. Sistema Colinérgico Anti-inflamatório. 2. Inflamação Pulmonar. 3.  
Camundongo Idoso. I. Título.

CDD 616.24

**PAULA CASSANELLI SANTOS**

**ANÁLISE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM  
CAMUNDONGOS COM DEFICIÊNCIA COLINÉRGICA EM  
LONGO PRAZO**

Dissertação apresentada, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Química, ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Carla Máximo Prado

Data: 15/12/2017.

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ana Cristina Breithaupt Faloppa  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Clarice Rosa Olivo  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Mônica Marques Telles  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Carla Máximo Prado  
Orientadora  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

*Aos meus pais José Roberto e Angela;  
Aos meus filhos Enzo e Sofia;  
E a todas as pessoas especiais que me  
ajudaram nesse projeto.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar saúde e todas as condições para superar as dificuldades no caminho.

A esta faculdade e todo seu corpo docente, que me proporcionaram as condições necessárias para que eu alcançasse meus objetivos.

A minha orientadora Carla Máximo Prado, pela oportunidade que me proporcionou, compreensão com minha rotina de trabalho e toda dedicação durante o processo de realização deste trabalho.

Aos meus pais, José Roberto e Angela, por todo o amor que me deram, além da educação, ensinamentos, apoio e suporte com meus filhos Enzo e Sofia.

Ao Sr. Aluizio, Beatriz e William que me apoiaram desde o início, sempre dispostos a cuidar das crianças com muito amor, enquanto eu me ausentava.

Aos meus familiares e amigos, pela compreensão e apoio durante a jornada.

À amiga Marcelly Soeiro que me ajudou em muitos momentos, cuidando de mim com seu dom na acupuntura, com sua companhia e amizade nas horas de laser, e também com correções de formatação me deixando muito orgulhosa em ver a aluna superando a professora.

À amiga Ticiania Escrobat que embarcou nessa comigo e me auxiliou em todo caminho com muitas idas à Diadema e à USP, muitas esfihas e boa alimentação, muitas farras nas horas de folga, além é claro de muita ajuda nos experimentos também.

À amiga Melina Kubota que me auxiliou em muitos experimentos, pois sem você não teria terminado a tempo. Além de também ter embarcado muitas vezes para USP e para Diadema, e ajudando na padronização de todos os protocolos minuciosos.

À professora Debora Estadella que gentilmente emprestou seu laboratório em Santos e sua aluna Melina para que eu pudesse dar andamento nos experimentos no período de mudança do nosso laboratório.

À professora Ana Cristina Faloppa que gentilmente se disponibilizou a me auxiliar em experimentos e contribuiu bastante nos esclarecimentos de dúvidas.

Às professoras Luciana Caperuto e Mônica Telles que abriram as portas dos seus laboratórios para que pudéssemos fazer parte dos experimentos.

Aos amigos do laboratório de Diadema, Fernanda Roncon, Nathalia Pinheiro, Sérgio Tomari, Rafael Cossi, Marcia Bittencourt, Renan Gaiardo, Myrcea Tilger e todos os demais pela paciência e pelos ensinamentos.

Aos amigos do laboratório de Santos, Tatiane, Stheffany, Nathalia, Aline, Laís, Ana Carol, Moisés, Beth, Flávia e todos os demais pelo auxílio em muitos experimentos.

E enfim, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, seja de forma direta ou indireta, fica registrado aqui, o meu muito obrigada!

“Hoje é por isso que agradeço ao céu  
A felicidade!”  
*Roberta Campos e Danilo Oliveira*

## RESUMO

O sistema colinérgico anti-inflamatório tem sido estudado em diversas doenças e já foi demonstrado que alterações nesta via pioram a inflamação do organismo. A deficiência colinérgica causada pela redução na expressão da proteína transportadora vesicular da acetilcolina (VACHT), responsável pelo transporte da acetilcolina (ACh) para dentro das vesículas, está intimamente relacionada à redução da liberação de ACh. Nosso grupo demonstrou recentemente que animais com redução de VACHT apresentaram inflamação pulmonar em camundongos com 3 meses de vida. Entretanto, pouco se sabe dos efeitos da deficiência colinérgica em longo prazo em animais com 12 meses, idade correspondente ao início da senilidade e que sabidamente pode haver maior injúria pulmonar. **Objetivo:** Comparar a inflamação pulmonar induzida pela redução VACHT em animais com 3 meses e 12 meses de idade. **Materiais e Método:** Foram utilizadas fêmeas com 3 e 12 meses de idade selvagens ou mutantes para VACHT. Os animais foram pesados e submetidos ao *Wire Hang* teste. Após anestesia, o lavado broncoalveolar (LBA) foi retirado para quantificação de células e de citocinas. Em seguida, o sangue, pulmão, baço, timo e útero foram coletados para análises posteriores. Ainda foram quantificadas células na medula óssea e os níveis de citocinas no baço, além do nível de estrógeno no sangue e de nitrito e nitrato no pulmão. Os dados foram analisados estatisticamente pelo programa Sigma Stat e considerado significativo um  $p < 0,05$ . **Resultados:** Todos os animais com redução de VACHT tiveram redução do tempo de sustentação na grade ( $P < 0,001$ ) e da massa corpórea ( $P < 0,01$ ) em relação aos seus controles selvagens. Ainda, os animais selvagens com 12 meses tiveram redução no tempo de sustentação na grade em relação aos selvagens com 3 meses ( $P \leq 0,001$ ). Animais mutante apresentaram uma diminuição das células totais na medula óssea ( $P < 0,05$ ), aumento no número de células totais no LBA ( $P < 0,05$ ), e de eosinófilos ( $P < 0,05$ ), além do aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e IL-1 $\beta$  ( $P < 0,01$ ) e deposição de fibras colágenas em 3 meses comparado aos animais selvagens de mesma idade. Aos 12 meses, as células no pulmão e as citocinas foram reduzidas nos mutantes ( $P < 0,05$ ) e não houve alteração da deposição de fibras colágenas no pulmão em relação ao observado nos mutantes de 3 meses. A porcentagem de massa do timo estava reduzida apenas nos animais mutante com 12 meses em relação ao selvagem com 3 meses ( $P < 0,05$ ) e não houve diferença na massa do baço entre os grupos. Entretanto, aos 3 meses, os mutantes apresentam aumento de IL-1b, IL-8 e TNF- $\alpha$ , resposta que não foi observada aos 12 meses. Nos animais de 12 meses tanto selvagens quanto mutante houve redução da porcentagem de massa do útero ( $P < 0,05$ ), sem, no entanto alterar os níveis de estrógeno no sangue. Por fim, aos 3 meses há aumento de nitrito/nitrato no pulmão dos animais mutantes, fato que não foi observado aos 12 meses. **Conclusão:** Nossos dados demonstraram que o sistema colinérgico modula a inflamação pulmonar em animais jovens. Embora os animais com deficiência de VACHT mantenham o fenótipo a longo prazo, a inflamação e o estresse oxidativo no pulmão parece ser controlada ao longo do tempo. Os exatos mecanismos desta adaptação ainda não foram totalmente elucidados, mas parece não haver relação com os níveis de estrógeno.

**Palavras-chave:** Sistema Colinérgico Anti-inflamatório. Inflamação Pulmonar. Camundongo Fêmea. Camundongo Idoso. Imunosenescência.

## ABSTRACT

The cholinergic anti-inflammatory system has been studied in several diseases and has been shown to break in this way worsen the inflammation of the organism. A cholinergic deficiency caused by the reduction in the expression of the acetylcholine vesicular carrier protein (VAcHT), responsible for the transport of acetylcholine (ACh) into the vesicles, is closely related to the reduction of ACh release. Our group recently demonstrated that animals with VAcHT reduction had pulmonary inflammation in mice at 3 months of age. For more than 12 months, the age corresponding to the onset of senility and that there is a greater possibility of pulmonary injury. **Objective:** compare pulmonary inflammation induced by VAcHT reduction in animals at 3 months and 12 months of age. **Materials and Methods:** They were allowed with 3 and 12 months old wild or mutants for VAcHT. The animals were weighed and subjected to the Wire Hang test. After anesthesia, bronchoalveolar lavage (BAL) was removed for quantification of cells and cytokines. Empu, blood, lung, spleen, thymus and uterus were collected for further analysis. Cells were also quantified in the bone marrow and cytokine levels in the spleen, in addition to the level of estrogen in the blood and nitrite and nitrate in the lung. The data were statistically analyzed by the Sigma Statistics program and significant material for a  $<0.05$ . **Results:** All animals with VAcHT reduction had a reduction in their class time ( $P < 0.001$ ) and body mass ( $P < 0.01$ ) in relation to their wild-type controls. Still, the wild animals with 12 months had a reduction in the time of support in the note in relation to the wild ones with 3 months ( $P \leq 0.001$ ). The mutant animals showed a decrease in total cells in the bone marrow ( $P < 0.05$ ), increased total number of cells without BAL ( $P < 0.05$ ), and eosinophils ( $P < 0.05$ ). levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 and IL-1 $\beta$  ( $P < 0.01$ ) and collagen fiber deposition at 3 months compared to wild animals of the same age. At 12 months, as non-lung cells and cytokines as reductions in mutants ( $P < 0.05$ ) and there is no change in collagen fiber deposition in the lung compared to that observed in 3-month mutants. A percentage of thymus mass was reduced only in mutant animals at 12 months versus wild at 3 months ( $P < 0.05$ ) and there was no difference in spleen mass between groups. However, at 3 months, the mutants increased IL-1b, IL-8 and TNF- $\square$ , a response that was not observed at 12 months. In both wild and mutant 12 month animals, reduction of the uterine mass percentage ( $P < 0.05$ ), without, however, the levels of estrogen in the blood. Finally, at 3 months there was an increase in non-lung nitrite / nitrate of the mutant animals, a fact that was not observed at 12 months. **Conclusion:** Our data demonstrate that the cholinergic system modulates pulmonary inflammation in young animals. Although VAcHT-deficient animals maintain the phenotype over the long term, inflammation and oxidative stress in the lung appear to be controlled over time. The exact mechanisms of this adaptation have not yet been fully elucidated, but there seems to be no relation to estrogen levels.

**Keywords:** Cholinergic Anti-inflammatory System. Pulmonary Inflammation. Female Mouse. Old Mouse. Immunosenescence.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Senescência Replicativa.....	15
Figura 2: Síntese de Acetilcolina.....	20
Figura 3: Sistema Colinérgico Anti-inflamatório - Reflexo inflamatório.....	22
Figura 4: Teste de Força de Agarre dos Camundongos Fêmeas.....	33
Figura 5: Massa Corporal dos Camundongos Fêmeas.....	34
Figura 6: Células Totais na Medula Óssea dos Camundongos Fêmeas.....	35
Figura 7: Valores de Células Totais no LBA dos Camundongos Fêmeas.....	36
Figura 8: Contagem Diferencial de Células no LBA dos Camundongos Fêmeas.....	36
Figura 9: Citocinas no LBA dos Camundongos Fêmeas.....	37
Figura 10: Remodelamento do Parênquima Pulmonar.....	38
Figura 11: Massa de Órgãos Linfóides dos Camundongos Fêmeas.....	39
Figura 12: Citocinas no Homogenato do Baço dos Camundongos Fêmeas.....	40
Figura 13: Níveis de Nitritos e Nitratos no Homogenato Pulmonar.....	40
Figura 14: Massa do Útero e Níveis de Estradiol Plasmático.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha 7$ nAChR:	receptor nuclear de ACh da classe nicotínica e subtipo $\alpha 7$
ACh:	Acetilcolina
AChE:	Acetilcolinesterase
ANOVA:	Análise de Variância
BSA:	Albumina de soro bovino
cGMP:	Monofosfato cíclico de guanosina
ChAT:	Colina-Acetiltransferase
CHT:	Transportador de alta afinidade de Colina
cNOS:	Óxido nítrico sintase constitutiva
DMN:	Núcleo motor dorsal
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DPOC:	Doenças Pulmonares Obstrutivas Crônicas
ELISA:	Do inglês <i>Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay</i> (Imunoensaio enzimático)
eNOS:	Óxido nítrico sintase endotelial
EROs:	Espécies reativas de oxigênio
FAD:	Flavina adenina dinucleotídeo
FMUSP:	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
H&E:	Hematoxilina e Eosina
IFN- $\gamma$ :	Interferon gama
IL:	Interleucina
iNOS:	Óxido nítrico sintase induzida
i.p.:	Intraperitoneal
KD-3m:	Animais com deficiência de VAcHT com 3 meses de idade
KD-12m:	Animais com deficiência de VAcHT com 12 meses de idade
LBA:	Lavado Broncoalveolar
LDH:	Lactato desidrogenase
LPS:	Lipopolissacarídeo
mAChR :	Receptores muscarínicos
MCP:	Proteína quimioatratadora de monócitos
MMPs:	Metaloproteinases de matriz
nAChR:	Receptores nicotínicos

NADPH:	Fosfato dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NaNO <sub>2</sub> :	Nitrito de sódio
nNOS:	Óxido nítrico sintase neuronal
NF-κB:	Fator de transcrição nuclear do tipo κB
NO:	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub> :	Nitrito
NO <sub>3</sub> :	Nitrato
NOS:	Óxido nítrico sintase
NTS:	Núcleo do Trato Solitário
O <sub>2</sub> :	Oxigênio
OCT:	Do inglês Polyspecific organic cation transportes (transportador catiônico)
rpm:	Rotação por minutos
SCAI:	Sistema Colinérgico Anti-inflamatório
SNA:	Sistema Nervoso Autônomo
SNC:	Sistema Nervoso Central
TMB:	Tetrametilbenzidina
TNF:	Fator de necrose Tumoral
UNIFESP:	Universidade Federal de São Paulo
VACHT:	Proteína transportadora vesicular da acetilcolina
VACHT-KD:	Animais com deficiência de VACHT
WT:	Do inglês wild-type (animais selvagens)
WT3-m:	Animais selvagens com 3 meses de idade
WT12-m:	Animais selvagens com 12 meses de idade

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	14
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	15
2.1. Envelhecimento	15
2.2. Inflamação Pulmonar	17
2.3. Sistema Colinérgico Anti-Inflamatório (SCAI) e sua relação com Sistema Respiratório	20
<b>3. OBJETIVOS</b>	26
3.1. Objetivo Geral	26
3.2. Objetivos Específicos	26
<b>4. MATERIAIS E MÉTODO</b>	27
4.1. Genotipagem	27
4.2. Grupos Experimentais	27
4.3. Teste de Força de Agarre	28
4.4. Coleta e Análise de Sangue Periférico	28
4.4.1. Dosagem de Estradiol Plasmático	28
4.5. Contagem de Células Totais na Medula	29
4.6. Coleta e Análise do Lavado Broncoalveolar (LBA)	29
4.6.1. Análise de Citocinas no LBA	29
4.7. Coleta de Órgãos Linfóides (Timo e Baço)	30
4.7.1. Análise de Citocinas no Baço	30
4.8. Coleta e Análise do Pulmão	32
4.8.1. Estudo Morfométrico	32
4.8.2. Dosagem de Nitritos e Nitratos no Homogenato Pulmonar	33
4.9. Esfregaço Vaginal e Coleta do Útero	33
4.10. Forma de Análise dos Resultados	33
<b>5. RESULTADOS</b>	34
5.1. Teste de Força de Agarre	34
5.2. Massa Corporal	34
5.3. Células na Medula Óssea	35
5.4. Lavado Broncoalveolar (LBA)	36
5.4.1. Citocinas no Lavado Broncoalveolar (LBA)	38
5.5. Estudo Morfométrico	38
5.6. Massa de Órgãos Linfóides	39
5.6.1. Citocinas no Baço	40
5.7. Dosagem de Nitritos e Nitratos no Homogenato Pulmonar	41
5.8. Ciclo Estral, Massa do Útero e Dosagem de Estradiol Sanguíneo	42
<b>6. DISCUSSÃO</b>	44
<b>7. CONCLUSÃO</b>	49
<b>REFERÊNCIAS</b>	50

## 1 INTRODUÇÃO

O desequilíbrio homeostático pode ser causado por diminuição da resposta em situações de estresse, característica presente na definição de envelhecimento (WEINERT; TIMIRAS, 2003). A senescência celular, termo amplamente utilizado em ciências biológicas e da saúde, pode ser definida como a diminuição da capacidade de mitose até o ponto em que a mesma cessa e então a célula entra em degeneração (HAYFLIC, 1965). Esse mecanismo pode ser induzido por diversos fatores como alterações no mecanismo interno e estímulos externos ambientais (HARMAN, 1981; MEINERS, EICKELBERG, KÖNIGSHOFF, 2015; WEINERT, TIMIRAS, 2003).

O pulmão é um órgão muito vulnerável aos estímulos ambientais, devido ao seu contato com o meio externo, o que pode levar a alterações estruturais e funcionais (MEINERS, EICKELBERG, KÖNIGSHOFF, 2015), contribuindo para o desenvolvimento de doenças pulmonares diversas (REUTER ET AL., 2010; ZHOU, *et al.*, 2013).

O sistema colinérgico anti-inflamatório (SCAI) é uma via que compreende o nervo vago eferente, o neurotransmissor acetilcolina (ACh) e seu receptor nuclear da classe nicotínica, subtipo  $\alpha 7$  ( $\alpha 7nAChR$ ) (PAVLOV; TRACEY, 2005; YANG *et al.*, 2014, SHARMA, HANANIA, SHIM, 2009; SU, MATTHAY, MALIK, 2010). Esse sistema controla o excesso de citocinas pró-inflamatórias, evitando o desenvolvimento de patologias como as sepses, as doenças autoimunes e outras semelhantes (PAVLOV; TRACEY, 2005).

Nosso grupo demonstrou recentemente que animais machos com deficiência colinérgica por redução da vesícula transportadora de acetilcolina (VAChT) apresentam aumento da inflamação pulmonar com remodelamento da matriz extracelular e piora da função pulmonar, sugerindo que o sistema colinérgico anti-inflamatório é um regulador da homeostasia pulmonar. Desta forma, é de grande importância continuar as investigações de mecanismos que esclareçam o papel do SCAI no pulmão.

**Justificativa e hipótese:** Assim, tentaremos esclarecer se a piora da inflamação induzida por deficiência colinérgica é semelhante em fêmeas e se esta evolui progressivamente no animal senil de forma mais grave que o animal selvagem ou se essa progressão se estabiliza em certo momento equiparando-se aos níveis inflamatórios normais da senilidade.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

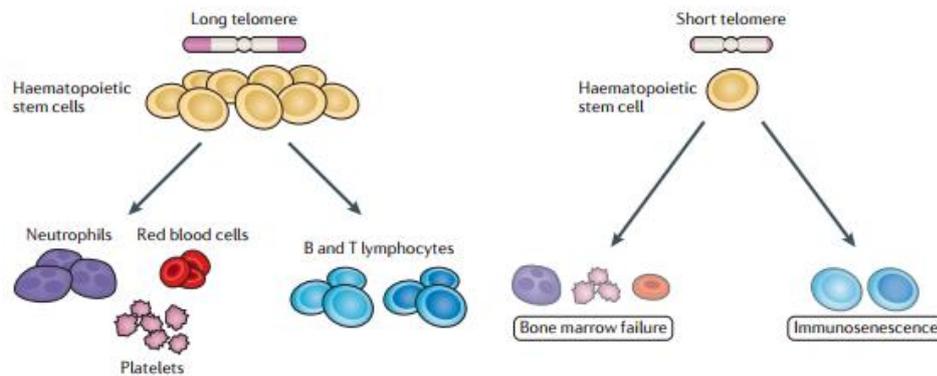
### 2.1. Envelhecimento

Envelhecer, segundo o dicionário Michaelis (2017), significa tornar-se velho, avançado em idade, em desuso. É uma palavra originada do latim (velho = vetulum) que originou o termo envelhecimento, ato ou efeito de envelhecer. Já senescência, palavra amplamente utilizada nas literaturas de saúde, também deriva do latim, correspondendo a uma qualidade de senescente, que em biologia representa o processo de envelhecimento em indivíduos maduros.

Trazendo para o entendimento biológico, o envelhecimento, segundo Weinert e Timiras (2003), representa a diminuição na resposta frente a situações de estresse, com aumento do desequilíbrio da homeostasia, assim como o aumento na incidência de patologias, sendo que sua principal consequência será a morte. Esses autores ainda ressaltam que se trata de um complexo processo multifatorial que ocorre no organismo com interações simultâneas entre os vários níveis funcionais de organização.

Em meados dos anos 60, Hayflic (1965), desenvolveu a teoria da senescência celular através de experimentos com cultura de células humanas, observando que em menos de um ano essas células diminuem progressivamente sua capacidade de mitose até o ponto de cessar e degenerar-se. Á partir daí, deu-se início a diversas pesquisas sobre replicação celular e senescência, e senescência induzida por estresse, descritas na revisão de Weinert e Timiras (2003) como distintas, onde a replicativa provém do encurtamento dos telômeros a cada replicação celular o que resulta em telômeros cada vez mais curtos, e a induzida por estresse é resultante de uma variedade de estressores, incluindo dano ao nível do DNA (ácido desoxirribonucleico), modificações estruturais nos cromossomos, além de aumento de expressão de genes relacionados ao surgimento de tumores.

Atualmente a senescência celular é caracterizada como um processo que envolve o encurtamento de telômeros (estrutura protetora presente na extremidade dos cromossomos – figura 1) e a consequente parada de replicação das células, fato que ocorre em consequência à proliferação celular (chamada de senescência replicativa) ou induzido por estresse em um processo inflamatório, por exemplo. Neste último caso, há presença de várias substâncias como citocinas, fatores de crescimento, metaloproteinases de matriz (MMPs), dentre outras (MACIEL-BARÓN *et al.*, 2016; MEINERS, EICKELBERG, KÖNIGSHOFF, 2015).



**Figura 1. Senescência Replicativa.** A figura demonstra a diferença entre um telômero jovem e um na senescência, alterando as células medulares e a imunidade (Adaptado de ARMANIOS, BLACKBURN, 2012).

O processo de envelhecimento pode, também, ser caracterizado pelo contínuo comprometimento da função de tecidos e órgãos, além do organismo como um todo, o que propicia um aumento na vulnerabilidade frente aos diversos estímulos ambientais e, conseqüentemente, um maior risco ao desenvolvimento de doenças e, posteriormente, levando a morte (HARMAN, 1981; MEINERS, EICKELBERG, KÖNIGSHOFF, 2015; WEINERT, TIMIRAS, 2003).

Por estar constantemente exposto ao ambiente externo, o pulmão é um órgão susceptível aos impactos ambientais, como a fumaça de cigarro, exposições a bactérias ou patógenos virais, entre muitos outros, que podem interferir em sua estrutura e função (MEINERS, EICKELBERG, KÖNIGSHOFF, 2015), sendo que o aumento do estresse oxidativo e da inflamação, conseqüentes a essas agressões, contribuem diminuindo a defesa e propiciando o desenvolvimento de doenças como, por exemplo, Doenças Pulmonares Obstrutivas Crônicas (DPOC) (REUTER ET AL., 2010; ZHOU, *et al.*, 2013). As células imunes pulmonares, como os macrófagos alveolares, neutrófilos e as células dendríticas residentes no pulmão, normalmente conseguem neutralizar e/ou eliminar essas partículas estressoras pela capacidade de fagocitose e reparação de células estruturais, tais como células epiteliais brônquicas ou alveolares (MEINERS, EICKELBERG, KÖNIGSHOFF, 2015). Porém, quando essas células imunes não conseguem realizar sua função adequadamente, toda a defesa pulmonar pode estar comprometida.

Segundo Golec *et al.*, (2017) animais em meia-idade (18 meses) já apresentam declínio de algumas funções pulmonares, demonstrando características semelhantes à função pulmonar de um animal idoso. Em estudos sobre envelhecimento pulmonar em camundongos, a redução das fibras elásticas e o aumento das fibras colágenas são bem descritos como fatores correlacionados ao desenvolvimento de fibrose pulmonar e senilidade (HUANG *et al.*, 2007b). No envelhecimento muitas funções são debilitadas, como por exemplo, a resistência a infecções, devido à diminuição tendencial da massa do timo e das células T que são produzidas por ele (SHARMA, HANANIA, SHIM, 2009).

Ao que percebemos todos esses indutores de estresse que ocorrem no pulmão podem favorecer o envelhecimento, sendo, a inflamação pulmonar uma das características mais citadas dentre os autores.

## **2.2. Inflamação Pulmonar**

No Brasil, a maior população acometida por doenças respiratórias refere-se às crianças e idosos, sendo o índice de internação por problemas respiratórios contemplando cerca de 13% dos indivíduos acima de 65 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE - BR, 2017). Dessa forma se observa a importância do esclarecimento das doenças relacionadas ao sistema respiratório para que se desenvolvam medidas de prevenção e tratamento adequadas.

Frente a uma agressão tecidual ou a uma invasão patogênica o organismo responde iniciando um processo inflamatório com a finalidade de reverter essa lesão e reestabelecer a homeostase (BOSCÁ, *et al.*, 2005; ROSAS-BALLINA; TRACEY, 2009). Para tanto, esse processo se inicia com o estímulo às células do sistema imune, entre elas os macrófagos, que sintetizam e liberam substâncias pró-inflamatórias como, por exemplo, o fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, entre outras), óxido nítrico (NO) e prostaglandinas (BOSCÁ, *et al.*, 2005; PAVLOV; TRACEY, 2005). Frente a liberação dessas substâncias o sistema imunológico é ativado, atraindo mais células de defesa, sendo os neutrófilos uma das primeiras células a chegar ao local da injúria, estimulando o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e proteases, que podem, além de defender, levar a danos no tecido (BOSCÁ, *et al.*, 2005; KOMORI, *et al.*, 2003). Ao mesmo tempo em que estas substâncias são necessárias para conter o processo inflamatório, se as mesmas não forem controladas, podem desencadear respostas anormais, podendo ocasionar lesão secundária local.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina mediadora de inflamação local e sistêmica, secretada por macrófagos em resposta a um estímulo de patógenos ou lesão de outra natureza. Entretanto a liberação excessiva de TNF- $\alpha$  pode causar inflamação (CATAL *et al.*, 2014). Outro papel do TNF- $\alpha$  é a indução da liberação de outras citocinas pró-inflamatórias como a Interleucina 1 (IL-1), e outros mediadores, como o NO, que perpetuam a inflamação (TRACEY, 2002; WANG *et al.*, 1999). Existem dois subtipos de interleucina 1, a IL-1 $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , que também atuam em processos inflamatórios ativando a produção de outras citocinas, além de promover a liberação de  $\beta$ -endorfina, que atuam na percepção de dor. A interleucina 6 é produzida sob indução da TNF $\alpha$  e IL-1 à partir de células como monócitos e linfócitos, sendo possível detectá-la cerca de 10 dias após uma injúria tecidual. Dentre uma série de efeitos biológicos, a IL-6 é responsável por ativação da coagulação e de neutrófilos. Podendo ser sintetizada por monócitos e células endoteliais a partir de estímulos da TNF $\alpha$  e IL-1, a interleucina 8 é uma quimiocina que tem como característica ativar e atrair neutrófilos para o local da inflamação. Já a interleucina 10 tem a capacidade de suprimir a ativação de macrófagos, suprimindo assim a síntese de citocinas pró-inflamatórias, desta forma, é descrita na literatura como uma citocina anti-inflamatória, importante no processo de controle inflamatório (BLACKWELL, CHRISTMAN, 1996; JOHNSTON, WEBSTER, 2009).

A literatura descreve o NO como uma molécula estável de baixo peso molecular, apresentada em forma de gás, com ação citotóxica e vasodilatadora. De acordo com o estímulo e o tipo de célula sintetizadora, pode modular respostas inflamatórias ou anti-inflamatórias (MONCADA, PALMER, HIGGS, 1991; ADAMS, 1996).

Em células endoteliais, a síntese do NO ocorre quando a L-arginina se une a uma molécula de O<sub>2</sub>, gerando um processo de catalisação através das enzimas óxido nítrico-sintase constitutivas (cNOS) divididas em: enzima óxido nítrico-sintase neuronal (nNOS) e a enzima óxido nítrico-sintase epitelial (eNOS) (MONCADA, PALMER, HIGGS, 1991). Quando o NO atravessa o endotélio em direção a musculatura lisa do vaso, através de reações químicas irá produzir, a nível intracelular, o monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), induzindo ao relaxamento das fibras musculares culminando na vasodilatação (MONCADA, PALMER, HIGGS, 1991; ADAMS, 1996). A produção de NO, via enzima óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) está associada, na literatura, a reações pró-inflamatórias, de forma que ao invés de

auxiliar no controle anti-inflamatório, contribuem com a inflamação (MCCALL, PALMER, MONCADA, 1991).

Na presença de oxigênio (O<sub>2</sub>) o NO, tem meia-vida curta, sendo rapidamente oxidado em nitrito (NO<sub>2</sub>) e nitrato (NO<sub>3</sub>) (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; MARLETTA, 1993). Existem várias funções relatadas para a molécula de NO, como a vasodilatação citada anteriormente, a citotoxicidade mediada por macrófagos, a inibição da agregação plaquetária, a indução de vasodilatação do corpo cavernoso peniano, a atuação na regulação da pressão sanguínea, além de poder potencializar a transmissão sináptica, dentre outras funções. Porém, o NO quando produzido a partir da iNOS, deixa de ser benéfico e passa a ser considerado um marcador pró-inflamatório (KLINGER, KADOWITZ, 2017).

Prado *et al.*, (2005, 2006b) demonstraram que a inibição da produção do NO piora a inflamação pulmonar, entretanto quando ocorre a inibição específica da isoforma induzida, há melhora da inflamação, do remodelamento e da hiperresponsividade em modelo de asma experimental.

A origem das inflamações pulmonares também foi investigada à nível dos hormônios sexuais, pela diferença encontrada em indivíduos de gêneros diferentes com as mesmas patologias (DEBLEY; REDDING; CRITCHLOW, 2004; GUERRA *et al.*, 2004).

Os hormônios ovarianos são apontados na literatura como fatores de desempenho duplo na inflamação pulmonar, podendo agir como pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios dependendo se o agente inflamatório for de origem alérgica ou não-alérgica (LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, *et al.*, 2013; RIFFO-VASQUEZ, *et al.*, 2007).

A progesterona é descrita como potencializadora em processos alérgicos pulmonares, através do aumento da produção da citocina IL-5, como observado por Lino-dos-Santos-Franco, *et al.*, (2013). Já o estradiol, apesar de ser apontado como potencializador da inflamação, também é descrito desempenhando um papel protetor, em reações inflamatórias pulmonares de origem alérgica (LIGEIRO-DE-OLIVEIRA, *et al.*, 2004). Dessa forma, o entende-se que os hormônios sexuais podem ter papel importante na inflamação pulmonar, não podendo ser negligenciados no processo de elucidação.

Portanto, se faz necessário um controle anti-inflamatório, onde o sistema nervoso autônomo (SNA) atua exercendo papel fundamental, em conjunto com o sistema humoral (OLOFSSON, *et al.*, 2012; PAVLOV; TRACEY, 2005; ROSAS-BALLINA; TRACEY,

2009). Alterações nestes controles podem comprometer a resposta do organismo frente a injúria e a resposta inflamatória, prejudicando a capacidade do organismo em suprimir as citocinas pró-inflamatórias. É fato que durante o envelhecimento um aumento inespecífico de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, é observado, proporcionando efeitos maléficos sobre a saúde (SHARMA, HANANIA, SHIM, 2009).

### **2.3. Sistema Colinérgico Anti-Inflamatório (SCAI) e sua relação com Sistema Respiratório**

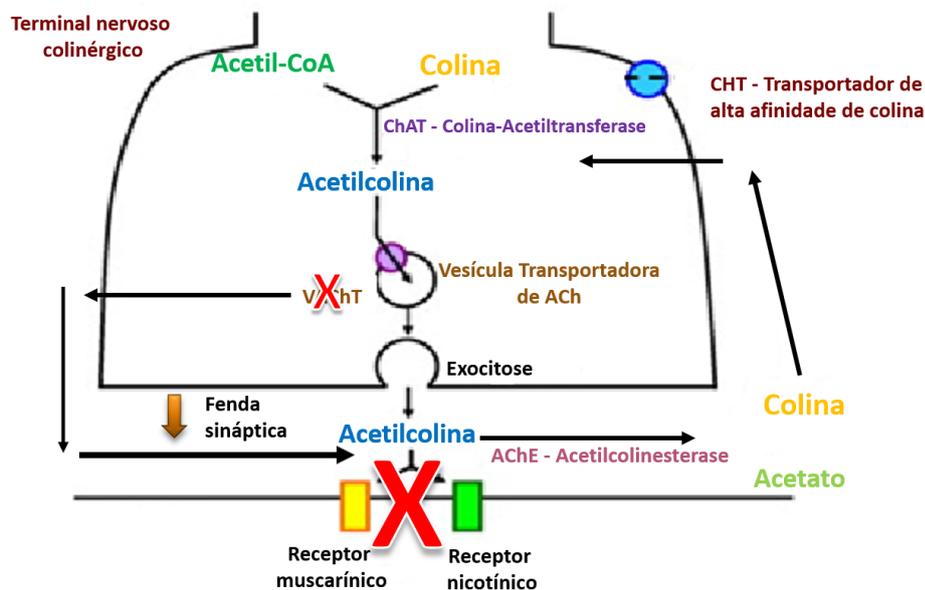
O controle da produção de citocinas pelo sistema imune inato é um processo complexo que depende, por exemplo, da interação da ACh com macrófagos. Esta via, denominada sistema colinérgico anti-inflamatório (SCAI), é composta pelo nervo vago eferente que libera o neurotransmissor ACh e pelo receptor nuclear de ACh da classe nicotínica e subtipo  $\alpha 7$  ( $\alpha 7nAChR$ ), que em conjunto controlam o excesso de citocinas pró-inflamatórias (PAVLOV; TRACEY, 2005; YANG *et al.*, 2014, SHARMA, HANANIA, SHIM, 2009; SU, MATTHAY, MALIK, 2010), fato importante para evitar o surgimento de patologias como sepse, doenças autoimunes, entre outras (PAVLOV; TRACEY, 2005).

A função pulmonar é determinada pelo bom funcionamento do trato respiratório superior e do parênquima pulmonar. Em uma situação de acometimento de uma dessas áreas por patologias comuns na sociedade, como a asma, pneumonia, bronquite crônica ou enfisema pulmonar, importantes respostas inflamatórias serão iniciadas, decorrentes de múltiplos agentes pró-inflamatórios liberados (ANGELI *et al.*, 2008; GANESAN *et al.*, 2010; KHURANA, 2013).

Essas respostas inflamatórias acarretam, muitas vezes, mudanças na estrutura tanto de vias aéreas proximais quanto de vias aéreas distais. Dentre as principais alterações estruturais que ocorrem no pulmão estão alterações da matriz extracelular como deposição de colágeno, perda da elastância pulmonar e aumento da secreção de muco (PRADO *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2011; ZHOU-SUCKOW, DUERR, HAGNER, 2017), que podem ocorrer em diversas doenças.

Um dos maiores reguladores da função pulmonar é a ACh, pois ela desempenha um forte papel broncoconstritor e estimulador da secreção de muco, além de estar relacionada com o remodelamento das vias aéreas e imunomodulação (KUMMER; LIPS; PFEIL, 2008).

A ACh é um neurotransmissor com efeito biológico importante no Sistema Nervoso Central (SNC), assim como no periférico e entérico. É sintetizada no citoplasma de neurônios da via colinérgica, através da reação da Colina com a Acetil coenzima A, catalisada pela enzima Colina-Acetiltransferase (ChAT). Depois de produzida, a mesma é transportada até a sinapse em vesículas transportadoras de acetilcolina (VACHT) (ABREU-VILLAÇA; FILGUEIRAS; MANHÃES, 2011; ELWARY, 2006; KUMMER; KRASTEVA-CHRIST, 2014; VAROQUI; ERICKSON, 1996), e a quantidade liberada de ACh é dependente da presença de VACHT (LIMA *et al.*, 2010) como ilustrado na figura 2.



**Figura 2. Síntese de Acetilcolina.** Ilustração da síntese de ACh no citoplasma de neurônio da via colinérgica, através da reação da Colina com a Acetil coenzima A, catalisada pela enzima Colina-Acetiltransferase (ChAT). Observa-se a vesícula transportadora de ACh (VACHT) responsável por conduzir a mesma até a fenda sináptica, a Acetilcolinesterase (AChE) que degrada a ACh em acetato e colina que será transportada novamente para o neurônio pré-sináptico pelo transportador de alta afinidade de colina (CHT). Na imagem observamos também que a redução de VACHT está intimamente associada a redução da liberação de ACh na fenda sináptica. (Adaptado de GWILT *et al.*, 2007).

Uma vez liberada, a ACh pode ligar-se a dois tipos de receptores pós-sinápticos, os receptores nicotínicos (nAChR) e os receptores muscarínicos (mAChR). Os receptores nicotínicos também podem ser encontrados nas membranas pré-sinápticas. À medida que a

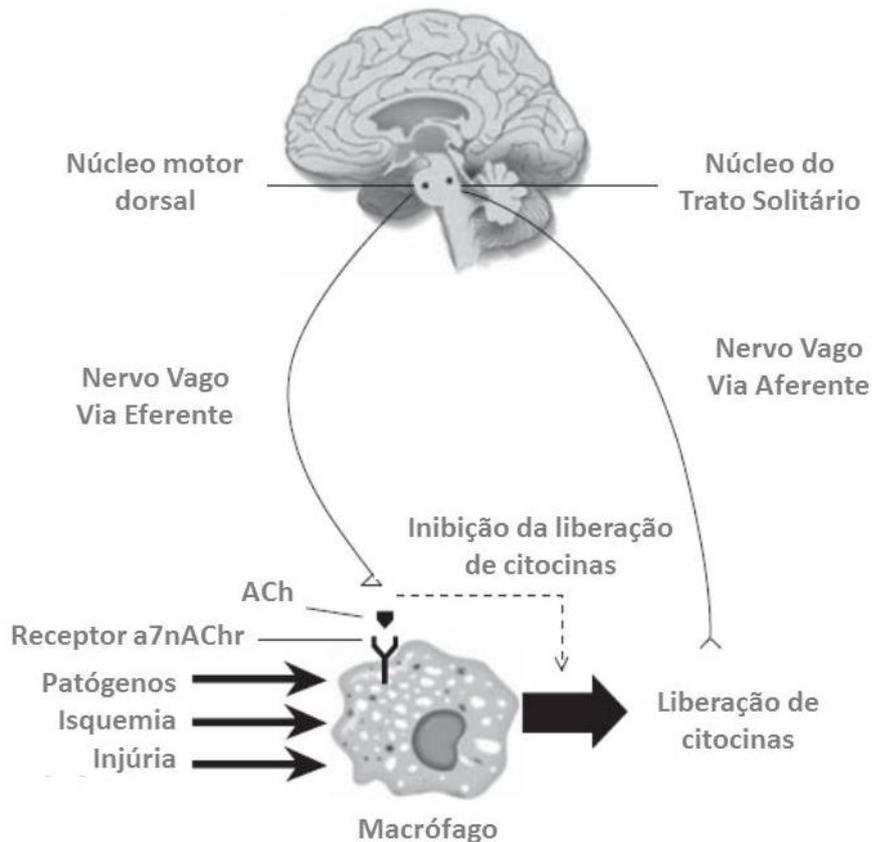
ACh é liberada e se liga aos seus receptores, ocorre também a hidrólise da mesma pela acetilcolinesterase (AChE), que quebra a molécula em acetato e colina. Esse processo ocorre para o reaproveitamento da colina hidrolisada pela célula pré-sináptica para a produção de nova ACh. O transportador de alta afinidade de colina (CHT) devolve a colina hidrolisada para a célula pré-sináptica para que ocorra esse reaproveitamento (ABREU-VILLAÇA, FILGUEIRAS, MANHÃES, 2011).

No começo do século, alguns artigos de revisão mostraram que existia uma resposta neural à inflamação local e sistêmica, promovendo um efeito anti-inflamatório, no qual a liberação da ACh era o principal fator para a diminuição da atividade de macrófagos e a liberação de citocinas. Isso estava intimamente ligado também à ação do nervo vago, onde a estimulação elétrica e farmacológica do mesmo promovia efeitos anti-inflamatórios (TRACEY, 2002; PAVLOV; TRACEY, 2005). Desta forma, mostrou-se que a ACh era o principal mediador da via colinérgica anti-inflamatória (Figura 1).

O nervo vago é o principal responsável pela liberação da ACh no pulmão. O nervo é o décimo par craniano, e possui fibras aferentes sensitivas e eferentes motoras. Inerva todo o pulmão, estando mais presente nos bronquíolos terminais e alvéolos, e tem receptores sensitivos a estímulos mecânicos, químicos e biológicos (FOX; BULL; GUZ, 1980). Todos esses receptores podem receber sinais de ativação pró-inflamatórios por citocinas, que são secretadas por macrófagos alveolares, neutrófilos e monócitos. A estimulação desses receptores pode ativar a liberação de ACh via sistema nervoso central, que pode estimular células epiteliais e neuroendócrinas a produzirem ACh, e esta teria efeito anti-inflamatório no pulmão (KUMMER; KRASTEVA-CHRIST, 2014; YANG et al., 2014).

O baço tem um importante papel na mediação da ação anti-inflamatória do nervo vago. A ACh é liberada após a ação do nervo vago nas terminações nervosas esplênicas, que promove a liberação de noraepinefrina que ativa receptores  $\beta_2$  adrenérgicos nos linfócitos T do baço. A ação da ACh produzida por esses linfócitos T, que possuem a colinaacetiltransferase, seria sobre o  $\alpha_7$ nAChR de macrófagos do baço, suprimindo a ativação do fator de transcrição nuclear do tipo kB (NF-kB) (ROSAS-BALLINA *et al.*, 2011; YANG, 2014). Corroborando estes resultados, Olofsson *et al.* (2012) estudaram ratos depletados de  $\alpha_7$ nAChR, mostrando que o transplante de medula óssea de animais selvagens (WT) para aqueles com deficiência de  $\alpha_7$ nAChR reduz a liberação de TNF- $\alpha$  após a estimulação do

nervo vago, demonstrando assim que a expressão de  $\alpha 7$ nAChR na periferia, mas não a neuronal, é necessária para a integridade do reflexo anti-inflamatório (Figura 2).



**Figura 3. Sistema Colinérgico Anti-inflamatório - Reflexo inflamatório.** Patógenos, isquemia e outras formas de lesão que induzem a resposta inflamatória resultam na liberação de citocinas pelas células do sistema imunológico que são detectadas pelo nervo vago aferente. Estas informações são transmitidas ao núcleo do trato solitário (NTS) e subsequentemente ao núcleo motor dorsal (DMN), resultando em ativação do nervo vago eferente – denominado via colinérgica anti-inflamatória. A atividade do nervo vago eferente estimula a liberação de acetilcolina que inibe a produção de citocinas por células do sistema imunológico, provavelmente via ativação de receptor nicotínico alfa 7 ( $\alpha 7$ nAChR) localizado principalmente em macrófagos, mas também em outras células do sistema imunológico (Adaptado de JOHNSTON, WEBSTER, 2009).

Recentemente, Yang *et al.* (2014) propuseram em uma elegante revisão que este sistema anti-inflamatório possa controlar a inflamação pulmonar, uma vez que a ligação da ACh ao  $\alpha 7$ nAChR impede a translocação do NF- $\kappa$ B, e portanto, a secreção de citocinas pró-inflamatórias.

A ACh também é produzida por outras células, e não somente por vias neuronais, como células epiteliais e do sistema imune, dessa forma, descrita como ACh não neuronal.

Kummer & Krasteva-Christ (2014), mostraram que células epiteliais das vias aéreas utilizam uma forma diferente de liberação de ACh comparada com neurônios. Segundo estes autores, as células epiteliais utilizam transportadores OCT1 e OCT2 (*Polyspecific organic cation transporters*) que liberam ACh direto do citoplasma celular. Entretanto, a literatura ainda é escassa neste sentido e outros autores demonstraram a presença de VAcHT no pulmão (LIPS *et al.*, 2007, PINHEIRO *et al.*, 2015). Proskocil *et al.* (2004), detectaram a presença de VAcHT e de outros componentes colinérgico nas vias aéreas em células epiteliais independente de nervos periféricos. Em conjunto estes achados sugerem que a ACh não neuronal pode ou não ser dependente de VAcHT. É importante ressaltar que em outras células não neuronais, como os cardiomiócitos, a liberação de ACh é VAcHT dependente (ROY *et al.*, 2013).

Vários estudos têm demonstrado o efeito do sistema colinérgico anti-inflamatório em situações patológicas de outros órgãos e no pulmão. Su, *et al.*, (2007), mostraram que em animais com lesão pulmonar aguda induzida localmente, o estímulo vagal provocou um aumento da expressão de  $\alpha 7nAChR$  em macrófagos e neutrófilos e reduziu a atividade de NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  e MIP-2 no pulmão. Quando realizada a vagotomia, a situação foi revertida, indicando que uma via modulatória de inflamação e imunidade pode estar presente entre o pulmão e o sistema nervoso. Nosso grupo demonstrou recentemente que a utilização do agonista do receptor nicotínico alfa-7 reduziu a resposta inflamatória pulmonar induzida por LPS (Lipopolissacarídeos) em camundongos (PINHEIRO *et al.*, 2017).

Embora o papel do sistema colinérgico venha sendo estudado em diferentes modelos de doença pulmonar, poucos avaliaram o efeito deste sistema no controle da homeostasia pulmonar. Demonstramos previamente, utilizando animais machos com deficiência colinérgica por redução genética de VAcHT que ocorre aumento da inflamação pulmonar, com edema peribrônquico e aumento de liberação de citocinas pró-inflamatórias associado ao remodelamento brônquico e piora da função pulmonar (PINHEIRO *et al.*, 2015). A redução de VAcHT induz ativação da via de NF- $\kappa$ B e redução da ativação de JAK2-STAT3-SOCS3, uma via com potencial efeito anti-inflamatório.

Uma vez compreendido que com o avançar da idade os indivíduos ficam mais susceptíveis a determinadas doenças, e que a resposta imune seja comprometida, o presente estudo visa entender se a deficiência colinérgica em longo prazo modula a inflamação

pulmonar, assim como ocorre em animais jovens. Estes resultados poderão ajudar a entender o complexo papel da acetilcolina na inflamação pulmonar.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar se a deficiência colinérgica em longo prazo modula a resposta inflamatória pulmonar em camundongos fêmeas.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

Avaliar se os animais VACHT-KD fêmeas de 3 e 12 meses apresentam mudanças em relação aos animais selvagens fêmeas de idade correspondente quanto aos parâmetros de:

- Massa corporal e de órgãos relacionados ao sistema imune
- Teste de força de agarre
- Células na medula óssea
- Resposta inflamatória no pulmão
- Estresse oxidativo no pulmão
- Produção de citocinas no baço
- Produção de estradiol sanguíneo

#### 4. MATERIAIS E MÉTODO

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da UNIFESP e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) sob o nº138/15.

Nesta pesquisa experimental foram utilizados camundongos fêmeas geneticamente modificadas da linhagem B6;129S6/SvEvTac×C57BL/6J –VChT<sup>tm1</sup>/Uni, desenvolvidas pelo grupo do Prof. Marco Antônio M. Prado (PRADO *et al.*, 2006a), e agora criados no Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob nossa responsabilidade. Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Terapêutica Experimental I da FMUSP, onde receberam alimento e água *ad libitum*, em ideais condições de temperatura, umidade e ruído. Foram utilizados animais com idade aproximada de 3 e 12 meses.

##### 4.1. Genotipagem

Os animais foram mantidos em heterozigose e, quando necessário, animais heterozigotos foram acasalados para gerar animais homozigotos. Os animais foram submetidos à genotipagem de acordo com descrição feita por Prado *et al.* (2006a), no Biotério Central da FMUSP, onde esta técnica já está padronizada.

##### 4.2. Grupos Experimentais

Os grupos experimentais foram estabelecidos conforme descrição na tabela 1.

**Tabela 1 – Grupos Experimentais.**

GRUPOS	GENOTIPAGEM	IDADE	n AMOSTRAL
WT-3m	Selvagem	3 meses	5 a 10
VChT-KD-3m	Mutante	3 meses	5 a 10
WT-12m	Selvagem	12 meses	5 a 6
VChT-KD-12m	Mutante	12 meses	5 a 10

**Tabela 1:** Demonstração dos grupos experimentais de acordo com idade e genotipagem (homozigotos para VChT – gene recessivo).

No dia do experimento todos os animais foram pesados e a massa corporal anotada para análises futuras.

[F1] Comentário: Isso já falou

### 4.3. Teste de Força de Agarre

Inicialmente nos dias das eutanásias realizamos o teste de força de agarre, conhecido como *Wire-hang* e estabelecido por Sango *et al.*, (1996), onde cada animal é colocado sobre uma grade, com a mesma afastada cerca de 20cm da bancada sobre um material acolchoado, para que o mesmo não se machuque no caso de queda. Com o animal sobre a grade, invertemos a mesma, para que ele fique pendurado e o tempo em segundos é contado até o padrão de 60s.

### 4.4. Coleta e Análise de Sangue Periférico

Os animais foram anestesiados com tiopental (80mg/Kg), onde sob efeito do anestésico, foi coletado, através da veia cava, o sangue desses animais e em seguida foram eutanasiados por exsanguinação, com a secção da veia cava. O sangue foi armazenado para posterior análise de estradiol através do método de ELISA.

#### 4.4.1. Dosagem de Estradiol Plasmático

Os níveis de estradiol no plasma foram detectados pelo método de ELISA através do Kit para detecção de estradiol da Cayman Chemical (Item N° 582251; Ann Arbor, MI, USA) segundo as recomendações do fabricante. Foram adicionados 100µl de ELISA *Buffer* nos poços de ligação inespecífica e 50µl para os poços de ligação máxima. Após a preparação da curva padrão com a solução Estradiol *Standard* em diluição seriada, foram adicionados 50µl nos 8 poços em duplicata identificados de S1 a S8. As amostras foram adicionadas em volume de 50µl em cada poço. Preparamos o Estradiol AChE *Tracer* para os poços de atividade total e brancos, sendo 50µl por poço. Por fim, foram adicionados 50µl de ELISA *Antiserum* em todos os poços com exceção do branco, atividade total, ligação inespecífica. A placa foi coberta com a fita adesiva fornecida e então incubada durante 1 hora à temperatura ambiente em um agitador orbital. Iniciou-se a sequência de aspiração e lavagem (com tampão *wash buffer*) dos poços, repetindo um total de cinco lavagens. Depois foi adicionado 200µL de *Ellmans Reagent* a cada poço e adicionado 5µl do marcador para os poços de atividade total. Recobertos com a fita adesiva, permaneceram incubados por cerca de 60 minutos protegidos da luz. Após esse período determinou-se os valores finais de absorbância através da densidade óptica de 420nm usando um leitor de microplacas.

#### 4.5. Contagem de Células Totais na Medula

Padronizamos o osso fêmur esquerdo dos animais, que foi dissecado e infundido 0,5mL de salina por 3X consecutivas (total volume 1,5mL) com o uso de uma seringa. O volume recuperado foi centrifugado a 800g, a 4°C, por 20 min. O botão celular foi ressuscitado em 200µL de salina e foram contadas as células totais na medula através da microscopia óptica com o hemocítmetro de Neubauer (400x).

#### 4.6. Coleta e Análise do Lavado Broncoalveolar (LBA)

O LBA foi coletado depois de realizada uma traqueostomia com auxílio de uma cânula traqueal, onde foi infundido 0,5mL de salina através de uma seringa, por 3X consecutivas, totalizando um volume de 1,5mL. O volume recuperado foi centrifugado (GS-6R centrifuge; Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) a 800g, a 4°C, por 20 min. O botão celular foi ressuscitado em 300µL de salina. A contagem total de células foi realizada por microscopia óptica com auxílio do hemocítmetro de Neubauer (400x) (PINHEIRO *et al.*, 2015). O sobrenadante foi congelado e armazenado em biofreezer a -80°C para posterior dosagem de proteínas.

Para a contagem diferencial, 100µL do botão celular ressuscitado do LBA foram citocentrifugados (Cytospin-3, Shandon Instruments, Sewickley, USA) a 450rpm (rotações por minuto) por 6 minutos e após seca, a lâmina foi corada pela técnica de Diff-Quick (Biochemical Sciences Inc., Swedesboro, NJ). A contagem diferencial das células foi determinada a partir do achado de pelo menos 300 leucócitos/lâmina e a diferenciação seguiu os critérios hemocitológicos para diferenciação de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos com o auxílio de um microscópio óptico com objetiva de imersão (1000X).

##### 4.6.1. Análise de Citocinas no LBA

A determinação das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e IL-1 $\beta$  no LBA, foi realizada e capturada pelo método de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Foram utilizados kits da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) e os ensaios foram feitos conforme instruções determinadas pelo fabricante. As amostras foram testadas em duplicata e uma curva padrão realizada em cada placa.

Neste método foram utilizadas placas de 96 poços, sensibilizadas com os correspondentes anticorpos de captura, onde foram deixadas com o mesmo por um período *overnight*. No dia

seguinte foi desprezada a solução contendo o anticorpo e as placas lavadas por três vezes com 150µL de solução Wash Buffer.

Após as placas estarem totalmente secas, foi realizada a etapa de bloqueio adicionando 150µL do reagente diluente e deixando por uma hora em local escuro. Foram realizadas novas lavagens e posteriormente, adicionadas às placas 50µL de amostras ou de curva padronizada e então deixadas por um período de 2 horas (h) no agitador magnético em temperatura ambiente.

Novamente as placas foram lavadas e secas, e realizou-se a etapa de incubação com os respectivos anticorpos de detecção por um novo período de 2h no agitador magnético em temperatura ambiente. Após este período, as placas foram devidamente lavadas e secas e receberam 50µL de Streptoavidina seguidas de um período de descanso por 20 minutos em local escuro. Após este período repetiu-se novamente a lavagem e secagem das placas que então receberam 100µL de tetrametilbenzidina (TMB) um reagente para revelação, sendo deixadas descansando em ambiente escuro pelo período de 20 minutos.

Para o término da reação TMB/Peroxidase foi adicionado 25µL de TMB *Stop Solution* (1,1mL de Ácido Sulfúrico em 18,9mL de água deionizada). Posteriormente as placas foram levadas para o leitor de microplacas de ELISA e lidas por espectrofotometria em um comprimento de onda de 450nm.

#### **4.7. Coleta de Órgãos Linfóides (Timo e Baço)**

No dia da eutanásia coletamos o timo e o baço que foram imediatamente pesados para determinar sua massa em gramas (g) e posteriormente congelados e armazenados em biofreezer a -80°C.

##### **4.7.1. Análise de Citocinas no Baço**

Assim como na determinação das citocinas no LBA, seguimos o mesmo protocolo para quantificação das citocinas no baço, mas primeiramente, foi realizada a sua homogeneização para extração de proteínas e quantificação de proteína total.

O processo de homogeneização consistiu em adicionar o baço que estava conservado congelado no freezer à -80°C à 1mL de tampão (2mM Trisma (pH 7,5), 150mM NaCl, NP40 - 2%, 1mM EDTA (pH 8,0), Glicerol 10%, 20mM fluoreto de sódio, 30mM pirofosfato de sódio tetra hidratado, SDS 0,2%, Deoxicolato de sódio 0,5%, 1mM ortovanadato de sódio, 5µM Aprotinina, 1µM Parametil Sulfonilfluoreto e água deionizada). Após a homogeneização, a

amostra ficou em decantação, em seguida, foi adicionado ao sobrenadante 100µL de Triton-X à 10%, e então foi incubada por 30 minutos no gelo e, posteriormente centrifugada a 12.000g à 4°C por 15 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi condicionado em novo tubo eppendorf identificado e uma parte do mesmo utilizada para determinação do conteúdo proteico total por espectrofotometria com reagente Bradford (Biorad, CA, USA). Nessa quantificação de proteína total, as amostras do homogenato do baço foram diluídas na proporção 1:50 em água destilada, e pipetadas (5µl/poço) em placas de 96 poços com Bradford (250µl/poço). Foi realizada uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,6, 0,8 e 1mg/mL. Após a pipetagem as placas foram mantidas no escuro por 10 minutos, e a leitura foi realizada por um espectrofotômetro (Epoch R BioTek) pelo programa GEN 5.1.1.1 com leitura em densidade óptica de 595nm.

A dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-10 no homogenato do baço, foi realizada e capturada pelo método de ELISA. Foram utilizados kits da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) e os ensaios foram feitos conforme instruções determinadas pelo fabricante. As amostras foram testadas em unicata e uma curva padrão realizada em cada placa.

Neste método foram utilizadas microplacas de 96 poços, sensibilizadas com os correspondentes anticorpos de captura, onde foram deixadas com o mesmo por um período *overnight*. No dia seguinte foi desprezada a solução contendo o anticorpo e as placas lavadas por três vezes com 150µL de solução Wash Buffer cada.

Após as placas estarem totalmente secas, foi realizada a etapa de bloqueio adicionando 150µL do reagente diluente e deixando por uma hora em local escuro. Foram realizadas novas lavagens e posteriormente, adicionadas às placas 50µl de amostras e a mesma quantidade de curva padronizada de BSA e então deixadas por um período de 2h no agitador magnético em temperatura ambiente.

Novamente as placas foram lavadas e secas, e realizou-se a etapa de incubação com os respectivos anticorpos de detecção por um novo período de 2h no agitador orbital em temperatura ambiente. Após este período, as placas foram devidamente lavadas e secas (como nas etapas anteriores) e receberam 50µL de Streptoavidina seguidas de um período de descanso por 20 minutos protegidas da luz. Após este período repetiu-se novamente a lavagem e secagem das placas que então receberam 100µL de reagente para revelação TMB sendo deixadas descansando protegidas da luz pelo período de 20 minutos.

Para o termino da reação TMB/Peroxidase foi adicionado 25µL de TMB *Stop Solution* (1,1mL de Ácido Sulfúrico em 18,9mL de água deionizada). Posteriormente as placas foram levadas para o leitor de microplacas de ELISA e lidas por espectofotometria em um comprimento de onda de 450nm.

#### **4.8. Coleta e Análise do Pulmão**

Após a coleta do LBA, a caixa torácica foi aberta e os pulmões retirados em monobloco coração-pulmão. O pulmão esquerdo foi fixado em solução de formaldeído a 10% por 24 horas e posteriormente transferido para uma solução de etanol 70% (LOPES, et al., 2009) para posteriormente ser submetido às técnicas de histologia e imunohistoquímica.

O pulmão direito foi congelado e armazenado em biofreezer a -80°C para análises futuras de proteínas.

##### **4.8.1. Estudo Morfométrico**

O pulmão esquerdo padronizado para histologia e imunohistoquímica foi então submetido às técnicas histológicas habituais com parafina, para obtenção de cortes de 5µm de espessura que foram submetidos à seguinte coloração (DOLHNIKOFF, MAUAD, LUDWIG, 1999):

→ **Coloração de Picro-Sírius** (Direct Red 80, CI 35780, Aldrich, Milwaukee, WI, EUA): Utilizada para a contagem de fibras colágenas da parede das vias aéreas e do tecido pulmonar. Para essa detecção os cortes foram desparafinados, lavados em água, e posteriormente foram corados segundo as instruções do fabricante (EasyPath©). Depois da etapa de coloração, as imagens foram capturadas em aumento de 400x, por uma câmera modelo DFC420 (Leica, Wetzlar, Alemanha) acoplada em um microscópio trinocular DM2500 (Leica), e enviadas ao computador para então processarmos através do programa Qwin Plus (Leica). Um filtro de cores foi aplicado em todas as leituras de todos os grupos experimentais em sequência à captura das imagens. Determinou-se então a área da parede das vias aéreas e seus resultados foram expressos em porcentagem de área de fibras positivas em relação à área total da parede da via aérea. A quantificação das fibras colágenas pulmonares foi realizada através do analisador de imagens (Image ProPlus 4.5.029, Cibernética Media, Inc., Bethesda, MD), onde a medida de densidade óptica é o método empregado para detecção dessas fibras.

#### 4.8.2. Dosagem de Nitritos e Nitratos no Homogenato Pulmonar

Para quantificar o NO no tecido pulmonar as amostras dos pulmões direitos foram tratadas com nitrato redutase (1,6U/ml) para redução de nitratos a nitritos. Utilizamos o método de Griess baseado na descrição de Wu *et al.*, (2007) para determinar a concentração total de nitritos, consistindo de acondicionamento de 50µL do homogenato pulmonar em microplacas de 96 poços, junto a 50µL da solução concentrada de fosfato dinucleotídeo de adenina e nicotinamida - NADPH (8mM), flavina adenina dinucleotídeo - FAD (400µM) e nitrato redutase (50µM/ml), deixando incubar por 1 hora na estufa à 37°C. Após foi adicionado piruvato (900mM) e lactato desidrogenase - LDH (13,5U/ml) que permaneceu por 30 minutos na estufa à 37°C e então adicionou-se reagente de Griess (sulfanilamida à 2% + naftiletilamida à 0,2% em solução H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> à 5%). Após 10 minutos novamente em estufa à 37°C, foi realizada a leitura através de um leitor de ELISA (Bio-Tek Instr., EUA), com densidade óptica de 550nm, obtendo-se os níveis de nitritos e nitratos expressos em µM à partir de uma curva padrão (0,5-200µM) de nitrito de sódio - NaNO<sub>2</sub> igualmente submetida ao processo de redução de nitratos.

#### 4.9. Esfregaço Vaginal e Coleta do Útero

Foi realizada a técnica de esfregaço vaginal onde foram instilados 10µl de solução salina e imediatamente coletados via canal vaginal, e em seguida foram analisados em microscópio óptico com aumento de 400x.

Após a coleta do útero foi realizada a pesagem do mesmo para determinar sua massa em gramas e posteriormente o mesmo foi congelado e armazenado em biofreezer a menos 80°C.

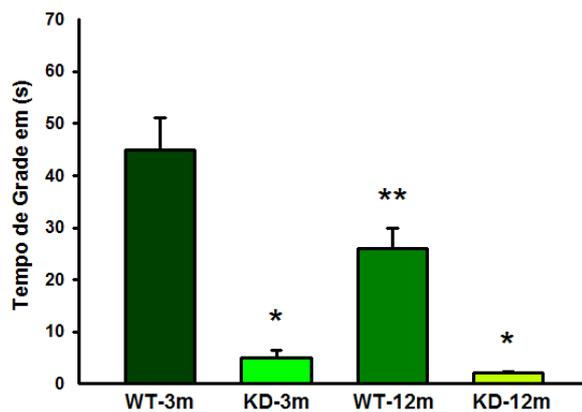
#### 4.10. Forma de Análise dos Resultados

Os resultados obtidos até o momento foram analisados estatisticamente utilizando o programa SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, CA) e análise de variância dois fatores (Two-Way ANOVA), sendo um fator a genotipagem e outro a idade dos animais, seguidos de teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls. Foi considerado estatisticamente significativo um  $P \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Teste de Força de Agarre

Observamos ao fazer o teste de força de agarre que animais selvagens (WT-3m:  $44,97 \pm 3,78$ ; WT-12m:  $26,00 \pm 3,58$  segundos) apresentam maior tempo de sustentação em relação aos VACHT-KD (KD-3m:  $4,90 \pm 3,58$ ; KD-12m:  $2,08 \pm 3,78$  segundos,  $P < 0,001$  para ambas as comparações), fato que pode ser explicado pela fraqueza muscular que esta linhagem apresenta (de CASTRO *et al.*, 2009). Além disso, os animais de 12 meses selvagens apresentam redução do tempo de agarre em relação aos de 3 meses (WT-12m x WT-3m) ( $P \leq 0,001$ ). Essa diferença não ocorre nos animais mutantes. Os dados estão apresentados na Figura 4.

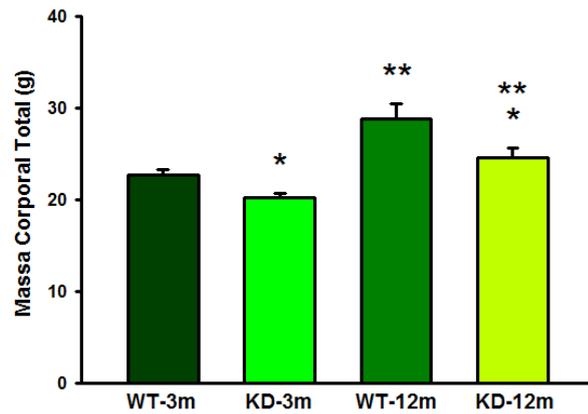


**Figura 4: Teste de Força de Agarre dos Camundongos Fêmeas.** Os animais foram submetidos a este teste no dia da eutanásia. Para tanto foram colocados sobre uma grade que foi invertida e o tempo de sustentação cronometrado até 60 segundos. Nota-se que animais KD-3m e KD-12m ficam menos tempo agarrados a grade quando comparados aos animais WT-3m e WT-12m. Ainda, os animais WT-12m também apresentam redução no tempo de sustentação em relação ao grupo WT-3m. \*  $P < 0,001$  comparado aos respectivos grupos selvagens 3 e 12 meses; \*\*  $P \leq 0,001$  comparado ao grupo selvagem 3 meses. N = 9-10 animais por grupo.

### 5.2. Massa Corporal

Analisamos a massa dos animais e notamos que animais dos grupos KD-3m ( $20,28 \pm 1,03$  g) e KD-12m ( $24,57 \pm 1,08$  g) apresentam redução de massa corporal em relação aos seus respectivos controles selvagens [(WT-3m:  $22,79 \pm 1,08$  g), (WT-12m:  $28,81 \pm 1,03$  g),  $P < 0,01$ ]. Ainda, todos os animais com 12 meses apresentam aumento da massa em relação

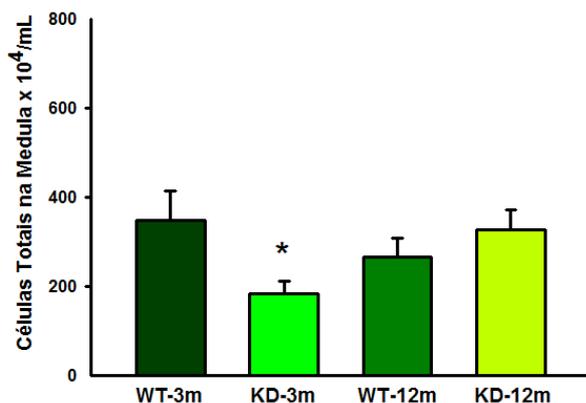
aos animais de 3 meses, independente da genotipagem ( $P < 0,01$ ). Estes dados estão apresentados na Figura 5.



**Figura 5. Massa Corporal dos Camundongos Fêmeas.** Os animais foram pesados no dia da eutanásia. Nota-se que animais KD-3m e KD-12m apresentam menor massa corporal em relação aos seus respectivos controles selvagens. Ainda, todos os animais com 12 meses apresentam aumento de massa corporal em relação aos de 3 meses. \* $P < 0,01$  comparado aos seus respectivos grupos selvagens; \*\* $P < 0,01$  comparado aos grupos 3 meses.  $N = 9-10$  animais por grupo.

### 5.3. Células na Medula Óssea

Na Figura 6 estão os valores de células totais na medula óssea de animais mutantes e selvagens com 3 e 12 meses. Observa-se que animais KD-3m tiveram redução do número de células na medula óssea ( $181,43 \pm 56,00$ ) em relação aos animais WT-3m ( $348,61 \pm 49,39$ ) ( $P < 0,05$ ). Aos 12 meses, não há diferença entre os grupos.

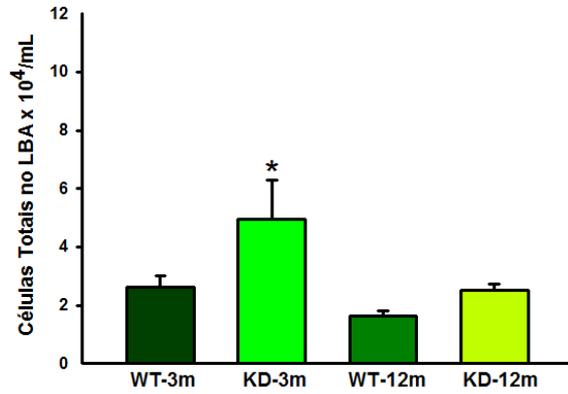


**Figura 6. Células Totais na Medula Óssea dos Camundongos Fêmeas.** Foram quantificadas as células totais no lavado de medula óssea de camundongos fêmeas com 3 e 12 meses de idade. Observamos que há redução da produção de células na medula dos animais mutante com 3 meses. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo WT-3m. N = 9-10 animais por grupo.

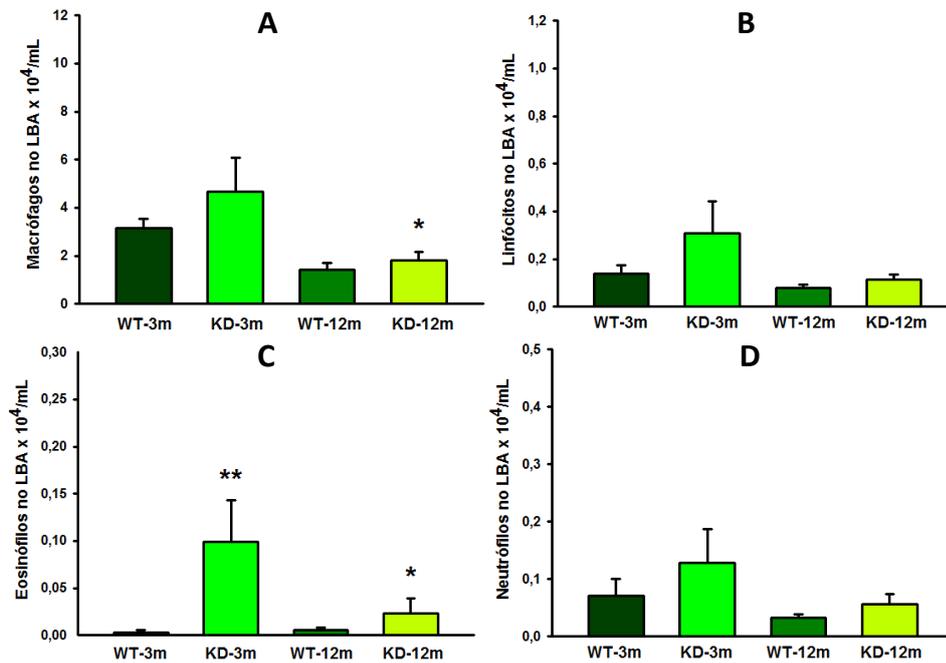
#### 5.4. Lavado Broncoalveolar (LBA)

Na Figura 7, observa-se os valores de contagem total das células recuperadas no LBA. Os animais do grupo KD-3m ( $4,85 \pm 0,69$   $10^4$  células/mL de LBA) apresentaram maior número de células totais em relação aos animais selvagens de mesma idade (WT-3m) ( $2,64 \pm 0,73$   $10^4$  células/mL de LBA) ( $P < 0,05$ ). Este efeito não foi observado aos 12 meses. Ainda os animais KD-12m ( $2,22 \pm 0,78$ ) apresentam valores de células totais menores em relação aos animais KD de 3 meses ( $P < 0,05$ ).

Já na contagem diferencial das células do LBA, os animais mantiveram o mesmo padrão correspondente ao número total de células, como pode ser observado na Figura 8. Os animais KD-3m apresentam aumento de todos os tipos celulares recuperados no LBA [(macrófagos:  $4,36 \pm 0,65$ ), (linfócitos:  $0,31 \pm 0,07$ ), (eosinófilos:  $0,10 \pm 0,02$ ) e (neutrófilos:  $0,13 \pm 0,03$ )] em relação aos WT-3m [(macrófagos:  $2,96 \pm 0,74$ ), (linfócitos:  $0,11 \pm 0,07$ ), (eosinófilos:  $0,0 \pm 0,02$ ) e (neutrófilos:  $0,06 \pm 0,03$ )], entretanto só houve diferença significativa para o número de eosinófilos entre esses dois grupos ( $P < 0,05$ ). Com 12 meses, não há mais diferença entre animais WT e KD em relação aos tipos celulares obtidos no LBA. Os KD-12m apresentam redução no número de macrófagos ( $2,03 \pm 0,74$ ) e eosinófilos ( $0,02 \pm 0,02$ ) em relação aos KD-3m ( $P < 0,05$ ).



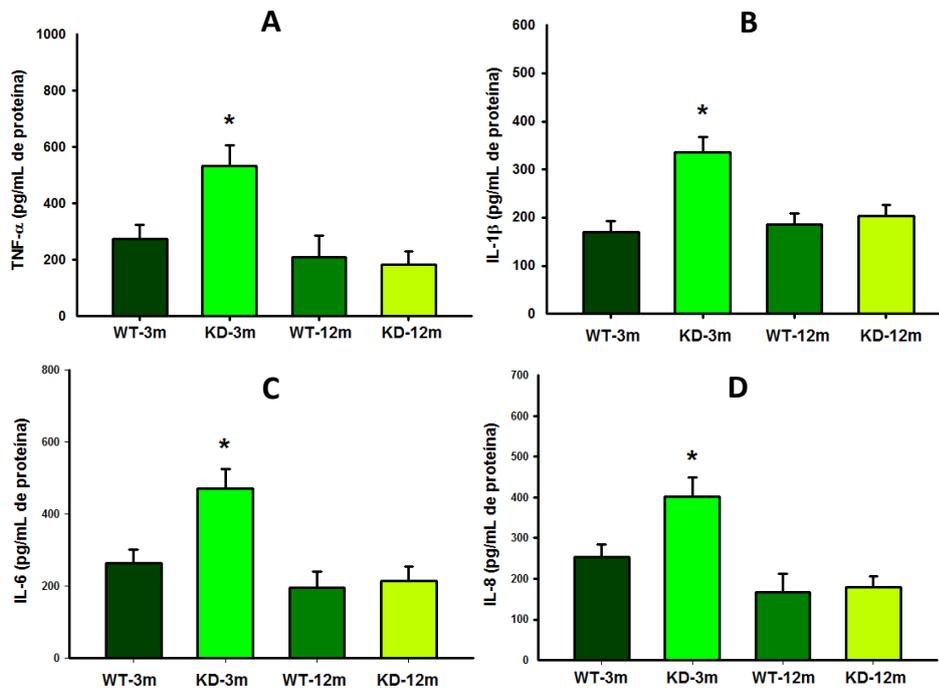
**Figura 7. Valores de Células Totais no LBA dos Camundongos Fêmeas.** As células totais foram quantificadas no LBA. \*P<0,05 comparado aos demais grupos. N = 7-10 animais por grupo.



**Figura 8. Contagem Diferencial de Células no LBA dos Camundongos Fêmeas.** Foram avaliados o número de macrófagos (A), linfócitos (B), eosinófilos (C) e neutrófilos (D) no LBA de animais com 3 e 12 meses. \*P<0,05 comparado ao grupo KD-3m; \*\*P<0,05 comparado ao grupo WT-3m. N=7-9 por grupo.

#### 5.4.1. Citocinas no Lavado Broncoalveolar (LBA)

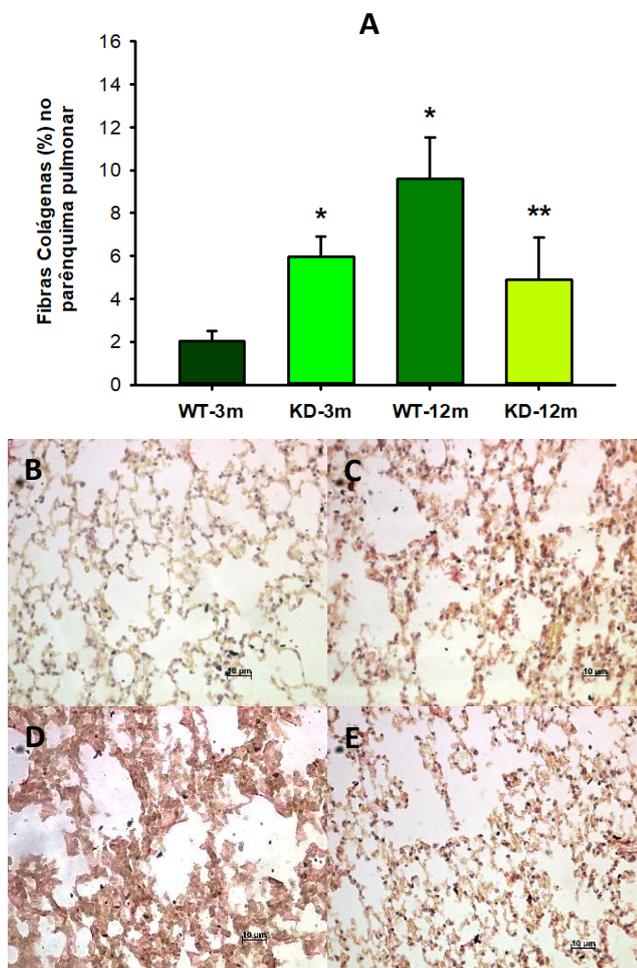
Na Figura 9 podemos verificar os valores das citocinas TNF $\alpha$  (painel A), IL-1 $\beta$  (painel B), IL-6 (painel C) e IL-8 (painel D) nos quatro grupos estudados. Observa-se que para todas as citocinas, o grupo KD-3m [(TNF $\alpha$ : 532,20 $\pm$ 57,54), (IL-1 $\beta$ : 334,81 $\pm$ 26,35), (IL-6: 471,28 $\pm$ 42,99), (IL-8: 401,58 $\pm$ 36,18)] apresenta aumento nos níveis destas em relação ao WT-3m [(TNF $\alpha$ : 275,19 $\pm$ 60,65), (IL-1 $\beta$ : 169,82 $\pm$ 24,84), (IL-6: 264,50 $\pm$ 42,99), (IL-8: 253,30 $\pm$ 36,18),  $P < 0,01$  para todas as comparações] e em relação aos animais KD-12m [(TNF $\alpha$ : 182,31 $\pm$ 57,54), (IL-1 $\beta$ : 202,82 $\pm$ 23,57), (IL-6: 214,55 $\pm$ 42,99), (IL-8: 180,11 $\pm$ 36,18) ( $P < 0,01$  para todas as comparações).



**Figura 9: Citocinas no LBA dos Camundongos Fêmeas.** Níveis de citocinas TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-6 (C), IL-8 (KC, homóloga) (D) detectadas por ELISA no LBA em animais mutante e selvagens com 3 ou 12 meses. \* $p < 0,01$  em relação aos demais grupos. N=5-10 animais por grupo para TNF- $\alpha$  e N=6-10 para as demais citocinas.

#### 5.5. Estudo Morfométrico

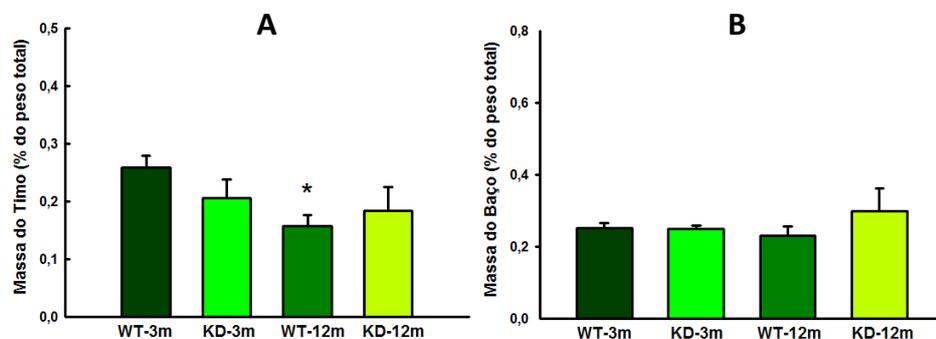
Avaliamos a deposição de colágeno no parênquima pulmonar, pois é um dos parâmetros utilizados para observar se houve remodelamento pulmonar em consequência de inflamação. Os dados obtidos foram representados na figura 10, onde observamos que os grupos KD-3m ( $5,97 \pm 0,94 - P < 0,05$ ) e WT-12m ( $9,60 \pm 1,93 - P < 0,001$ ) aumentaram a porcentagem de colágeno em relação ao grupo selvagem de 3 meses. Além disso, o grupo KD-12m ( $4,91 \pm 1,92 - P < 0,05$ ) apresentou menor deposição de colágeno em comparação com o selvagem de mesma idade.



**Figura 10: Remodelamento do Parênquima Pulmonar.** No gráfico (A) observamos um aumento de fibras colágenas no grupo KD-3m em comparação ao grupo selvagem de mesma idade. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo WT-3m. \*\* $p < 0,05$  em relação ao grupo WT-12m.  $N = 4-6$  animais por grupo. Fotomicrografias representativas das fibras colágenas no parênquima pulmonar dos animais WT-3m (B), KD-3m (C), WT-12m (D) e KD-12m (E) através de programa analisador de imagens.

### 5.6. Massa de Órgãos Linfóides

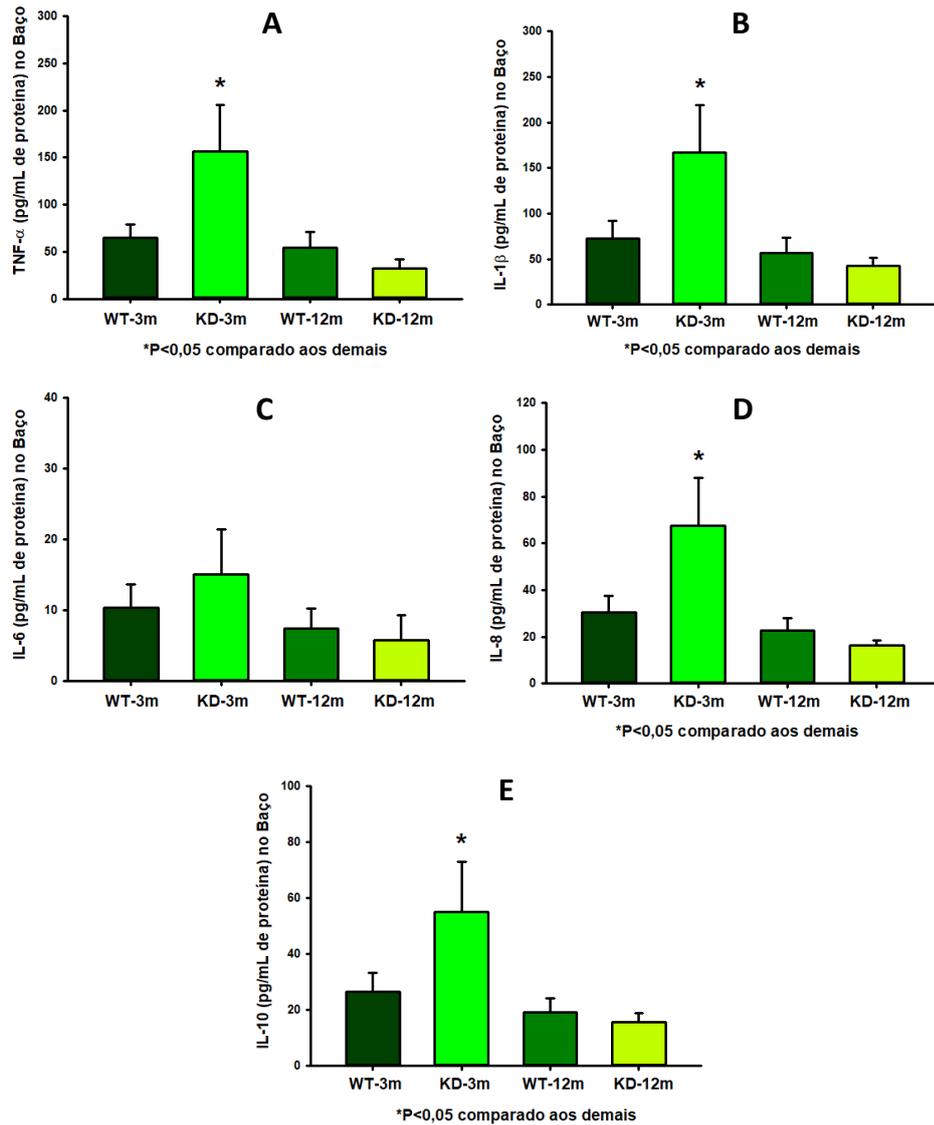
Foram analisados também a massa do baço e timo em relação a massa total, apresentados na Figura 11. No peso do timo, nota-se que animais selvagens com 12m (WT-12m:  $0,16\pm 0,03\%$ ), apresentam redução do timo em relação aos selvagens de 3m [(WT-3m:  $0,26\pm 0,03\%$ ),  $P < 0,05$ ]. Esta diferença não é observada nos animais mutantes [(KD-12m:  $0,19\pm 0,03\%$ ); (KD-3m:  $0,21\pm 0,03\%$ )]. Em relação ao peso do baço, não houve diferença estatística em nenhum dos grupos estudados [(WT-3m:  $0,25\pm 0,03\%$ ), (KD-3m:  $0,25\pm 0,04\%$ ), (WT-12m:  $0,23\pm 0,03\%$ ), (KD-12m:  $0,29\pm 0,03\%$ )].



**Figura 11. Massa de Órgãos Linfóides dos Camundongos Fêmeas.** Massa do timo (A) e baço (B) em relação a massa corporal (%) de fêmeas com 3 e 12 meses. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo de mesma genotipagem com 3 meses. N = 6-10 animais por grupo.

#### 5.6.1. Citocinas no Baço

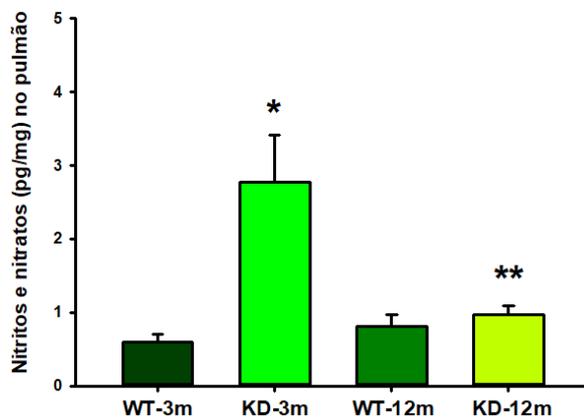
Verificamos, nos quatro grupos estudados, os níveis das citocinas presentes no homogenato do baço (figura 12) onde o painel A representa os níveis de  $TNF\alpha$ , painel B os níveis de  $IL-1\beta$ , painel C os níveis de  $IL-6$ , no painel D os níveis de  $IL-8$ , e no painel E os níveis de  $IL-10$ . Novamente observa-se que para todas as citocinas, o grupo KD-3m [( $TNF\alpha$ :  $156,21\pm 49,69$ ), ( $IL-1\beta$ :  $166,95\pm 29,58$ ), ( $IL-6$ :  $15,08\pm 4,11$ ), ( $IL-8$ :  $67,57\pm 11,31$ ), ( $IL-10$ :  $55,02\pm 9,77$ )] apresenta aumento nos níveis destas em relação ao WT-3m [( $TNF\alpha$ :  $64,40\pm 14,57$ ), ( $IL-1\beta$ :  $72,33\pm 27,67$ ), ( $IL-6$ :  $07,71\pm 04,11$ ), ( $IL-8$ :  $30,32\pm 10,58$ ), ( $IL-10$ :  $19,51\pm 9,77$ ),  $P \leq 0,05$  para todas as comparações] e em relação aos animais KD-12m [( $TNF\alpha$ :  $37,50\pm 7,19$ ), ( $IL-1\beta$ :  $42,62\pm 29,58$ ), ( $IL-6$ :  $05,83\pm 04,11$ ), ( $IL-8$ :  $16,38\pm 11,31$ ), ( $IL-10$ :  $15,62\pm 9,77$ ),  $P \leq 0,05$  para todas as comparações].



**Figura 12: Citocinas no Homogenato do Baço dos Camundongos Fêmeas.** Níveis de citocinas TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-6 (C), IL-8 (KC, homóloga) (D), IL-10 (E) detectadas por ELISA no homogenato do baço em animais mutante e selvagens com 3 ou 12 meses. \*p<0,05 em relação aos demais grupos. N=5-10 animais por grupo para TNF- $\alpha$  e N=6-10 para as demais citocinas.

### 5.7. Dosagem de Nitritos e Nitratos no Homogenato Pulmonar

A avaliação dos níveis de  $\text{NO}_2$  e  $\text{NO}_3$  no tecido pulmonar observada na figura 13, demonstra que os animais do grupo KD-3m ( $2,77 \pm 0,64$  -  $P \leq 0,001$ ) apresentaram os níveis mais altos quando comparado ao grupo WT-3m ( $0,59 \pm 0,11$ ) e o grupo KD-12m ( $1,02 \pm 0,26$ ) apresenta redução dos níveis de nitritos e nitratos quando comparado ao KD-3m.

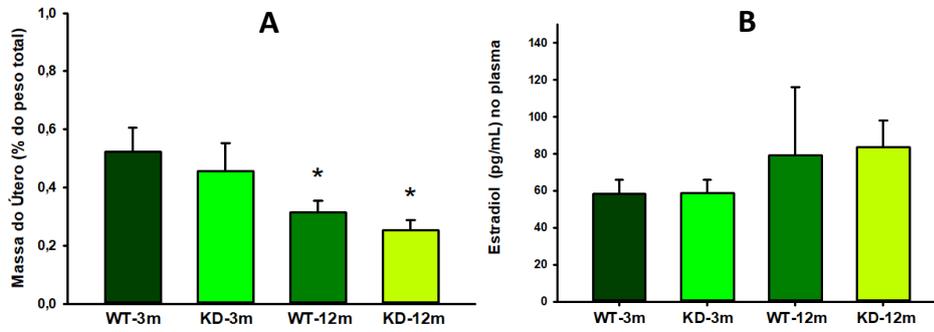


**Figura 13: Níveis de Nitritos e Nitratos no Homogenato Pulmonar.** Níveis de nitritos e nitratos detectados por teste de Griess no homogenato pulmonar em animais mutantes e selvagens com 3 ou 12 meses. \* $p \leq 0,001$  em relação ao grupo selvagem de 3 meses. \*\* $p \leq 0,001$  em relação ao grupo mutante de 3 meses. N=5-7 animais por grupo.

### 5.8. Ciclo Estral, Massa do Útero e Dosagem de Estradiol Sanguíneo

Observamos na figura 14 (A) que os animais com 12 meses, independente da genotipagem [(WT-12m:  $0,31 \pm 0,06\%$ ), (KD-12m:  $0,25 \pm 0,06\%$ )] apresentam redução da massa do útero (% da massa corporal) em comparação aos animais de 3 meses [(WT-3m:  $0,52 \pm 0,06\%$ ), (KD-3m:  $0,46 \pm 0,07\%$ ),  $P < 0,05$ ].

À partir do plasma sanguíneo verificamos os níveis de estradiol nos quatro grupos estudados, [figura 14 (B)] onde não conseguimos observar diferenças estatísticas entre os mesmos [WT-12m ( $00,00 \pm 00,00$ ); KD-3m ( $00,00 \pm 00,00$ ); WT-12m ( $00,00 \pm 00,00$ ); KD-12m ( $00,00 \pm 00,00$ )].



**Figura 14: Massa do Útero e Níveis de Estradiol Plasmático.** Observa-se a massa do útero (A) em relação a massa corporal (%) de fêmeas com 3 e 12 meses. Nota-se que a massa do útero está reduzida aos 12 meses. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo de mesma genotipagem com 3 meses. Os níveis de estradiol (B) no plasma sanguíneo em animais mutante e selvagens com 3 ou 12 meses não demonstram alterações significativas estatisticamente.  $N=5-10$  animais por grupo.

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou animais com deficiência colinérgica por redução de VAcHT ao longo do tempo, com 3 meses e 12 meses. Demonstramos que a redução colinérgica em 3 meses apresenta aumento da resposta inflamatória pulmonar, com aumento no número de células inflamatórias no lavado broncoalveolar e aumento de citocinas no pulmão e no baço. Interessante que aos 12 meses, estes animais apresentam-se similares aos selvagens com a mesma idade.

O sistema colinérgico anti-inflamatório e seus componentes periféricos como o receptor nicotínico alfa-7 têm se demonstrado importantes no controle da resposta inflamatória pulmonar, tanto em situações basais (PINHEIRO *et al.*, 2015) quanto em situações patológicas (SU *et al.*, 2007, PINHEIRO *et al.*, 2017). Os níveis de VAcHT estão relacionados diretamente com a redução da liberação da ACh tanto neuronal quanto não neuronal, tornando assim o modelo da linhagem de redução de VAcHT uma importante ferramenta para o estudo dos efeitos do sistema colinérgico anti-inflamatório em diversos sistemas (PRADO, *et al.*, 2006a).

Observamos inicialmente que os animais VAcHT apresentam redução na força muscular, testada pelo teste de força de agarre (*Wire Hang Test*), tanto com 3 quanto com 12 meses, o que corrobora com estudos prévios descritos por Prado *et al.* (2006a), que demonstraram que os animais VAcHT apresentam miastenia (fraqueza e fadiga muscular). Ainda notamos que animais de 12 meses sem deficiência colinérgica apresentam também redução no tempo de sustentação, o que evidencia a perda de força devido à idade. Corroborando com esses dados, Ferraro *et al.* (2016) demonstraram que um dos fatores que contribui para a diminuição da força muscular com a idade é o aumento da expressão de fatores pró-inflamatórios e de espécies reativas de oxigênio no músculo esquelético, que favorecem a degradação de proteínas com consequente perda de motoneurônios e apoptose. Sendo assim, esta é uma justificativa plausível para os achados nesse estudo.

Ainda a fim de confirmar as alterações sistêmicas induzidas pela redução de VAcHT, observamos que animais mutantes apresentam redução da massa corpórea, que também já foi demonstrada em outros estudos (PINHEIRO *et al.*, 2015). Aos 12 meses, embora a massa corporal tenha aumentado em relação aos animais jovens, os mutantes permanecem com menor massa corpórea em relação aos selvagens. Em conjunto com a redução no teste de força, a redução do peso confirma o fenótipo destes animais.

Os animais mutantes produzem menos células medulares em relação aos respectivos selvagens aos 3 meses. Essa diferença não foi observada aos 12 meses. Pritz, Weinberger, Grubeck-Loebenstein (2014), revisando o efeito da senilidade na resposta imunológica, embasaram que há redução de células totais medulares com o envelhecimento, fato que justifica inclusive o déficit imunológico característico na senilidade de forma geral. Entretanto, aos 12 meses não observamos estes achados em animais mutantes. Provavelmente estudos com animais com maior idade poderiam demonstrar esta resposta. Interessante, que a redução da produção de células medulares aos 3 meses em animais VACHT, pode explicar o déficit imunológico causado pela deficiência colinérgica.

Os animais VACHT jovens apresentam aumento de células totais no LBA quando comparado aos demais grupos. Embora, todos os tipos celulares estejam aumentados no KD-3m, só houve diferença significativa para o número de eosinófilos. Houve ainda aumento de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 (KC), que são citocinas pró-inflamatórias, no LBA dos animais KD-3m, sugerindo processo inflamatório pulmonar. Estes achados corroboram aqueles obtidos por Pinheiro *et al.*, (2015), que observaram aumento da resposta inflamatória em machos jovens mutantes para VACHT.

Os animais KD-12m apresentam redução de células do LBA e de citocinas em relação aos de 3 meses, e valores semelhantes aos selvagens de 12 meses. Shaw *et al.*, (2010) relatam em revisão sobre envelhecimento e sistema imune que algumas respostas da imunidade inata estão diminuídas com o envelhecimento. Toapanta e Ross (2009) demonstraram que, ao mesmo tempo em que a produção de substâncias pró-inflamatórias como IL-12 e MCP-1 (Proteína quimioatratadora de monócitos-1) estava diminuída no pulmão de animais idosos submetidos à infecção viral, outras, como a IL-6, citocina altamente produzida por linfócitos, o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\alpha$  estavam aumentadas. Em nosso estudo as citocinas no LBA reduziram ao longo dos 12 meses, mostrando a diminuição do quadro inflamatório inicial, o que favorece a função pulmonar, pois sem os sinais inflamatórios característicos, diminui a presença de citocinas pró-inflamatórias e de fatores pró-fibróticos que consequentemente prejudicam a função desse órgão (COLARUSSO *et al.*, 2017).

Pelo fato da literatura relatar aumento do estresse oxidativo em inflamação pulmonar (RAHMAN, ADCOCK, 2006), avaliamos os níveis de óxido nítrico no tecido através dos seus subprodutos NO<sub>2</sub> e NO<sub>3</sub>. Observamos que, aos 3 meses em animais mutantes, houve um aumento dos níveis de nitrito/nitrato no pulmão. O trabalho de Asano *et al.*, (1994) em células *in vitro*, observou que existe um papel importante das citocinas na indução de NOS, onde

IFN- $\gamma$  (interferon gama), IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  conseguiram a indução máxima de NOS, pois com a eliminação destas citocinas, diminuiu a indução dos genes de iNOS, esses dados explicariam o aumento dos níveis de NO<sub>2</sub> e NO<sub>3</sub> encontrados no tecido pulmonar dos animais KD-3m.

Aos 12 meses, os níveis de nitrito e nitrato em animais mutantes voltou a valores basais. Uma hipótese poderia se o aumento da isoforma constitutiva de NOS, que teria um papel protetor (MONCADA, PALMER, HIGGS, 1991) ou ainda uma inibição da iNOS ao longo do tempo. Embora esta seja uma hipótese plausível, não avaliamos no presente projeto as isoformas de NOS.

Uma vez que o estresse oxidativo e os demais sinais inflamatórios teciduais levam a alterações da deposição de colágeno (MASSA *et al.*, 2017; PRADO *et al.*, 2006b), foi quantificada esta proteína no pulmão dos grupos estudados, o que pode caracterizar o remodelamento pulmonar, que consiste em alterações histológicas do parênquima e/ou vias aéreas, dificultando a expansibilidade natural deste órgão (HUANG, 2007a). Portanto, quanto às fibras colágenas no pulmão, observamos em nosso estudo um aumento das mesmas no grupo KD-3m, característica observada em quadros inflamatórios como defesa do organismo, dado esse que justifica-se pela inflamação pulmonar observada nos animais KD-3m com aumento do número de macrófagos, células que, segundo Chetta (1997), são potentes liberadores de mediadores pró-fibróticos, resultando no aumento das fibras colágenas. Observamos também o aumento dessas fibras no grupo WT-12m que demonstra resposta pulmonar característica da senilidade, corroborando com o estudo feito previamente por nosso grupo com animais VChT-KD machos (PINHEIRO *et al.*, 2015), que aos 3 meses apresentavam inflamação pulmonar e aumento das fibras colágenas; e concordando também com os estudos de Huang *et al.*, que demonstraram aumento das fibras colágenas no envelhecimento pulmonar (HUANG *et al.*, 2007a) e também correlacionando ao desenvolvimento de fibrose pulmonar (HUANG *et al.*, 2007b).

Considerando que não existem outros estudos que tenham avaliado alteração em fêmeas desta linhagem, optamos por analisar a massa de alguns órgãos relacionados ao sistema imunológico, como o timo e o baço assim como a produção de citocinas pelo baço.

Sabe-se que o timo apresenta involução com a idade (PANGRAZZI, *et al.* 2016). Interessante que nossos animais selvagens com 12 meses apresentaram redução do timo, entretanto, isso não foi observado em animais mutantes, que já partiram mesmo aos 3 meses com tendência de redução da massa do timo. Uma hipótese é que a redução do timo destes

animais já aos 3 meses, possa explicar a deficiência imunológica e a maior susceptibilidade às infecções que a deficiência colinérgica induz (LEITE *et al.*, 2016).

Pelo fato de alguns estudos já revelarem o papel do baço na mediação da atividade anti-inflamatória do nervo vago (HUSTON *et al.*, 2006; ROSAS-BALLINA *et al.*, 2008), componente importante do SCAI, verificamos a massa e as citocinas desse órgão, onde não observamos diferença estatisticamente significativa na massa do baço dos grupos estudados, dado que difere dos obtidos por Loukov *et al.*, (2016) que constataram esplenomegalia em animais idosos com 18 meses, e atribuíram tal fato aos baixos níveis constantes de inflamação característicos do envelhecimento (FRANCESCHI *et al.*, 2007; PUCHTA *et al.*, 2016) que estimulam excessivamente esse órgão, resultando no aumento de sua massa. A diferença na idade dos animais senis estudados pode explicar tais discrepâncias. Já com relação a produção de citocinas nesse órgão, o grupo KD-3m diferindo-se dos demais grupos, demonstrou aumento na produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8, o que corrobora os achados no pulmão, e demonstra também a importância do baço no controle anti-inflamatório, como visto por Huston *et al.*, (2006) quando verificaram que animais esplenectomizados ao receberem estímulo elétrico no nervo vago, não eram capazes de diminuir a produção de TNF- $\alpha$ .

Na tentativa de achar resposta às alterações pelo componente hormonal, avaliamos a massa do útero e os níveis de estradiol plasmático. Animais com 12 meses, tanto selvagens quanto mutantes, apresentam redução da massa do útero, sugerindo déficit dos níveis hormonais femininos. Neste sentido, o fato de que entre 10 a 12 meses o ciclo estral começa a ser irregular em camundongos fêmeas (LU, ANZALONE, LAPOLT, 1994; MCGEE AND HSUEH, 2000) poderia justificar esse achado, além disso, o trabalho de Cardoso *et al.*, (2004) demonstrou que em animais ovariectomizados, os níveis de estradiol decrescem abruptamente um dia após a retirada dos ovários e a massa do útero acompanha esse decréscimo, porém mais lentamente, indicando a relação entre a presença de estradiol e a massa uterina. Porém, ao avaliarmos a dosagem de estradiol plasmático, não observamos reduções significativas desses níveis nos grupos de 12 meses em relação aos de 3 meses, embora a massa do útero dos animais de 12 meses tenha diminuído. Alguns autores ao estudar sobre camundongos fêmeas idosas consideram a idade acima de 18 meses como referência a um animal idoso, sendo, portanto, uma explicação para o fato de não termos observado essa alteração aos 12 meses, que é considerada por muitos autores como meia-idade (CLAES *et al.*, 2017; FINCH, 2014).

Em conjunto nossos dados demonstraram que o sistema colinérgico modula a inflamação pulmonar em animais jovens. Embora os animais com deficiência de VACHT mantenham o fenótipo a longo prazo, a inflamação e o estresse oxidativo no pulmão parece ser controlada ao longo do tempo. Os exatos mecanismos desta adaptação ainda não foram totalmente elucidados, mas parece não haver relação com os níveis de estrógeno. Certamente estudo com animais mais velhos de 18 a 24 meses serão necessários para elucidar o papel do sistema colinérgico anti-inflamatório nas alterações pulmonares em animais idosos.

## 7. CONCLUSÃO

Mostramos nesse estudo que animais fêmeas de 3 meses de idade com deficiência de VACHT apresentam, sem estímulo nocivo, clara resposta inflamatória com aumento de células, citocinas e de nitritos/nitratos no pulmão, aumento de citocinas no baço, redução de células na medula óssea, além de remodelamento pulmonar, mostrando o importante papel do sistema colinérgico anti-inflamatório na homeostasia do organismo.

Aos 12 meses, esses animais reduzem esse quadro inflamatório inicial, apresentando respostas pulmonares e sistêmicas semelhantes aos selvagens de mesma idade. Embora não tenhamos conseguido identificar os exatos mecanismos desta adaptação parece não haver relação com os níveis de estrógeno.

Portanto, através deste estudo podemos concluir que o sistema colinérgico exerce controle em processos inflamatórios em animais jovens fêmeas com deficiência colinérgica.

**REFERÊNCIAS**

- ABREU-VILLAÇA Y, FILGUEIRAS CC, MANHÃES AC. Developmental aspects of the cholinergic system. *Behavioural Brain Research*.2011; 221: 367-378.
- ADAMS HR. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. *J Am Med Assoc* 1996; 209:1297-302.
- ANGELI P, PRADO CM, XISTO DG, SILVA PL, PÁSSARO CP, NAKAZATO HD, LEICK-MALDONADO EA, MARTINS MA, ROCCO PR, AND TIBERIO IF. Effects of chronic L-NAME treatment lung tissue mechanics, eosinophilic and extracellular matrixresponses induced by chronic pulmonary inflammation. *Am J Physiol Lung CellMol Physiol*. 2008; 294: 1197-205.
- ARMANIOS M, BLACKBURN EH. The telomeres syndromes. *Nature Reviews Genetics* 13, 693–704 (2012)
- ASANO K, CHEE CBE, GASTON B, LILLY CM, GERARD C, DRAZEN JM, STAMLER JS. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994; 91: 10089-10093.
- BLACKWELL TS, CHRISTMAN JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth* 1996; 77: 110–77.
- BOSCÁ L, ZEINI M, TRAVÉS PG, HORTELANO S. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology*. 2005; 208(2): 249-258.
- CARDOSO CC, PEREIRA RTS, KOYAMA CA, PORTO CS, ABDALLA FMF. Effects of Estrogen on Muscarinic Acetylcholine Receptors in the Rat Hippocampus. *Neuroendocrinology* 2004; 80:379–386.
- CATAL F, METE E, TAYMAN C, TOPAL E, ALBAYRAK A and SERT H. A human monoclonal anti-TNF alpha antibody (adalimumab) reduces airway inflammation and ameliorates lung histology in a murine model of acute asthma. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2014; 43: 14–18.
- CHETTA A, FORESI A, DEL DONNA M, BERTORELLI G, PESCI A, OLIVIERI D. Airways remodeling is a distinctive feature of asthma and is related to severity of disease. *Chest*, 1997. 111(4):p.852-7.
- CLAES A, BALL BA, SCOGGIN KE, ROSER JF, WOODWARD EM, DAVOLLI GM, SQUIRES EL, TROEDSSON MHT. The influence of age, antral follicle count and diestrous ovulations on estrous cycle characteristics of mares. *Theriogenology* (2017), doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.04.019.
- COLARUSSO C, TERLIZZI M, MOLINO A, PINTO A, SORRENTINO R. Role of the inflammasome in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No. 47), pp: 81813-81824.

- DEBLEY JS, REDDING GJ, CRITCHLOW CW. Impact of adolescence and gender on asthma hospitalization: a population-based birth cohort study. *Pediatr Pulmonol.* 2004 Dec;38(6):443-50.
- DE CASTRO BM, DE JAEGER X, MARTINS-SILVA C, LIMA RD, AMARAL E, MENEZES C, LIMA P, NEVES, CML, PIRES, RG, GOULD, TW, WELCH, I, KUSHMERICK, C, GUATIMOSIM, C, IZQUIERDO, I, CAMMAROTA, M, RYLETT, RJ, GOMEZ, MV, CARON, MG, OPPENHEIM, RW, PRADO, MAM, PRADO, VF. The vesicular acetylcholine transporter is required for neuromuscular development and function. *Mol Cell Biol.* 2009; 29: 5238–5250.
- DOLHNIKOFF, M., MAUAD, T., LUDWIG, M.S. Extracellular matrix and oscillatory mechanics of rat lung parenchyma in bleomycin-induced fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999; 160: 1750–1757.
- ELWARY SMA, CHAVAN B AND SCHALLREUTER KU. The Vesicular Acetylcholine Transporter Is Present in Melanocytes and Keratinocytes in the Human Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology.* 2006; 126: 1879–1884.
- FERRARO E, PIN F, GORINI S, PONTECORVO L, FERRI A, MOLLACE V, COSTELLI P, ROSANO G. Improvement of skeletal muscle performance in ageing by the metabolic modulator Trimetazidine. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2016; 7: 449–457.
- FINCH C, The menopause and aging, a comparative perspective. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 142 (2014) 132–141.
- FLORA FILHO R, ZILBERSTEIN B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções. Rev Ass Med Brasil* 2000; 46(3): 265-71.
- FRANCESCHI C, CAPRI M, MONTI D, GIUNTA S, OLIVIERI F, SEVINI F, PANOURGIA MP, INVIDIA L, CELANI L, SCURTI M, CEVENINI E, CASTELLANI GC, SALVIOLI S. Inflammaging and antiinflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech. Ageing Dev.* 2007; 128, 92–105.
- FOX B, BULL TB, GUZ A. Innervation of alveolar walls in the human lung: an electron microscopic study. *J Anatomy.* 1980; 131:683–692.
- GOLEC M, WIELSCHER M, LEMIESZEK MK, VIERLINGER K, SKÓRSKA C, HUETTER S, SITKOWSKA J, MACKIEWICZ B, GÓRA-FLOREK A, ZIESCHE R, YANAI H, FRAIFELD VE, MILANOWSKI J, DUTKIEWICZ J. Middle age enhances expression of innate immunity genes in a female mouse model of pulmonary fibrosis. *Biogerontology.* 2017: 1-10.
- GUERRA S, WRIGHT AL, MORGAN WJ, SHERRILL DL, HOLBERG CJ, MARTINEZ FD. Persistence of asthma symptoms during adolescence: role of obesity and age at the onset of puberty. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:78–85.

- GWILT CR, DONNELLY LE, ROGERS DF. The non-neuronal cholinergic system in the airways: An unappreciated regulatory role in pulmonary inflammation? *Neuroendocrinology*, 2002; 76:121–130.
- HARMAN, D. The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1981; 78: 7124–7128.
- HUSTON JM, OCHANI M, ROSAS-BALLINA M, LIAO H, OCHANI K, PAVLOV VA, GALLOWITSCH-PUERTA M, ASHOK M, CZURA CJ, FOXWELL B, TRACEY KJ, ULLOA L. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J Exp Med* 2006; 203:1623–8.
- HUANG K, RABOLD R, SCHOFIELD B, MITZNER W, TANKERSLEY CG. Age-dependent changes of airway and lung parenchyma in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol.* 2006; 102: 200–206.
- HUANG K, RABOLD R, SCHOFIELD B, MITZNER W, TANKERSLEY CG. Age-dependent changes of airway and lung parenchyma in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol.* 2007a; 102(1):200±6.
- HUANG K, MITZNER W, RABOLD R, SCHOFIELD B, LEE H, BISWAL S, TANKERSLEY CG. Variation in senescent-dependent lung changes in inbred mouse strains. *Journal of Applied Physiology.* 2007b; 102(4): 1632-1639.
- JAITOVICH A, JOURD'HEUIL, D. A Brief Overview of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species Signaling in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 967. 2017. DOI 10.1007/978-3-319-63245-2\_6.
- JOHNSTON GR, WEBSTER NR. Cytokines and the immunomodulatory function of the vagus nerve. *Br J Anaesth.* 2009 April; 102(4):453-462
- KOMORI E, SHOGA K, AOE M, SAWADA S, ICHIBA S, SHIMIZU N. Partial liquid ventilation does not affect BALF TNF-, MIP-2, CINC-1 concentrations, or CD11b cell surface expression, but does increase macrophage proportion among BALF cells in the acute phase of rat LPS-induced lung injury. *Acta Med. Okayama.* 2003; 57:133.-141.
- KHURANA S. Lung Physiology & Airway Inflammation in COPD patients with persistent sputum production [monografia] Manchester: University of Manchester; 2013. <https://www.escholar.manchester.ac.uk/uk-ac-man-scw:215752>. Disponível em: 15/12/2016.
- KLINGER JR, KADOWITZ PJ. The Nitric Oxide Pathway in Pulmonary Vascular Disease. *Am J Cardiol* 2017; 120:S71–S79
- KUMMER W AND KRASTEVA-CHRIST G. Non-neuronal cholinergic airway epithelium biology *Current Opinion in Pharmacology.* 2014; 16:43–49.
- KUMMER W, LIPS KS, PFEIL U. The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem Cell Biol.* 2008; 130:219–234.
- LEITE HR, OLIVEIRA-LIMA OC, PEREIRA LM, OLIVEIRA VEM, PRADO VF, PRADO MAM, PEREIRA GS, MASSENSINI AR. Vesicular acetylcholine transporter knock

- down-mice are more susceptible to inflammation, c-Fos expression and sickness behavior induced by lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun*. 2016 Oct;57:282-292.
- LIMA RF, PRADO VF, PRADO MAM, KUSHMERICK C. Quantal release of acetylcholine in mice with reduced levels of the vesicular acetylcholine transporter. *J Neurochem*. 2010; 113(4): 943–951.
- LINO-DOS-SANTOS-FRANCO A, AMEMIYA RM, OLIVEIRA APL, DAMAZO AS, BREITHAUPT-FALOPPA AC, VITORETTI LB, ACCETURI BG, TAVARES-DE-LIMA W. The putative role of ovary removal and progesterone when considering the effect of formaldehyde exposure on lung inflammation induced by ovalbumin. *CLINICS*. 2013;68(12):1528-1536.
- LIGEIRO-DE-OLIVEIRA AP, OLIVEIRA-FILHO RM, DA SILVA ZL, BORELLI P, TAVARES DE LIMA W. Regulation of allergic lung inflammation in rats: interaction between estradiol and corticosterone. *Neuroimmunomodulation*. 2004; 11(1):20-7, <http://dx.doi.org/10.1159/000072965>.
- LIPS KS, LÜHRMANN A, TSCHERNIG T, STOEGER T, ALESSANDRINI F, GRAU V, HABERBERGER F, KOEPESELL H, PABST R and KUMMER W. Down regulation of the non-neuronal acetylcholine synthesis and release machinery in acute allergic airway inflammation of the rat and mouse. *Life Sci*. 2007; 80: 2263-2269.
- LOPES FDTQS, PINTO TS, ARANTES-COSTA FM, MORIYA HT, BISELLI PJC, FERRAZ LFS, LICHTENFELS AJ, SALDIVA PH, MAUAD T, MARTINS MA. Exposure to ambient levels of particles emitted by traffic worsens emphysema in mice. *Environ Res*. 2009; 109(5): 544-51.
- LOUKOV D, NAIDOO A, PUCHTA A, MARIN JLA, BOWDISH DME. Tumor necrosis factor drives increased splenic monopoiesis in old mice. *Journal of Leukocyte Biology*. 2016; 100: 121-129.
- LU JHK, ANZALONE CR, LAPOLT OS. Relation of neuroendocrine function to reproductive decline during aging in the female rat. *Neurobiol Aging*. 1994; 15:541–544.
- MACIEL-BARÓN LA, MORALES-ROSALES SL, AQUINO-CRUZ AA, TRIANA-MARTÍNEZ F, GALVÁN-ARZATE S, LUNA-LÓPEZ A, GONZÁLEZ-PUERTOS VY, LÓPEZ-DÍAZGUERRERO NE, TORRES C, KÖNIGSBERG, M. Senescence associated secretory phenotype profile from primary lung mice fibroblasts depends on the senescence induction stimuli. *Age*. 2016; 38(1): 26.
- MARLETTA, MA. Nitric Oxide Synthase Structure and Mechanism. *The Journal of Biogiccal Chemistry*. Vol. 268 n°. 17 Issue of June 15, pp. 12231-12234. 1993.
- MASSA CB, GROVES AM, JAGGERNAUTH SU, LASKIN DL, GOW AJ. Histologic and biochemical alterations predict pulmonary mechanical dysfunction in aging mice with chronic lung inflammation. *PLoS Comput Biol* 13(8):e1005570.

- MCCALL TB, PALMER RM, AND MONCADA S. Induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils and its inhibition by dexamethasone. *Eur J Immunol* 21: 2523–2527, 1991.
- MCGEE EA, HSUEH AJW. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. *Endocrine Reviews*. 2000; 21(2): 200–214.
- MEINERS S, EICKELBERG O, KÖNIGSHOFF M. Hallmarks of the ageing lung. *European Respiratory Journal*. 2015; ERJ-1869.
- MICHAELIS DICIONÁRIO BRASILEIRO DA LÍNGUA PORTUGUESA. Consulta Online dos termos “envelhecer”, “envelhecimento”, “senescência”, “senescente” e “velho”. Disponível em: <http://michaelis.uol.com.br/moderno-portugues/busca/portugues-brasileiro/envelhecer>. Acessado em 26/09/2017.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE – BR. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. Indicadores de vigilância em saúde descritos segundo a variável raça/cor, Brasil. 2017; Vol.48 nº 4. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/17/Indicadores-de-Vigilancia-em-Saude-descritos-segundo-ra-a-cor.pdf>. Acessado em 15/11/2017.
- MONCADA S, PALMER RMJ, HIGGS EA. Nitric oxide: pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991; 43:109-42.
- OLOFSSON PS, KATZ DA, ROSAS-BALLINA M, LEVINEYA, OCHANI M, VALDÉS-FERRER SI, *et al.*  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptor ( $\alpha 7$ nAChR) Expression in Bone Marrow–Derived Non–T Cells Is Required for the Inflammatory Reflex. *Mol med*. 2012; 18: 539-543.
- PANGRAZZI L, MERYK A, NAISMITH E, KOZIEL E, LAIR J, KRISMER M, TRIEB K, GRUBECK-LOEBENSTEIN B. “Inflamm-aging” influences immune cell survival factors in human bone marrow. *Eur J Immunol*. 2016; Dec 19. doi: 10.1002/eji.201646570.
- PAVLOV VA, TRACEY KJ. The cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2005; 19: 493–499.
- PINHEIRO NM, MIRANDA CJCP, PERINI A, CÂMARA NOS, COSTA SKP, ALONSO-VALE MIC, . Pulmonary Inflammation Is Regulated by the Levels of the Vesicular Acetylcholine Transporter. *PLoS ONE*. 2015; 10(3): e0120441.
- PINHEIRO NM, SANTANA FPR, ALMEIDA RR, GUERREIRO M, MARTINS MA, CAPERUTO LC, CAMARA NOS, WENSING LA, PRADO VF, TIBERIO IFLC, PRADO MAM, PRADO CM. Acute lung injury is reduced by the  $\alpha 7$ nAChR agonist PNU-282987 through changes in the macrophage profile. *FASEB J*. 2017; 31: 320-332.
- PRADO CM, LEICK-MALDONADO EA, ARATA V, KASAHARA DI, MARTINS MA, TIBÉRIO IFLC. Neurokinins and inflammatory cell iNOS expression in guinea pigs with

- chronic allergic airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005; 288: L741–L748.
- PRADO VF, MARTINS-SILVA C, DE CASTRO BM, LIMA RF, BARROS DM, AMARAL E, et al. Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron*. 2006a; 51: 601–612. PMID: 16950158.
- PRADO CM, LEICK-MALDONADO EA, YANO L, LEME AS, CAPELOZZI VL, MARTINS MA, TIBÉRIO IFLC. Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway inflammation and remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006b; 35(4): 457-65.
- PRADO CM, ROCHA GZ, LEICK-MALDONADO EA, STARLING CM, CAPELOZZI VL, MARTINS MA, TIBÉRIO IFLC. Inactivation of capsaicin -sensitive nerves reduces pulmonary remodeling in guinea pigs with chronic allergic pulmonary inflammation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2011; 44(2): 130-9.
- PRITZ T, WEINBERGER B, GRUBECK-LOEBENSTEIN B. The aging bone marrow and its impact on immune responses in old age. *Immunology Letters*. 2014; 162: 310–315.
- PROSKOCIL BJ, SEKHON HS, JIA Y, SAVCHENKO V, BLAKELY RD, LINDSTROM J, SPINDEL ER. Acetylcholine Is an Autocrine or Paracrine Hormone Synthesized and Secreted by Airway Bronchial Epithelial Cells. *Endocrinology*. 2004; 145(5): 2498–2506.
- PUCHTA A, NAIDOO A, VERSCHOOR CP, LOUKOV D, THEVARANJAN N, MANDUR TS, NGUYEN PS, JORDANA M, LOEB M, XING Z, KOBZIK L, LARCHÉ MJ, BOWDISH DM. TNF drives monocyte dysfunction with age and results in impaired anti-pneumococcal immunity. *PLoS Pathog*. 2016; 12, e1005368.
- RAHMAN I, ADCOCK IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J*. 2006; 28: 219–242.
- RENSHAW M, ROCKWELL J, ENGLEMAN C, GEWIRTZ A, KATZ J, SAMBHARA S. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J Immunol*. 2002; 169(9): 4697-701.
- REUTER S, GUPTA SC, CHATURVEDI MM, AGGARWAL BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*. 2010; 49(11): 1603-1616.
- RIFFO-VASQUEZY, OLIVEIRA APL, PAGECP, SPINA D, TAVARES-DE-LIMA W. Role of sex hormones in allergic inflammation in mice. *Clinical and Experimental Allergy*. 2007; 37: 459–470.
- ROSAS-BALLINA M, OCHANI M, PARRISH WR, OCHANI K, HARRIS YT, HUSTON JM, CHAVAN S, TRACEY KJ. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:11008–13.

- ROSAS-BALLINA M, OLOFSSON PS, OCHANI M, VALDÉS-FERRER SI, LEVINE YA, REARDON C, TUSCHE MW, PAVLOV VA, ANDERSSON U, CHAVAN S, MAK TW, TRACEY KJ. Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit. *Science*. 2011; 334: 98-101.
- ROSAS-BALLINA M, TRACEY KJ. Cholinergic control of inflammation. *J Intern Med* 2009; 265: 663–679.
- ROY A, FIELDS WC, ROCHA-RESENDE C, RESENDE RR, GUATIMOSIM S, PRADO VF, GROS R, PRADO MAM. Cardiomyocyte-secreted acetylcholine is required for maintenance of homeostasis in the heart. *FASEB J*. 2013; 27: 5072–5082.
- SANGO K, MCDONALD MP, CRAWLEY JN, MACK ML, TIFFT CJ, SKOP E, STARR CM, HOFFMANN A, SANDHOFF K, SUZUKI K, PROIA RL. Mice lacking both subunits of lysosomal beta-hexosaminidase display gangliosidosis and mucopolysaccharidosis. *Nat Genet*. 1996; 14: 348–352.
- SHARMA G, HANANIA NA, SHIM YM. The aging immune system and its relationship to the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2009; 6(7): 573-580.
- SHAW AC, JOSHI S, GREENWOOD H, PANDA A, LORD JM. Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol*. 2010; 22(4): 507-13.
- SHIMADA A, HASEGAWA-ISHII S. Senescence-accelerated Mice (SAMs) as a Model for Brain Aging and Immunosenescence. *Aging and Disease*. 2011; 2(5): 414-436.
- SU X, LEE JW, MATTHAY ZA, MEDNICK G, UCHIDA T, FANG X, et al. Activation of the alpha7 nAChR reduces acid-induced acute lung injury in mice and rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007; 37:186-92.
- SU X, MATTHAY MA, MALIK AB. Requisite Role of the Cholinergic  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptor Pathway in Suppressing Gram-Negative Sepsis-Induced Acute Lung Inflammatory Injury. *J Immunol*. 2010; 184(1): 401–410.
- TOAPANTA FR, ROSS TM. Impaired immune responses in the lungs of aged mice following influenza infection. *Respir Res*. 2009; 10:112.
- TRACEY KJ. The inflammatory reflex. *Nature*. 2002; 420: 19-26.
- VAROQUI H, ERICKSON JD. Membranes and Bioenergetics: Active Transport of Acetylcholine by the Transporter Human Vesicular Acetylcholine. *J. Biol. Chem*. 1996; 271: 27229-27232.
- WANG H, BLOOM O, ZHANG M, VISHNUBHAKAT JM, OMBRELLINO M, CHE J, FRAZIER A, YANG H, IVANOVA S, BOROVIKOVA L, MANOGUE KR, FAIST E, ABRAHAM E, ANDERSSON J, ANDERSSON U, MOLINA PE, ABUMRAD NN, SAMA A, TRACEY KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*. 1999; 285: 248–251.

- WEIBEL, E. R. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab. Invest.* 1963; 12: 131–155.
- WEINERT BT, TIMIRAS PS. Physiology of Aging - Invited Review: Theories of aging. *J Appl Physiol* 95: 1706–1716, 2003.
- YANG X, C. ZHAO C, GAO Z AND SU X. A novel regulator of lung inflammation and immunity:pulmonary parasympathetic inflammatory reflex. *QJM Advance Access.* 2014.
- ZHOU-SUCKOW S, DUERR J, HAGNER M. Airway mucus, inflammation and remodeling: emerging links in the pathogenesis of chronic lung diseases. *Cell Tissue Res.* 2017; 367(3): 537-550.
- ZHOU S, WRIGHT JL, LIU J, SIN DD, CHURG A. Aging does not enhance experimental cigarette smoke-induced COPD in the mouse. *PloS one.* 2013; 8(8), e71410.