

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ROBERTA CRISTELLI FONSECA

UM CIRCUITO NEURO-HEPÁTICO MODULA A ATIVIDADE
DE MACRÓFAGOS RESIDENTES NO FÍGADO

Belo Horizonte

2018

Roberta Cristelli Fonseca

Um circuito neuro-hepático modula a atividade de macrófagos residentes no fígado

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, para a obtenção do título de mestra em Fisiologia e Farmacologia, com ênfase em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. André Gustavo Oliveira

Belo Horizonte
Universidade Federal de Minas Gerais
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelos dons concedidos e a fé que me guia.

Agradeço aos meus pais, Angélica e Roberto, por todo o amor, suporte e dedicação. Sou infinitamente grata por serem meu porto-seguro e minha motivação para seguir em frente.

Agradeço ao meu irmão, Thiago, pela companhia, amor, amizade, carinho, força e exemplos.

Agradeço à minha cunhada, Jana, por sua paciência, carinho, atenção e por ter se tornado uma querida irmã.

Agradeço ao meu tio Gera, pela admiração e amor infinito.

Agradeço à minha madrinha, tia Dora, por seus incentivos, apoio e suporte para que eu alcance qualquer sonho.

Agradeço à torcida de toda minha família, especialmente minhas avós, Inhazinha e Tita.

Agradeço aos meus amigos que mesmo à distância me proporcionaram alegria e conforto.

Agradeço à Professora Denise Carmona, minha primeira orientadora, pelo carinho e por todas as portas que me abriu.

Agradeço, com profunda admiração ao meu orientador, André, por acreditar no meu trabalho, pelo grande exemplo de cientista e ser humano a ser seguido e por suas contribuições para minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

Agradeço ao Liver Center.

Agradeço ao Professor Gustavo Menezes por todo o suporte, o qual foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a todos os amigos do CGB, pela parceria, amizade e companhia.

Agradeço aos Professores do programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, Marco Antônio Peliky, Silvia Guatimosim, Lucíola Barcelos, Daniela Bonaventura e Maristela Poletini, colaboradores deste trabalho.

Agradeço à aluna do programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, Nathália de Nobrega, pela colaboração e contribuição ao meu trabalho.

Agradeço aos amigos e funcionários do programa Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

Agradeço ao Professor Pesquero, por compartilhar seu laboratório com muito carisma.

Agradeço aos Professores Valbert Cardoso e Simone Odília, da faculdade de Farmácia da UFMG, pela colaboração.

Agradeço aos colaboradores da USP de Ribeirão Preto, Alexandre Kanashiro, Gabriel Bassi e Thiago Cunha.

Agradeço às agências de fomento, Capes, Fapemig e CNPq.

“A imaginação é mais importante que o conhecimento.
Enquanto o conhecimento define tudo que conhecemos e compreendemos,
a imaginação ressalta tudo que ainda podemos descobrir e criar.”

-Albert Einstein

RESUMO

Um circuito neuro-hepático modula a atividade de macrófagos residentes no fígado

O trato gastro-intestinal (GI) está exposto à uma larga população de micro-organismos comensais e, ainda, exerce o importante papel de barreira imunológica contra agentes patogênicos como bactérias invasivas, toxinas e outros patógenos. Em paralelo, o trato GI orchestra funções fisiológicas na absorção de nutrientes, metabolismo e excreção. Esse potencial conflito, é balanceado pela ação de circuitos neurais que monitoram o lúmen do trato GI e montam os reflexos apropriados para conter respostas inflamatórias e promover a tolerância tecidual. Este estudo investigou o impacto da ativação de tais circuitos neurais no fígado, um órgão chave na interface entre o patrulhamento imunológico do GI e o metabolismo do organismo. Após a estimulação elétrica do nervo vago (VNS), o principal nervo para os órgãos do trato GI, macrófagos residentes do fígado (células de Kupffer) apresentaram alterações morfológicas, incluindo extensões de membrana e superfície aumentada, características de ativação de macrófagos. Usando imageamento *in vivo*, nós mostramos um aumento na fagocitose de *E.coli^{gfp}* por células de Kupffer seguido de VNS, que foi abolido por vagotomia. Esse resultado foi confirmado usando estanho coloidal ⁹⁹Tc-Tin e cintilografia. Em adição, VNS não modulou a expressão de IL-10, TNF- α e IL-6. Para descobrir se esse era um efeito direto no fígado, nós submetemos camundongos a remoção do gânglio celíaco (CGX), esplenectomia (SPX) ou adrenalectomia bilateral (ADX) seguido ou não por VNS. Nós observamos que o gânglio celíaco, o baço e as glândulas adrenais não são cruciais para a ativação do circuito vagal no fígado, embora eles possam modular essa resposta. Esse efeito direto foi corroborado pelos achados de fibras do nervo vago (marcadas com o neurotraçador DIO 488) em contato próximo com as células de Kupffer. Visto que a acetilcolina é o principal neurotransmissor associado com as fibras eferentes do nervo vago, nós inibimos farmacologicamente a via de sinalização colinérgica usando mecamilamina e metilatropina (i.v. 1mg/Kg), os quais são antagonistas dos receptores muscarínicos e nicotínicos de acetilcolina, respectivamente. Nós observamos um decaimento da fagocitose de *E.coli^{gfp}* pelas células de Kupffer dos animais tratados com as drogas em comparação com os animais controles. Para corroborar esses achados, nós utilizamos um modelo animal de deficiência na sinalização colinérgica (VACht KD^{hom}). Comparados com camundongos WT, células de Kupffer de

animais VAcHt KD^{hom} apresentaram atividade reduzida de fagocitar bactérias. A funcionalidade do reflexo neuroimunológico descrito no estudo durante um desafio imunológico foi testada em um modelo de sepse subletal (CLP), no qual VNS resultou na diminuição de colônias bacterianas formadas no fígado de animais submetidos à CLP e induziu a expressão de IL-10 e IL-6, sem alterar os níveis de TNF- α . Juntos, nossos resultados apontam para um novo circuito neuro-hepático que regulam as atividades de fagocitose e secreção pelas células de Kupffer, promovendo um microambiente anti-inflamatório e pró regenerativo dentro do fígado.

Palavras-chave: Fagocitose; nervo vago; fígado; células de Kupffer; circuito neuroimunológico.

ABSTRACT

A brain-liver circuit modulates resident macrophages activity in the liver

The gastrointestinal (GI) tract is exposed to a large population of commensal microorganisms and plays a pivotal barrier and immunological role against pathogenic agents such as invasive bacteria, toxins and other pathogens. In parallel, GI tract orchestrates physiological functions in nutrient absorption, metabolism and excretion. This potential conflict is balanced by the action of neural circuits which monitor the GI lumen and mount proper reflexes to counter-act inflammatory responses and promote tissue tolerance. This study investigated the impact of the activation of such neural circuits in the liver, a key organ in the interface between GI's immunesurveillance system and the metabolism of the organism. Following the electrical stimulation of the vagus nerve (VNS), a major nerve to GI organs, liver resident macrophages (Kupffer cells) presented morphological alterations, including membrane extensions and increased surface, characteristic of macrophage activation. Using *in vivo* imaging, we showed an increase in the phagocytosis of *E.coli*^{gfp} by Kupffer cells after VNS that was abolished by vagotomy. This result was confirmed by using colloidal ⁹⁹Tc-Tin and scintillography. Additionally, VNS did not modulate IL-10, TNF- α and IL-6 levels. To address whether this was a direct effect on the liver, we submitted mice to celiac ganglion removal (CGX), splenectomy (SPX) or bilateral adrenalectomy (ADX) followed or not by VNS. We observed that the celiac ganglion, spleen and adrenal glands are not crucial for the activation of the vagal circuit in the liver, although they partly modulate this response. This direct effect was corroborated by the finding of vagus nerve fibers (stained with neurotracker DiO 488) in close contact with Kupffer cells. As acetylcholine is the main neurotransmitter associated to efferent vagus nerve fibers, we pharmacologically inhibited the cholinergic signaling pathway by using mecamylamine and methyl atropine (i.v. 1mg/Kg), which are antagonists of nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors respectively. We observed a decrease in *E.coli*^{gfp} phagocytosis of Kupffer cells in mice treated with the drugs when compared with control animals. To corroborate these findings, we used an animal model of cholinergic signaling deficiency (VACHT KD^{hom}). Compared to WT mice, Kupffer cells from VACHT KD^{hom} animals showed reduced ability to phagocytize bacteria. The functionality of the neuroimmune reflex described in the study during an immune challenge was addressed in a non-lethal sepsis model (CLP), on which VNS resulted in a decrease in bacterial colony formation in the livers of mice submitted to CLP and induced the expression of Il-10 and Il-6, with no changes in

TNF α levels. Taken together our results point to a new brain-liver circuit that regulates Kupffer cells phagocytic and secretory activities, promoting a protective, anti-inflammatory and pro-regenerative microenvironment within the liver.

Key words: Phagocytosis, vagus nerve, liver, Kupffer cells, neuroimmune circuitry.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - O reflexo inflamatório.....	21
FIGURA 2 - Protocolo de estimulação elétrica do nervo vago.....	27
FIGURA 3 - Protocolo de estimulação elétrica do nervo vago proximal.	29
FIGURA 4 - Protocolo de microscopia intravital.....	30
FIGURA 5 - Localização anatômica do gânglio celíaco.....	37
FIGURA 6 - Teste de eficiência do protocolo de estimulação do nervo vago.....	40
FIGURA 7 - Estimulação elétrica do nervo vago altera a morfologia das células de kupffer. 41	
FIGURA 8 - Estimulação elétrica do nervo vago aumenta a atividade de fagocitose pelas células de Kupffer.....	43
FIGURA 9 - Ativação do nervo vago não alterou o fluxo sanguíneo e nem o número de células de Kupffer.....	49
FIGURA 10 - Dinâmica de fagocitose dos macrófagos residentes do fígado é impactada pelo tônus vagal eferente.....	46
FIGURA 11 - A estimulação do nervo vago aumentou a depuração de bactérias pelos macrófagos hepáticos Crecimento bacteriano do fígado de animais dos grupos.	48
FIGURA 12 - Estimulação do nervo vago não altera os níveis séricos da enzima alanina transferase (ALT).	50
FIGURA 13 - Esquema da hipótese de que o nervo vago modula, diretamente, a atividade das células de Kupffer.....	51
FIGURA 14: Existe um ramo hepático do reflexo anti-inflamatório colinérgico.....	53
FIGURA 15 - Ativação do nervo vago não alterou concentrações séricas de corticosterona. n=4.	54

FIGURA 16 - Proximidade entre o nervo vago e as células de Kupffer. Imagem de microscopia confocal 3D, mostrando.....	55
FIGURA 17 - A modulação da sinalização colinérgica reduz a atividade basal de fagocitose nos macrófagos residentes do fígado.	57
FIGURA 18 - A estimulação do nervo vago não altera a expressão de citocinas hepáticas imediatamente. Expressão relativa das citocinas.....	59
FIGURA 19 - Perfil secretório das células de Kupffer em resposta à VNS.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADX	Adrenalectomia
ADX+VNS	Adrenalectomia seguida de estimulação do nervo vago
ALT	Alanina-aminotransferase
BPM	Batimentos por Minuto
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CEBIO	Centro de Bioterismo
CGX	Remoção do Gânglio Celíaco
CGX+VNS	Remoção do Gânglio Celíaco Seguida de Estimulação do Nervo Vago
CLP	<i>Cecal Ligation and Puncture</i>
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos Teciduais
DMN	Núcleo Dorsal Motor do Vago
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
G	Gravidade
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GI	Gastrointestinal
H	Horas
HR	Heart Rate
HZ	Hertz
<i>i.v</i>	Intravenosa
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IL-10	Interleucina 10
IL-18	Interleucina 18
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
<i>ip</i>	Intraperitoneal
Kg	Kilograma
LEHR	<i>Low Energy High Resolution</i>
JACK2	Proteína quinase tirosina 2
LPS	Lipopolissacarídeo

MBq	Megabecquerels
mCi	Miliquirri
Meca	Mecamilamina
MetA	Metilatropina
Mg	Miligrama
Min	Minuto
MM	Massa Molar
mRNA	RNA mensageiro
Ms	Milissegundo
NaCl	Cloreto de Sódio
NAFLD	<i>Nonalcoholic Fatty Liver Disease</i>
NF- κ B	Factor Nuclear κ B
NK	<i>Natural killer</i>
NKT	<i>Natural killer T</i>
NPCs	<i>Non Parenchymal Cells</i>
NTS	Núcleo do Trato Solitário
OD	<i>Optical Density</i>
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PR	Pureza Radioquímica
PRRs	Receptores de Reconhecimento Padrão
Rpm	Rotações por Minuto
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SEM	<i>Standard Error of Mean</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SPX	Esplenectomia
SPX+ VNS	Esplenectomia Seguida de Estimulação do Nervo Vago
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
TLR4	Receptor do Tipo Toll 4
TLR9	Receptore do Tipo Toll 9
Tn ⁹⁹	Tecnécio
TNF α	Fator de Necrose Tumoral α
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

V	Voltz
VNS	<i>Vagus Nerve Stimulation</i>
VNX	Vagotomia
WT	<i>Wild Type</i>
$\alpha 7$ nAChR	Receptor Nicotínico de Acetilcolina $\alpha 7$

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1	O Trato Gastrointestinal	16
2.2	Nervo vago	17
2.3	O Reflexo Colinérgico Anti-Inflamatório	18
2.4	Fígado	22
2.5	Células de Kupffer	23
3	OBJETIVO.....	25
3.1	Objetivos Gerais:	25
3.2	Objetivos específicos:	25
4	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL, MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	Animais	26
4.2	Estimulação elétrica do nervo vago (VNS)	26
4.3	Vagotomia cervical	28
4.4	Dosagem de alanina-aminotransferase (ALT) sérica	29
4.5	Crescimento e contagem de bactérias (<i>E.coli</i>^{sgfp})	29
4.6	Microscopia intravital do fígado	29
4.7	Quantificação do número de células de Kupffer.	30
4.8	Análise da atividade de fagocitose das células de Kupffer por microscopia intravital confocal	31
4.9	Obtenção de soro, tecidos e eutanásia.	31
4.10	Quantificação de mRNA por RT- PCR das citocinas hepáticas	31
4.10.1	Extração do RNA	32
4.10.2	Síntese do cDNA	32
4.10.3	PCR em tempo Real	33
4.11	Monitoramento e imagem do fluxo sanguíneo sistêmico	33
4.12	Análise da atividade de fagocitose das células de Kupffer por cintilografia	34
4.12.1	Procedimento de marcação do Estanho Coloidal com tecnécio-99m	34
4.12.2	Pureza radioquímica (PR)	34
4.12.3	Imagens cintilográficas e quantificação da radiação	34
4.13	Investigação da presença de fibras nervo vago no fígado por meio de neurotraçador .	35
4.14	Modulação da atividade de fagocitose das células de Kupffer pelo nervo vago e sua relevância em um modelo de sepse subletal.	35

4.15	Esplenectomia (SPX), Adrenolectomia bilateral (ADX) e remoção do gânglio celíaco (CGX)	36
4.16	Participação da sinalização colinérgica na regulação da atividade fagocitária das células de Kupffer	37
4.17	Análise estatística	38
5	RESULTADOS	39
5.1	Padronização do estímulo elétrico do nervo vago.	39
5.2	Estimulação elétrica do nervo vago ativa os macrófagos residentes no fígado.	41
5.3	Estimulação elétrica do nervo vago aumenta a fagocitose das células de Kupffer	41
5.4	Estimulação elétrica do nervo vago aumenta a depuração de bactérias no fígado	46
5.5	A estimulação do nervo vago não altera o fluxo sanguíneo ou o número de células de Kupffer ou lesiona o fígado	48
5.6	O circuito neuroimunológico mediado pelo nervo vago tem ações diretas no fígado	50
5.7	Proximidade espacial entre fibras colinérgicas e células de Kupffer	55
5.8	Inibição da sinalização colinérgica resulta em redução da atividade basal dos macrófagos hepáticos	55
5.9	Estimulação elétrica do nervo vago modula o perfil secretório hepático	58
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÃO	67
8	REFERÊNCIAS	68

2 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O trato gastrointestinal (GI) desempenha suas funções fisiológicas de secreção, absorção e motilidade em um ambiente rico em micro-organismos simbiotes (microbiota) e patogênicos, além de diversas toxinas que podem desencadear respostas inflamatórias (GALLO; HOOPER, 2012). O equilíbrio entre fisiologia e a atividade do sistema imunológico no trato GI é conferido principalmente pela ação de circuitos neurais, que permitem ao organismo monitorar o ambiente externo e interno quanto à presença de estímulos nocivos e integrar respostas apropriadas aos mesmos (CHAVAN; PAVLOV; TRACEY, 2017). Dentre esses circuitos neurais, aquele mediado pelo nervo vago é o mais estudado, principalmente pelo fato desse nervo interagir com a grande maioria dos sistemas fisiológicos periféricos e por possuir capacidade de modular o sistema imunológico (TRACEY, 2002). Nesse sentido, foi demonstrado que o estímulo do nervo vago é capaz de reduzir a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias, além de promover a diferenciação de macrófagos para um fenótipo pró-resolutivo e pró-regenerativo. O referido circuito foi denominado como “sinalização colinérgica anti-inflamatória” (BOROVIKOVA et al., 2000b; TRACEY, 2002).

De todos os órgãos da cavidade abdominal, o fígado é o que recebe a maior quantidade de fibras do nervo vago, tanto aferentes quanto eferentes. Para se ter uma ideia, aproximadamente 30% de todas as fibras vagais subdiafragmáticas são encontradas no ramo hepático comum do nervo vago (BERTHOUD; CARLSON; POWLEY, 1991; BERTHOUD; NEUHUBER, 2000). Em adição, o parênquima hepático possui o maior sistema retículoendotelial do organismo, sendo composto principalmente por macrófagos residentes (células de Kupffer) com grande atividade fagocítica (KRENKEL; TACKE, 2017), além de possuir localização anatômica estratégica, recebendo o sangue drenado da maior parte do TGI pela veia porta hepática (do terço distal do esôfago ao terço proximal do intestino grosso) (MACPHERSON; HEIKENWALDER; GANAL-VONARBURG, 2016). Essas características fazem do fígado um órgão importante no monitoramento imunológico do organismo e alterações nessa função geralmente aumentam a susceptibilidade do organismo à sepse, como observado em pacientes após o transplante hepático ou acometidos por hepatite alcoólica (GUSTOT et al., 2017). Surpreendentemente, apesar do fígado ser um ponto chave na convergência entre o circuito anti-inflamatório colinérgico e o sistema imune, o papel da ativação do nervo vago em condições fisiológicas na imunologia hepática ainda é desconhecida. Sendo assim, no presente estudo, nós investigamos o papel do circuito anti-inflamatório no

2 fígado, buscando caracterizar os impactos da ativação desse reflexo na atividade das células de
Kupffer bem como os componentes envolvidos no circuito.

4 Nosso projeto tem aplicações translacionais e básicas muito importantes.
Primeiramente, pela relevância clínica dos nossos resultados. Doenças do fígado afetam mais
6 de um bilhão de pessoas no mundo. No Brasil, essas doenças foram a causa de mais de 800.000
admissões hospitalares no período de 2001 a 2010 e a oitava causa de morte no mesmo período
8 (NADER; DE MATTOS; BASTOS, 2014). Os custos no setor de saúde associados a esses
pacientes ultrapassam a quantia de R\$38 bilhões, somente no Brasil (DATASUS, 2017). O
10 impacto negativo que as doenças hepáticas apresentam no setor da saúde pública e econômico
no Brasil tende a piorar nos próximos anos haja visto que a prevalência das mesmas está
12 aumentando nas últimas décadas (NADER; DE MATTOS; BASTOS, 2014). As etiologias mais
comuns das patologias hepáticas incluem esteatose hepática não alcoólica (NAFLD), doenças
14 hepáticas alcoólicas e infecções crônicas pelo vírus da hepatite B e C (CLARK, 2006; REHM
et al., 2010). Todas essas doenças acarretam em morte de hepatócitos e, conseqüentemente, em
16 uma resposta inflamatória crônica (SCHOEMAKER; MOSHAGE, 2004). Independentemente
da etiologia das doenças hepáticas, a inflamação é um sinal importante que está relacionado
18 com um prognóstico ruim para o paciente. Assim, o entendimento da fisiologia de um eixo anti-
inflamatório pode expandir as vias para a identificação de novos alvos terapêuticos. Depois,
20 mas não menos importante, porque investigamos um novo aspecto relacionado ao reflexo
neuroimunológico mediado pelo nervo vago, nossos resultados também tem o potencial de
22 estabelecer um novo paradigma no campo da neuroimunologia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O Trato Gastrointestinal

4

O trato gastrointestinal (GI) possui uma extensa superfície que está em constante contato com o meio externo (GALLO; HOOPER, 2012). Ao longo da extensão gastrointestinal, importantes funções vitais são exercidas, como absorção de nutrientes e líquidos e secreção de diversas substâncias (MAGALHAES; TATTOLI; GIRARDIN, 2007). Além disso, o trato gastrointestinal abriga uma vasta população de micro-organismos comensais, constituída por aproximadamente 500 espécies e totalizando 10^{14} células que, em conjunto, são denominadas microbiota (FUNG; OLSON; HSIAO, 2017; MAGALHAES; TATTOLI; GIRARDIN, 2007). A interação do trato gastrointestinal com a microbiota modula o metabolismo de nutrientes e o desenvolvimento do sistema imunológico (HONDA; LITTMAN, 2016). O trato GI também é exposto a toxinas e micro-organismos patogênicos, incluindo vírus e bactérias, devido à sua comunicação com o meio externo (GALLO; HOOPER, 2012). Nesse contexto, o TGI precisa de mecanismos precisos para controlar a interação com a microbiota e conter patógenos invasores, ao mesmo tempo em que desempenha suas funções nutricionais e metabólicas.

18

A primeira linha de defesa contra a invasão de micro-organismos no trato GI é a presença de um tecido epitelial especializado, formado por epitélio prismático pseudoestratificado, que pode ser estratificado em alguns órgãos como o esôfago, e com células caliciformes. Esse epitélio apresenta complexo juncional desenvolvido, composto por junções de oclusão, junções de adesão, além de produzir muco. A lâmina própria é contínua e delimita a região da mucosa (MADARA, 1990). Em adição, a homeostase do sistema digestivo também é mantida por células que desempenham a função de imunidade inata e adaptativa, as quais podem ser encontradas entre as células epiteliais, sendo denominadas leucócitos intraepiteliais, ou em órgãos linfoides secundários, como as placas de Peyer ou nódulos linfáticos e tecido linfoide difuso isolados (MAGALHAES; TATTOLI; GIRARDIN, 2007).

28

Um sistema com funções tão complexas e paradoxais como o trato GI não funciona de forma independente. A participação de outros sistemas fisiológicos é de extrema importância para a atividade do sistema digestivo. Interações entre o trato gastrointestinal e sistema nervoso vem sendo descritas desde o século 19, quando Ivan Petrovich Pavlov demonstrou elegantemente a existência de reflexos condicionados no trato gastrointestinal. Os experimentos de Pavlov mostraram que estímulos sensoriais como visão e odor podem disparar a secreção de substâncias no trato gastrointestinal (POWELL; WALKER; TALLEY, 2017). Nas últimas

34

2 décadas a comunicação entre os sistemas nervoso e gastrointestinal tem sido evidenciada pelo
estudo do eixo cérebro-intestino o qual permite a interação entre os sistemas nervoso,
4 imunológico, trato gastrointestinal e seus micro-organismos simbiotes (WILLIAMS et al.,
2016). A interação entre esses sistemas é bidirecional, ou seja, alterações no sistema nervoso
6 (estresse, por exemplo) ocasionam distúrbios gastrointestinais. Em contrapartida, a perda da
homeostase do trato GI interfere no funcionamento do sistema nervoso, provocando alterações
8 neurogênicas e comportamentais (BANKS, 2015; ERICKSON; DOHI; BANKS, 2012; REA;
DINAN; CRYAN, 2016; ROOK; RAISON; LOWRY, 2014). A comunicação entre os sistemas
10 nervoso, gastrointestinal e imunológico é evidenciada por diversos modelos experimentais
(LARAUCHE; MULAK; TACHÉ, 2012; LENNON et al., 2013; QIU et al., 1999; REN et al.,
12 2007; VARGHESE et al., 2006). Um bom exemplo é o modelo experimental de separação
materno fetal que predispõe os animais ao comportamento depressivo, alterações na barreira
14 gastrointestinal e colite durante a vida adulta. Essa situação pode ser revertida pelo tratamento
dos animais com antidepressivos (VARGHESE et al., 2006). Além disso, foi descrito que a
16 microbiota é capaz regular o desenvolvimento do sistema nervoso e o comportamento,
concomitantemente com a ativação do sistema imunológico periférico, modulação dos
18 processos de neuroinflamação, injúria cerebral, auto-inflamação e neurogênese (FUNG;
OLSON; HSIAO, 2017; HEIJTZ et al., 2011; LEE et al., 2011; VARGHESE et al., 2006).

20 Outra importante via de comunicação entre o sistema nervoso e o trato
gastrointestinal é o nervo vago, uma vez que o mesmo inerva quase todo o tubo digestivo, desde
22 o terço distal do esôfago até o intestino grosso, além de órgãos anexos, como fígado, vesícula
biliar (quando presente) e pâncreas (BERTHOUD; CARLSON; POWLEY, 1991).
24 Recentemente foram identificadas duas subpopulações do nervo vago que inervam regiões
distintas do sistema digestivo e são responsivas à estímulos específicos. As fibras aferentes do
26 nervo vago que inervam a lamina própria intestinal, próximas ao lúmen, detectam a presença
de nutrientes. Por outro lado, as fibras situadas mais distantes do lúmen, na camada muscular,
28 são sensíveis à distensão mecânica do trato gastrointestinal (WILLIAMS et al., 2016).

2.2 Nervo vago

30 O nervo vago, ou X nervo craniano, é o principal componente do sistema nervoso
autônomo parassimpático (PAVLOV; TRACEY, 2012a). Seu nome deriva da palavra em
32 Latim “*vagus*”, cujo significado mais próximo em Português é “errante”. Essa nomenclatura foi
utilizada pela característica anatômica do nervo, que possui um caminho tortuoso, que se desvia

2 do traçado original, e inerva diversos órgãos, incluindo coração, pulmão e o trato
gastrointestinal. O X nervo craniano é considerado misto por possuir fibras aferentes
4 (sensoriais) e eferentes (motoras) (BERTHOUD; NEUHUBER, 2000). Em camundongos o
nervo vago é composto por aproximadamente 2.300 fibras aferentes e um número bem menor
6 de fibras eferentes (WILLIAMS et al., 2016).

As fibras aferentes do nervo vago enviam informações sensoriais viscerais para o
8 núcleo do trato solitário, NTS, na medula oblongata. Em seguida, essas fibras integram a
informação com o hipotálamo e regiões cerebrais superiores responsáveis pelo controle das
10 funções autonômicas e respostas comportamentais (GOEHLER et al., 2000). A comunicação
bidirecional entre os neurônios do NTS e do núcleo motor dorsal do nervo vago (DMN) ativa
12 fibras eferentes que descem para diversos órgãos periféricos incluindo o trato
gastrointestinal e os órgãos componentes do sistema reticuloendotelial (BERTHOUD;
14 NEUHUBER, 2000; PAVLOV; TRACEY, 2017). As fibras eferentes do nervo vago são
moduladas no sistema nervoso central pelos receptores muscarínicos de acetilcolina (PAVLOV
16 et al., 2006; PAVLOV; TRACEY, 2012a).

A sinalização parassimpática participa diretamente do controle homeostático do
18 indivíduo uma vez que regula diversas funções vitais, como por exemplo a frequência cardíaca,
secreção e motilidade intestinal, produção hepática de glicose, dentre outras funções viscerais
20 (PAVLOV; TRACEY, 2012a). Além dessas funções, nas últimas décadas o nervo vago tem
sido apontado como mediador da interação entre o sistema nervoso e o sistema imunológico,
22 sendo sua participação indispensável para o reflexo inflamatório (PAVLOV; TRACEY, 2012a;
TRACEY, 2002).

24 **2.3 O Reflexo Colinérgico Anti-Inflamatório**

O patrulhamento do organismo e a defesa contra agentes patogênicos e danos
26 teciduais diversos são funções vitais desempenhadas pelo sistema imunológico: este é capaz de
detectar estímulos potencialmente nocivos ao organismo e gerar uma resposta adequada para
28 conter e eliminar a fonte desse estímulo. Uma das respostas importantes é o processo
inflamatório, uma resposta local, de proteção contra agentes patogênicos invasivos ou não e
30 que deve ser finamente regulada (TRACEY, 2002) (FIGURA 1). Uma resposta inflamatória
enfraquecida pode facilitar o desenvolvimento de processos infecciosos. Por outro lado, uma
32 inflamação exacerbada pode ser a causa de morbidade e mortalidade em doenças como artrite
reumatoide, doença de Crohn, arteroesclerose, doença de Alzheimer, esclerose múltipla,

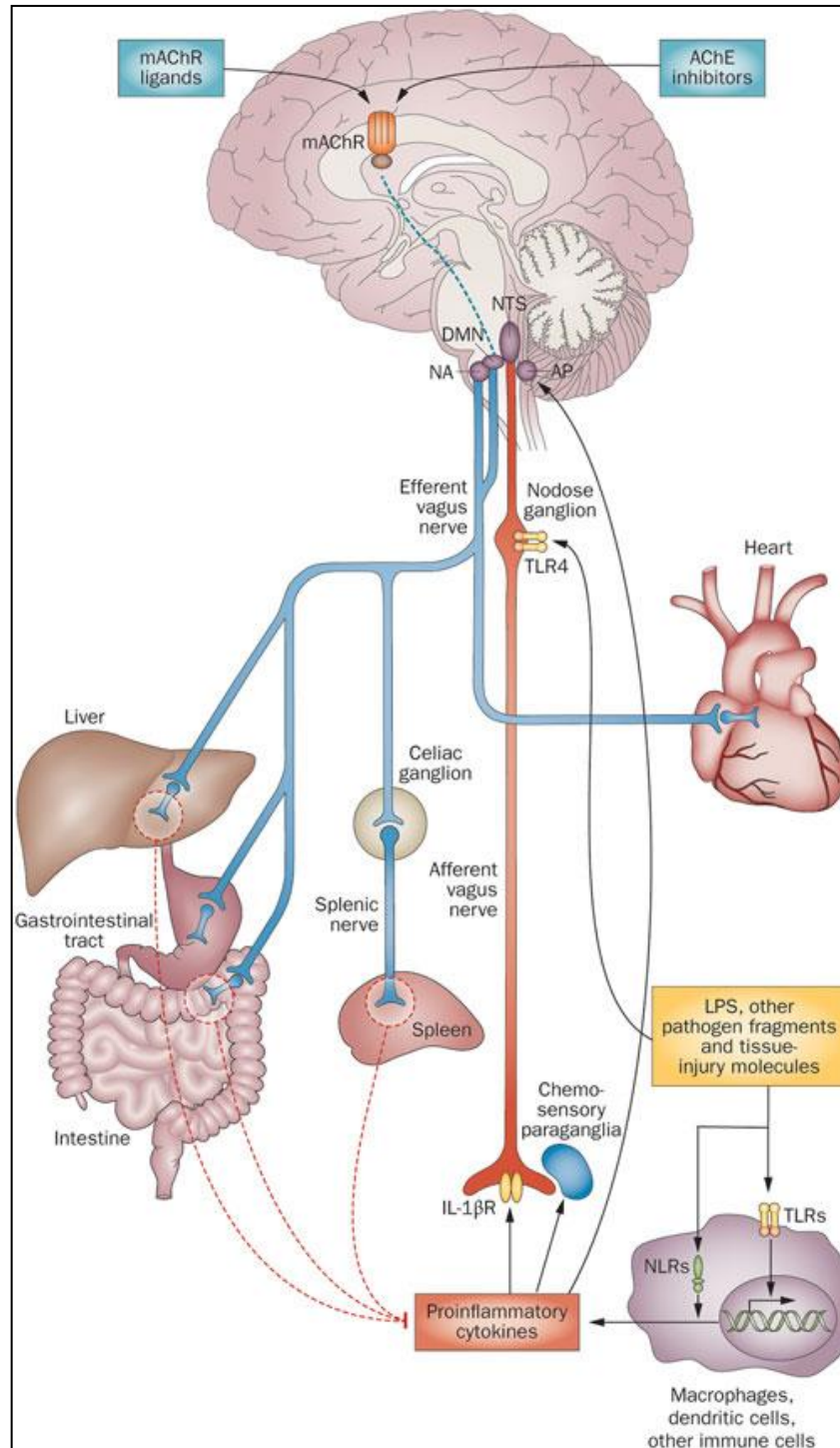
2 isquemia cerebral e lesões hepáticas (AMINZADEH et al., 2018; BOSE, 2017; FREDMAN;
TABAS, 2017; NEW et al., 2017; WANG et al., 2017; ZIEMKA-NALECZ; JAWORSKA;
4 ZALEWSKA, 2017). Ainda, em um processo descontrolado, a inflamação pode ser mais
perigosa do que o estímulo inicial, resultando em quadros clínicos de choque séptico, sepse,
6 meningite e trauma severo (TRACEY, 2002).

No final da década de 1990, o grupo de pesquisa do cientista norte-americano
8 Kelvin J. Tracey fez uma importante contribuição para o entendimento da regulação do sistema
imune pelo sistema nervoso. Durante os estudos sobre o papel anti-inflamatório da droga CNI-
10 1493, descrita inicialmente como inibidora da ativação de macrófagos e da secreção de TNF α ,
a equipe liderada pelo Dr. Tracey descobriu que essa molécula não agia diretamente sobre
12 macrófagos, mas sim como uma potente ativadora farmacológica do nervo vago e que suas
propriedades anti-inflamatórias eram dependentes da sinalização colinérgica, dando luz ao
14 reflexo inflamatório (BOROVIKOVA et al., 2000a, 2000b; GOEHLER et al., 2000; JI et al.,
2014). Essa foi uma das primeiras evidências de que o nervo vago poderia estar envolvido na
16 regulação de processos inflamatórios. Anos depois, o mesmo laboratório demonstrou que a
estimulação elétrica do ramo cervical do nervo vago era capaz de suprimir a produção de
18 citocinas pró-inflamatórias induzidas por injeção de lipopolissacarídeos (LPS)
(BOROVIKOVA et al., 2000b), sendo esse um dos trabalhos mais relevantes para a definição
20 do reflexo anti-inflamatório mediado pelo nervo vago.

O reflexo inflamatório é uma interação entre o sistema imune e o sistema nervoso,
22 onde a transmissão de potenciais de ação pelas fibras aferentes e eferentes do nervo vago
permite a rápida modulação da inflamação. A presença de patógenos ou substâncias produzidas
24 por danos teciduais são reconhecidas por receptores específicos expressos na superfície de
células do sistema imune como macrófagos e neutrófilos, e induzem a expressão e secreção de
26 moléculas pró-inflamatórias (citocinas e eicosanoides, por exemplo) (HUSTON, 2012). As
fibras aferentes do nervo vago, são ativadas pela presença dessas moléculas e transmitem essa
28 informação, por meio de potenciais de ação, até suas terminações nervosas no núcleo do trato
solitário (BOROVIKOVA et al., 2000b; GOEHLER et al., 2000; PAVLOV; TRACEY, 2012a).

30 O ramo eferente do reflexo inflamatório é denominado reflexo colinérgico anti-
inflamatório. A ativação das fibras eferentes do nervo vago resulta na liberação de acetilcolina,
32 o principal mediador da sinalização colinérgica, em diversos órgãos como o baço, intestino e

2 pâncreas, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias em animais com endotoxemia
(BOROVIKOVA et al., 2000b; PAVLOV; TRACEY, 2012a). A sinalização da acetilcolina
4 nesse reflexo é dependente de seus receptores nicotínicos, especificamente que expressam a
subunidade $\alpha 7$, $\alpha 7nAChR$ (WANG et al., 2003). Esse receptor é expresso em macrófagos,
6 monócitos, células dendríticas, linfócitos T, células endoteliais, dentre outros tipos celulares
(GALLOWITSCH-PUERTA; PAVLOV, 2007; PAVLOV et al., 2007). O efeito anti-
8 inflamatório mediado pelo receptor $\alpha 7nAChR$ ocorre por meio de uma cascata de sinalização
que inibe a translocação do fator de transcrição NF- $\kappa\beta$ para o núcleo, recruta a proteína quinase
10 tirosina 2 (JAK2) em seguida o fator de transcrição STAT3. Essa cascata de eventos resulta na
supressão da expressão e proteínas pró-inflamatórias nos macrófagos do intestino (DE JONGE
12 et al., 2005; HAMANO et al., 2006).



2

FIGURA 1 - O reflexo inflamatório. - . Em vermelho está representado as fibras aferentes do
 4 nervo vago, sensibilizadas por fragmentos de patógenos ou moléculas provenientes de injúrias
 teciduais e citocinas. Em azul, as fibras motoras do nervo vago desencadeiam um perfil anti-
 6 inflamatório em órgãos periféricos (PAVLOV; TRACEY, 2012b).

2 2.4 Fígado

O fígado é um dos maiores órgãos sólidos no organismo, compreendendo aproximadamente 2% do peso corporal total em humanos e 5% em camundongos. Em roedores, ele está localizado na parte mais cranial da cavidade abdominal imediatamente atrás do diafragma e macroscopicamente pode ser didaticamente subdividido em quatro lobos, separados de maneira incompleta: mediano, esquerdo, direito e caudado. Sua superfície externa é revestida por uma fina camada de tecido conjuntivo, também conhecida como cápsula de Glisson, e que, por sua vez, é recoberta pelo peritônio. O hilo hepático (*porta hepatis*) é bem definido e serve de passagem para os ductos hepáticos (direito, esquerdo e comum) e para os vasos sanguíneos que irrigam ou drenam o órgão (VOLLMAR; MENGER, 2009).

O fígado tem um duplo sistema de irrigação sanguínea. A veia porta, que transporta o sangue drenado dos leitos capilares do tubo digestivo, baço e pâncreas, é responsável pelo suprimento de 75% de todo o sangue que chega ao fígado. É interessante ressaltar que esse sangue é rico em nutrientes, mas pobre em oxigênio e pode conter toxinas e micro-organismos invasores. A artéria hepática, ramo do tronco celíaco, transporta sangue bem oxigenado e fornece os outros 25% do aporte sanguíneo do fígado. O sangue proveniente dessas duas origens distintas se mistura durante a passagem nos capilares sinusoides hepáticos. Finalmente, o sangue é drenado dos capilares sinusoides no lóbulo hepático pela veia central, que se unem para formar as veias sublobulares ou intercalares que, finalmente, desembocam nas veias hepáticas. O sangue retorna ao coração através da veia cava inferior (JENNE; KUBES, 2013; VOLLMAR; MENGER, 2009).

O lóbulo hepático é a unidade histológica estrutural básica do fígado e possui a forma de um hexágono. Essa estrutura é delimitada por septos de tecido conjuntivo originados da cápsula de Glisson e é composta por fileiras de hepatócitos intercaladas por capilares do tipo sinusóide, além de células estreladas (ou células de Ito) e macrófagos residentes (ou células de Kupffer). Também são descritas outras populações de células do sistema imunológico no fígado, como células dendríticas, linfócitos e células *natural killer* (NK). Os hepatócitos representam a grande maioria das células hepáticas e exercem uma parte relevante das funções metabólicas e secretoras do fígado. As células estreladas possuem função ainda pouco conhecida, apesar de terem sido relacionadas com o metabolismo de vitamina A. Por outro lado, as células de Kupffer, que se situam na parede dos sinusoides hepáticos apresentam capacidade fagocítica, secretória e metabólica. Por essa razão e por estarem em contato direto com o sangue, essas células desempenham a função de identificar micro-organismos invasores e por

2 meio da fagocitose eliminá-los da microcirculação hepática. Os macrófagos residentes, em
conjunto com as células endoteliais, células dendríticas, células de Ito, além de linfócitos T, B,
4 NK constituem a população de células residentes não-parenquimais (NPCs) do fígado (JENNE;
KUBES, 2013). O fígado comunica-se com os demais órgãos por meio de substâncias
6 secretadas e de circuitos neurais. A interação entre o fígado e o sistema nervoso central é
bidirecional, mediada por fibras aferentes e eferentes de nervos de origens simpáticas e
8 parassimpáticas (BERTHOUD, 2004). Os corpos dos neurônios aferentes do nervo vago
concentram-se no gânglio nodoso e seus processos axonais projetam-se para a periferia e núcleo
10 do trato solitário no sistema nervoso central. Esses processos neurais que se projetam para a
periferia terminam em tecidos conectivos que envolvem as tríades intra-hepáticas, ductos
12 biliares extra-hepáticos, veia porta e paragânglio (BERTHOUD; KRESSEL; NEUHUBER,
1992). Apenas algumas terminações nervosas foram observadas no entorno de hepatócitos. Os
14 corpos dos neurônios eferentes do nervo vago situam-se no núcleo dorsal motor do vago e
fazem sinapse com neurônios pós-ganglionares localizados nos órgãos inervados. Porém
16 nenhum gânglio intra-hepático foi encontrado (BERTHOUD; KRESSEL; NEUHUBER, 1992;
NEUHUBER et al., 1998). Assim, é possível que o acesso de neurônios ao fígado ocorra através
18 da veia porta e do hilo-hepático (BERTHOUD, 2004).

2.5 Células de Kupffer

20 O fígado é o órgão que possui a mais numerosa população de macrófagos dentre
todos os tecidos sólidos do corpo. Em um fígado saudável de roedor existe uma proporção de
22 aproximadamente 30 macrófagos para cada 100 hepatócitos (LOPEZ et al., 2011). Os
macrófagos são de diferentes subtipos e apresentam origens embrionárias distintas
24 (MACPHERSON; HEIKENWALDER; GANAL-VONARBURG, 2016). Os macrófagos
residentes no tecido hepático são denominados células de Kupffer, em homenagem ao
26 pesquisador que as descobriu, Karl Wilhelm Von Kupffer (THU NGUYEN-LEFEBVRE;
HORUZSKO, 2015). Essas células murinas podem ser fenotipadas com base em seus
28 marcadores moleculares de superfície de membrana, como F4/80, CD11b^{+low}, CD68 e CLEC4F
(LAVIN et al., 2014; SCOTT et al., 2016). Na superfície desses macrófagos residentes também
30 são expressos receptores do tipo Toll (TLR4 e TLR9), receptores sequestradores (*scavenger*) e
receptores do complemento (HEYMANN et al., 2015). Portanto, as células de Kupffer atribuem
32 ao fígado a capacidade de remover as bactérias e produtos microbianos que ganham acesso ao
órgão, função conhecida a mais de 100 anos (MANWARING; COE, 2014; WARDLAW;

2 HOWARD, 1959), além de identificar danos teciduais e modular a resposta imunológica
gerada, de forma a reestabelecer a homeostase do indivíduo (DAVIES et al., 2014). Quando
4 consideramos as funções desempenhadas pelas células de Kupffer e a posição anatômica
estratégica do fígado entre a circulação entérica e a sistêmica, fica fácil entendermos porque
6 esse órgão é considerado como um “vigilante” imunológico.

Em condição fisiológica, as células de Kupffer participam do metabolismo do ferro
8 (GAMMELLA et al., 2014), da bilirrubina (NAITO et al., 2004) e do colesterol (WANG et al.,
2015), além de remover eritrócitos senescentes (hemocaterese) e complexos hemoglobina-
10 haptoglobina da circulação (KRISTIANSEN et al., 2001; WANG et al., 2015). Por outro lado,
em condições patológicas, os macrófagos residentes do fígado detectam o desafio imunológico
12 a partir do reconhecimento de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) ou padrões
moleculares associados a patógenos (PAMPs), o quais se ligam aos receptores de
14 reconhecimento padrão (PRRs). Como consequência dessa ligação, os macrófagos se tornam
ativados, aumentando sua capacidade fagocítica, formação do inflamassoma e secreção de
16 citocinas (ZANNETTI et al., 2016). DAMPs são derivados, principalmente de hepatócitos
danificados enquanto os PAMPs do tipo lipopolissacarídeo (LPS) e flagelina geralmente são
18 provenientes de alterações da microbiota e alcançam a circulação hepática devido ao aumento
da permeabilidade intestinal (WREE; MARRA, 2016).

20 Dessa forma, considerando **(1)** a posição anatômica do fígado e o suprimento
sanguíneo composto principalmente do sangue drenado dos órgãos do trato GI, **(2)** que o fígado
22 possui uma das maiores populações de macrófagos do organismo e **(3)** que este órgão recebe
um grande número de fibras do nervo vago, nós hipotetizamos que o fígado seja um alvo
24 importante do reflexo colinérgico anti-inflamatório mediado pelo nervo vago. Mais
especificamente, neste trabalho nós objetivamos investigar o impacto da ativação do nervo vago
26 sobre a atividade das células de Kupffer, os macrófagos residentes hepáticos.

2 3 OBJETIVO

3.1 Objetivos Gerais:

4 Investigar o papel da ativação do reflexo colinérgico anti-inflamatório mediado pelo nervo vago na atividade dos macrófagos residentes no fígado (células de Kupffer).

6 3.2 Objetivos específicos:

8 3.2.1. Identificar alterações na função secretória ou fagocítica das células de Kupffer após a estimulação elétrica do nervo vago.

10 3.2.2. Investigar a possível participação de um circuito neural envolvido na ativação das células de Kupffer.

3.2.3. Demonstrar a presença de fibras eferentes do nervo vago no fígado.

12 3.2.4. Analisar a relevância da sinalização colinérgica para a ativação das células de Kupffer.

14

2 4 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL, MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

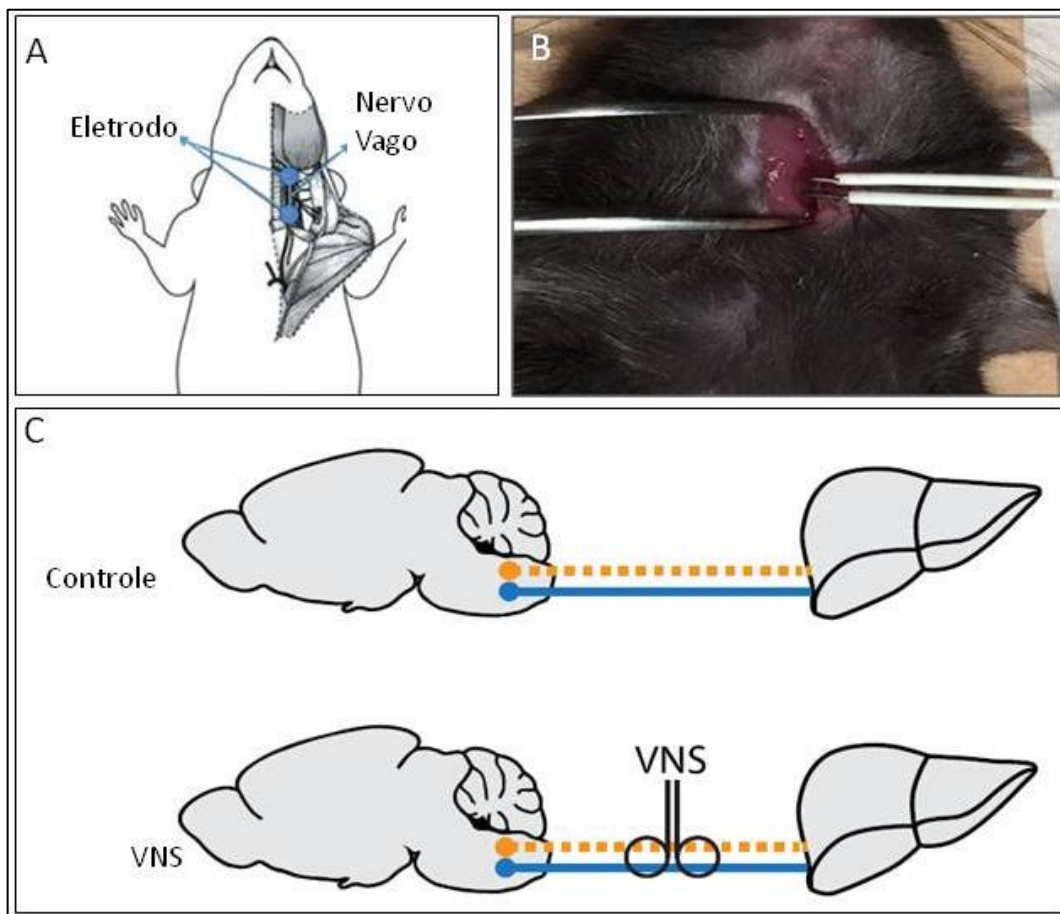
4 Foram utilizados camundongos selvagens da linhagem C57/Bl6 fêmeas, com idade
entre 8 e 12 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências
6 Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram condicionados
em biotério com livre acesso a ração e água e em condições controladas de temperatura (25°C)
8 e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h/12h). Os animais geneticamente modificados que
apresentam deficiência de transportadores de acetilcolina para a vesícula neurotransmissora,
10 VACHT KD^{hom}, foram fornecidos pela Professora Sílvia Guatimosim, do Departamento de
Fisiologia e Biofísica, do ICB/UFMG. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados
12 pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA (Protocolo 311/2016). Os grupos
experimentais foram compostos por 3 a 6 animais.

14 4.2 Estimulação elétrica do nervo vago (VNS)

Para a estimulação do nervo vago, grupo VNS, os camundongos foram anestesiados
16 com injeção intraperitoneal de cetamina (80mg/Kg) e xilazina (15mg/Kg). Após a sedação dos
animais, foi feita uma incisão na região cervical esquerda, a qual foi dissecada para a exposição
18 da traqueia. Esse procedimento permite a localização e identificação da artéria carótida, a qual
é adjacente ao ramo cervical do nervo vago (FIGURA 2-A). Com o auxílio de uma pinça, o
20 nervo vago foi identificado, separado da artéria e sobreposto ao eletrodo de estimulação elétrica
(FIGURA 2-B e C).

22 A bradicardia é descrita na literatura como uma resposta clássica à ativação do
nervo vago (DECK et al., 2005). No presente estudo, o decaimento da frequência cardíaca foi
24 utilizado como parâmetro positivo para testar a eficiência da VNS. Para isso, o protocolo da
VNS foi associado a um protocolo de eletrocardiograma. Assim, camundongos WT foram
26 anestesiados e submetidos à cirurgia na região cervical para a exposição do nervo vago, o qual
foi separado da artéria carótida e amarrado por uma linha de algodão. Posteriormente, os
28 eletrodos do eletrocardiograma foram fixados às regiões axilares superiores direita e esquerda,
bem como à região axilar inferior esquerda da pele dos camundongos, as quais foram
30 previamente tricotomizadas. A temperatura dos animais foi monitorada com o auxílio de um
termômetro intrarretal e mantida em torno de 37°C pelo calor de uma lâmpada. Em seguida, o

2 eletrodo de estímulo elétrico foi conectado ao nervo vago e a frequência cardíaca foi monitorada
 em resposta à diferentes intensidades de estímulo vagal. A frequência cardíaca dos
 4 camundongos foi medida durante 3 minutos de repouso, seguidos de 2 minutos de estimulação
 elétrica do nervo vago. As características do estímulo elétrico 1 proposto para este trabalho
 6 foram (frequência de 5Hz; largura do pulso de onda de 0,1 ms; intensidade de corrente de 1V,
 tempo 2 minutos) e estímulo 2, classicamente utilizado na literatura (Borovikova, Ivanova,
 8 Zhang, *et al.*, 2000) (frequência 5Hz; largura do pulso de onda 0,1 ms; intensidade da corrente
 5V, tempo 2 minutos). A frequência cardíaca resultante foi expressa em número de batimentos
 10 por minuto (bpm). Os dados coletados pelo programa Lab Chart Reader 8 foram plotados em
 um gráfico do programa Prisma, como a diferença (delta) da frequência cardíaca entre o período
 12 de repouso e de estimulação elétrica do nervo vago. Com base nos resultados obtidos, nós
 escolhemos as condições de estimulação com as menores perturbações fisiológicas na
 14 frequência cardíaca.



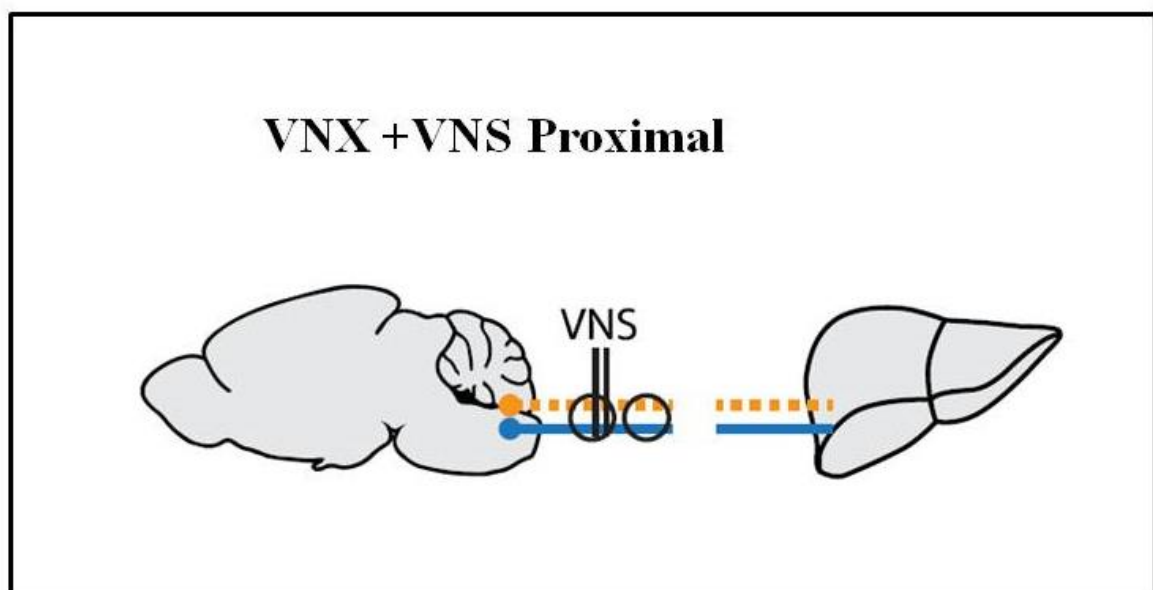
16 FIGURA 2 - Protocolo de estimulação elétrica do nervo vago. **A)** Desenho esquemático
 mostrando o nervo vago e a posição do eletrodo de estimulação elétrica. Modificado de
 18 (XIANG *et al.*, 2015). **B)** Fotografia do nervo vago sobreposto ao eletrodo de estimulação

2 elétrica. C) Desenho esquemático representando as fibras aferentes do nervo vago em laranja
 e as fibras eferentes do nervo vago em azul, nos grupos Controle e VNS.

4 A partir de então, todas as vezes que um grupo de animais foi submetido à estimulação elétrica
 do nervo vago (1V; 5Hz; 0,1 ms; 2 min), usamos como controle um grupo de animais sham, os
 6 quais foram submetidos à mesma cirurgia, mas que não foram submetidos à estimulação elétrica
 do nervo vago.

8 4.3 Vagotomia cervical

Os animais foram devidamente anestesiados e submetidos à cirurgia para exposição do nervo
 10 vago, na região cervical, como descrito anteriormente. Após a identificação do nervo vago
 esquerdo, foi feita uma vagotomia, dividindo o nervo em um coto proximal ao corte e um coto
 12 distal ao corte. Em seguida, foi feita a sutura da região operada. O grupo de animais submetidos
 a vagotomia (VNX), bem como seu grupo controle, foram deixados em recuperação por um
 14 período de sete dias antes da realização dos testes experimentais. Em seguida, ambos os grupos
 foram submetidos à cirurgia de exposição do nervo vago. Os animais do grupo VNX foram
 16 submetidos à estimulação do nervo vago, na porção proximal ao corte feito durante a vagotomia
 (FIGURA 3).



2 FIGURA 3 - Protocolo de estimulação elétrica do nervo vago proximal. Desenho esquemático
representativo da vagotomia seguida de estimulação elétrica das fibras neurais remanescentes,
4 proximais ao sistema nervoso central.VNS.

6 **4.4 Dosagem de alanina-aminotransferase (ALT) sérica**

Com o objetivo de verificar se a estimulação do nervo vago resulta em alguma lesão
8 hepática, a enzima alanina transferase (ALT) foi dosada do soro dos animais obtido do sangue
retirado durante a eutanásia. ALT é uma enzima citoplasmática de hepatócitos e sua presença
10 no soro é um indicativo de morte de células parenquimais hepáticas. Para tanto, foi utilizado o
kit Bioclin Transaminase ALT (TGP) cinética, adaptado para placa de 96 poços. É importante
12 ressaltar que o ensaio cinético é o método recomendado pela *International Federation of
Clinical Chemistry*.

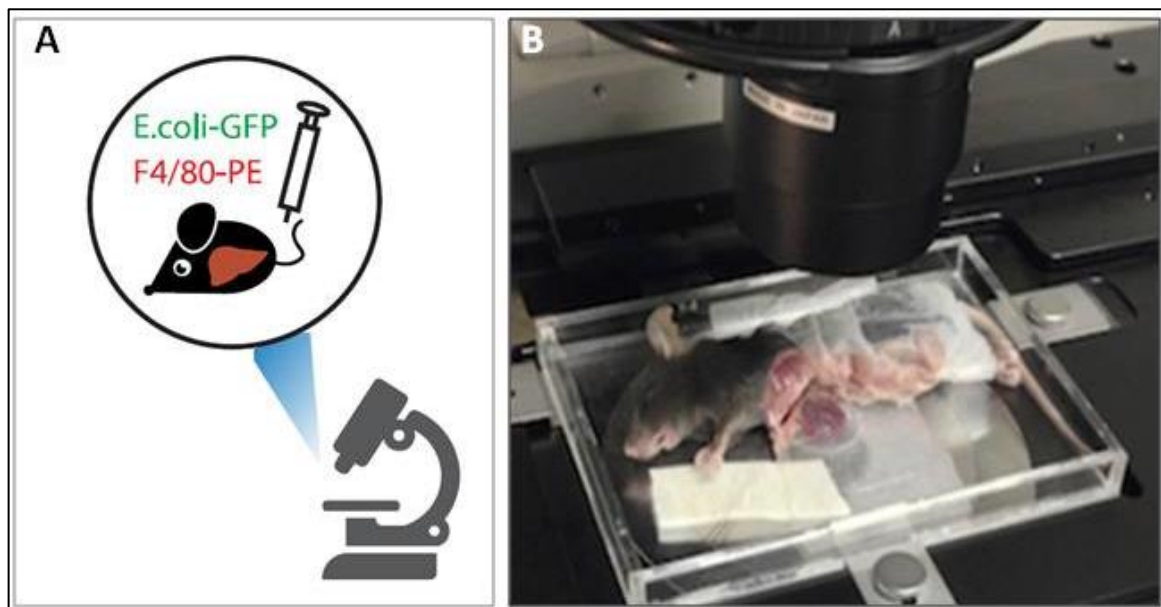
14 **4.5 Crescimento e contagem de bactérias (*E.coli^{gfp}*)**

As bactérias *E.coli^{gfp}* usadas no procedimento de microscopia intravital, foram
16 multiplicadas a partir de um estoque. Para isso, as bactérias foram incubadas em 5ml de meio
LB e 5µL de ampicilina para a seleção das bactérias transformadas com o plasmídeo que
18 expressa GFP. Em seguida, os tubos foram colocados em agitação de 100rpm, por 12 a 15 horas,
em temperatura de 37° C, para multiplicação das bactérias. Após esse tempo, a densidade ótica
20 (OD) da cultura de bactérias foi mensurada a partir uma amostra de 200µL da solução. A leitura
foi realizada no Leitor de ELISA (VERSAmx) a temperatura ambiente e comprimento de onda
22 de 600nm. A concentração de bactérias presentes na solução foi calculada no site (“Agilent
Genomics : Tools - Bio Calculators”,
24 [s.d.]www.Genomics.agilent.com/biocalculators/calcODBacterial.jsp a partir do valor de OD
obtido.

26 **4.6 Microscopia intravital do fígado**

Os animais anestesiados com cetamina (80mg/Kg) e xilazina (15mg/Kg) (i.p) foram
28 submetidos a laparotomia na linha alba para expor o fígado. Para marcar as células de Kupffer
foi administrada uma injeção intravenosa (i.v), contendo 10µL de anticorpo F480/PE

2 (excitação/emissão:561nm/578nm). Em seguida, os animais foram colocados em uma placa de
 4 acrílico contendo uma lamínula em seu centro, onde o lóbulo maior do fígado foi devidamente
 6 posicionado. Então, a placa de acrílico com o camundongo, foi colocada na mesa do
 8 microscópio Nikon A1R (FIGURA 4). Posteriormente, foram coletadas imagens do fígado,
 10 utilizando a lente objetiva 10X para a contagem do número de células de Kupffer. Após a coleta
 12 dessas imagens, foi administrada uma injeção intravenosa (i.v) de 200µL, contendo 5×10^7
 células de *E.coli*^{sfp}, no mesmo animal. Utilizando a lente objetiva 40X, a dinâmica de aderência
 das bactérias às células de Kupffer foi monitorada e gravada em vídeo, em tempo real, durante
 5 minutos. Os vídeos gerados foram analisados posteriormente para quantificar a aderência
 das bactérias às células de Kupffer, nos diferentes grupos experimentais. Finalmente, os animais
 foram eutanasiados para retirada do sangue e fígado para análises posteriores.



14 FIGURA 4 - Protocolo de microscopia intravital. A) Desenho esquemático. B) Fotografia de
 16 um camundongo anestesiado, com seu fígado posicionado no centro de uma placa de acrílico
 no microscópio confocal. Modificado de(MARQUES et al., 2015).

4.7 Quantificação do número de células de Kupffer.

18 A quantificação de células de Kupffer foi realizada com a finalidade de verificar se
 20 o número dessas células é alterado pela estimulação do nervo vago ou qualquer outra das
 22 condições experimentais do projeto. Para tanto, o número de células de Kupffer foi quantificado
 em 4 imagens/animal, representativas de diferentes campos do lobo maior do fígado, as quais
 foram obtidas aleatoriamente, utilizando a lente objetiva 10X durante os experimentos de

2 microscopia intravital. O programa utilizado para a contagem do número de células de Kupffer
foi o ImageJ (*plugin: cell counter*).

4 4.8 **Análise da atividade de fagocitose das células de Kupffer por microscopia intravital confocal.**

6 Nesta técnica, a atividade de fagocitose das células de Kupffer é inferida pela
aderência de células bacterianas em sua superfície, durante cinco minutos após a administração
8 das bactérias, seguindo um protocolo previamente descrito (DAVID et al., 2016). Para realizar
a quantificação da atividade de fagocitose, os vídeos capturados durante o protocolo de
10 microscopia intravital foram analisados no programa ImageJ. Em cada vídeo, 20 macrófagos
foram selecionadas, aleatoriamente, e a fagocitose foi indicada pelo aumento de fluorescência
12 verde nestas células. Os valores de fluorescência detectados durante todo o vídeo foram
plotados em gráficos como porcentagem em relação à fluorescência inicial de cada célula de
14 Kupffer.

4.9 **Obtenção de soro, tecidos e eutanásia.**

16 A coleta de sangue foi feita na veia cava inferior, em animais anestesiados dos
grupos controle e VNS. O sangue coletado foi armazenado em tubos de 1,5ml, a temperatura
18 ambiente por 10 minutos. Em seguida, essas amostras foram centrifugadas à 7000rpm, por 15
minutos, para a extração do soro. O soro obtido foi armazenado em tubos de 500µL no freezer
20 -80° C para análises posteriores. Paralelamente a esse procedimento, fragmentos do fígado
foram retirados e congelados no freezer -80° C, até a realização dos experimentos.

22 4.10 **Quantificação de mRNA por RT- PCR das citocinas hepáticas**

A quantificação dos níveis de mRNA das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18 e IL-
24 10 foi feita por PCR em tempo real. Para isso, amostras do fígado de animais WT dos grupos
Controle e VNS foram coletados 20 minutos após o procedimento cirúrgico (tempo decorrido
26 entre VNS e a captura de imagens por microscopia intravital e cintilografia) e congelados no
freezer a -80°C. Em paralelo, também analisamos amostras do fígado dos animais dos grupos
28 Sham, Sham+ VNS, Sepsis, Sepsis+ VNS, que foram coletadas 6h após VNS e indução de sepsis

2 por ligadura e punção cecal, e armazenados à -80°C. Nessas amostras avaliamos a expressão
gênica das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10

4 4.10.1 Extração do RNA

O RNA total foi isolado de 15 mg de tecido usando o Mini Kit Aurum™ Total
6 RNA da BIO-RAD. Adicionamos 700 μ L do reagente de lize para a homogeneização. Essa
mistura foi centrifugada a 12000 G, por 3 minutos, à temperatura ambiente. Ao sobrenadante
8 resultante dessa centrifugação, foram adicionados 700 μ L de etanol 60%. Posteriormente, o
homogeneizado lizado foi pipetado na coluna de coleta de RNA, encaixada em um tubo de
10 coleta e esse aparato foi centrifugado à 12000 G, por 1 minuto, à temperatura ambiente. Em
seguida, descartamos o sobrenadante, adicionamos 700 μ L de solução adstringente de lavagem
12 *low* na coluna de coleta de RNA e centrifugamos à 12000 G, por 1 minuto, à temperatura
ambiente. Descartamos o sobrenadante, adicionamos 80 μ L da solução de DNase no centro da
14 coluna de coleta recolhido e incubamos esse sistema por 25 min, à temperatura ambiente.
Depois, adicionamos 700 μ L de solução adstringente de lavagem *high* à coluna e centrifugamos
16 à 12000 G, por 1 minuto, à temperatura ambiente. Novamente, descartamos o sobrenadante,
adicionamos 700 μ L de solução adstringente de lavagem *low* e centrifugamos nas mesmas
18 condições mencionadas acima. Descartamos o sobrenadante e repetimos a centrifugação, porém
por um tempo de 2 minutos. Finalmente, transferimos a coluna de coleta de RNA para um tubo
20 de microcentrifugação, pipetamos 60 μ L da solução de eluição e após incubar o sistema por 2
minutos, centrifugamos à 12000 G, por 2 minutos, à temperatura ambiente, permitindo a eluição
22 completa do RNS retido na coluna de coleta. A quantificação do RNA foi feita em NanoDrop
(NanoVue Plus).

24 4.10.2 Síntese do cDNA

Utilizamos um volume da amostra suficiente para 2000 ng de RNA. Adicionamos
26 8 μ L do 5x iScript Reaction Mix (iScript cDNA Synthesis Kit / Bio-Rad), 2 μ L da iScript
Transcriptase Reversa e completamos a solução com água ultrapura (nuclease free) para um
28 volume final de 40 μ L. Em seguida, a solução foi incubada em termociclador usando o seguinte
protocolo: *Priming* (5 min a 25 °C); *Reverse transcription* (20 min a 4 °C); *RT inactivation* (1
30 min a 95 °C); *Optional step* (4 °C).

2 4.10.3 PCR em tempo Real

O cDNA obtido foi quantificado por RT-PCR quantitativo. SYBR Green iTaq™
 4 *Supermix* (BIO-RAD) foi usado para quantificar a expressão dos genes de interesse de acordo
 com as instruções do fabricante. Adiciona-se à 2 µL do cDNA, 5 µL do SYBR Mix, 1 µL do
 6 primer *forward* (500 nM), 1 µL do primer *reverse* (500 nM) e 1 µL da água ultrapura, com o
 volume final de 10 µL. Essa reação Foi levada ao termociclador Applied Biosystems® 7500
 8 Real-Time PCR Systems.

Os primers utilizados para quantificar a expressão de citocinas foram: TNF-α 5'-
 10 CCC TCA CTC AGA TCT TCT-3' (*forward*) e 5'-GCT ACG ACG TGG GCT ACA-3'
 (*reverse*), 5'-ACG GCA TGG ATC AAG AC-3' (*forward*) e 5'-AGA TAG CAA ATC GGC
 12 TGA CG-3' (*reverse*); IL-18 5'-GAC TCT TGC GTC AAC TTG AAG G-3' (*forward*) e 5'-
 CAG GCT GTC TTT TGT CAA CGA' (*reverse*); IL-10 5'-GCT CTT ACT GAC TGG CAT
 14 GAG-3' (*forward*) e 5'-CGC AGC TCT AGG AGC ATG TG-3' (*reverse*); 5'-GCT CTT ACT
 GAC TGG CAT GAG-3' (*forward*) e 5'-CGC AGC TCT AGG AGC ATG TG-3' (*reverse*); IL-
 16 1β 5'-GAC ACT GTT CCT GAA CTC AAC (*forward*) e 5'-ATC TTT TGG GGT CCG TCA
 ACT-3' (*reverse*); IL-6 5'-TTC CAT CCA GTT GCC TTC TTG-3' (*forward*) e 5'-TTG GGA
 18 GTG GTA TCC TCT GTG A-3' (*reverse*); GAPDH (housekeeping) 5'-AGG TCG GTC TGA
 ACG GAT TTG-3' (*forward*) e 5'-TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA-3' (*reverse*);
 20 S26 (*housekeeping*) 5'-CGA TTC CTG ACA ACC TTG CTA-3' (*forward*) e 5'-CGT GCT
 TCC CAA GCT CTA TGT-3' (*reverse*).

22 A expressão relativa do mRNA foi calculada pela diferença entre o *cycle threshold*
 (Ct) do gene alvo e o Ct do gene referência: $\Delta Ct = (Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene referência})$. A
 24 expressão diferencial (*fold change*) foi calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK;
 SCHMITTGEN, 2001).

26 4.11 Monitoramento e imagem do fluxo sanguíneo sistêmico

A técnica de monitoramento e imagem do fluxo sanguíneo com o auxílio do
 28 aparelho *Laser-Doppler* foi utilizada para avaliar se a ativação do nervo vago alterou o fluxo
 sanguíneo sistêmico. Nesta técnica, uma luz monocromática de baixa intensidade de um laser
 30 estável e de intensidade específica é dispersada por hemácias em movimento nos vasos
 sanguíneos. Conseqüentemente, a frequência dessa luz incidente é alterada e as alterações
 32 detectadas no fotodetector do aparelho geram um mapa. O processamento desse mapa gera

2 imagens do fluxo sanguíneo, as quais são codificadas por cores de acordo com a intensidade do
fluxo (MOOR INSTRUMENTS, 2017).

4 Para isso, os animais foram anestesiados e o fluxo sanguíneo periférico foi
monitorado por dopplerimetria na veia da cauda através de imagens capturadas antes da
6 estimulação, imediatamente após a estimulação e cinco minutos pós-estimulação do nervo
vago.

8 **4.12 Análise da atividade de fagocitose das células de Kupffer por cintilografia**

Esse experimento foi realizado em colaboração com os Professores Valberte
10 Cardoso e Simone Odília Antunes Fernandes, da faculdade de Farmácia da UFMG. Na técnica
de cintilografia a atividade de fagocitose é inferida a partir da internalização de um colóide
12 marcado por um radioisótopo.

4.12.1 Procedimento de marcação do Estanho Coloidal com tecnécio-99m

14 A marcação foi realizada de acordo com as instruções de uso do produto TIN-TEC
(IPEN/CNEN). O frasco foi reconstituído com 2 mL de uma solução estéril de pertecnetato de
16 sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) recentemente eluída do gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m
($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$; IPEN/CNEN), contendo uma atividade de 148 MBq (4 mCi). Em seguida, a
18 solução foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente.

4.12.2 Pureza radioquímica (PR)

20 Para a determinação da PR, uma alíquota do radiofármaco (3 μL) foi aplicada na fita
de Papel Whatman 3 MM (acetona pa). Com esse método foi determinado o percentual de
22 radioatividade relativo ao pertecnetato ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$). A radioatividade foi contada em um
curiômetro (Capintec CRC 15R, EUA). A PR foi da ordem de 90%, adequada para a realização
24 das imagens cintilográficas.

4.12.3 Imagens cintilográficas e quantificação da radiação

26 Após a marcação, camundongos C57BL/6 foram anestesiados com uma mistura de
cetamina (80mg/Kg) e xilazina (15mg/Kg). Em seguida os animais foram submetidos ao

2 protocolo de VNS ou à cirurgia Sham. Imediatamente após as cirurgias , 0,1 mL (3,0 MBq) de
Estanho Coloidal, marcado com o isótopo radioativo tecnécio (^{99m}Tc) foi injetado por via
4 intravenosa em todos os camundongos. Após 2 min da injeção, os animais foram colocados em
decúbito dorsal sob uma gama-câmara (Mediso, Hungria). As imagens foram adquiridas
6 utilizando um colimador de baixa energia do tipo *Low Energy High Resolution* (LEHR) e um
tamanho de matriz de 512 x 512 x 16 pixels durante um período de 10 min. Foi realizado um
8 delineamento em torno fígado e a radioatividade foi contada. Em seguida os camundongos
foram submetidos à eutanásia e o pulmão, baço e fígado foram retirados para posteriormente
10 compararmos a intensidade de internalização do estanho coloidal, por meio da medida de
radiação do tecnécio no curiômetro (Capintec CRC 15R, EUA).

12 **4.13 Investigação da presença de fibras nervo vago no fígado por meio de neurotraçador**

A primeira abordagem no estudo da disposição de fibras vagais no órgão alvo do
14 estudo foi feita pela coloração seletiva do nervo vago com o Neurotraçador DiO. Esse corante,
que possui a capacidade de difundir-se pelos axônios, foi aplicado na região cervical esquerda
16 do nervo isolado. Após 30 dias da aplicação do neurotraçador, os animais foram submetidos ao
protocolo de microscopia intravital para coleta de imagens.

18 **4.14 Modulação da atividade de fagocitose das células de Kupffer pelo nervo vago e sua relevância em um modelo de sepse subletal.**

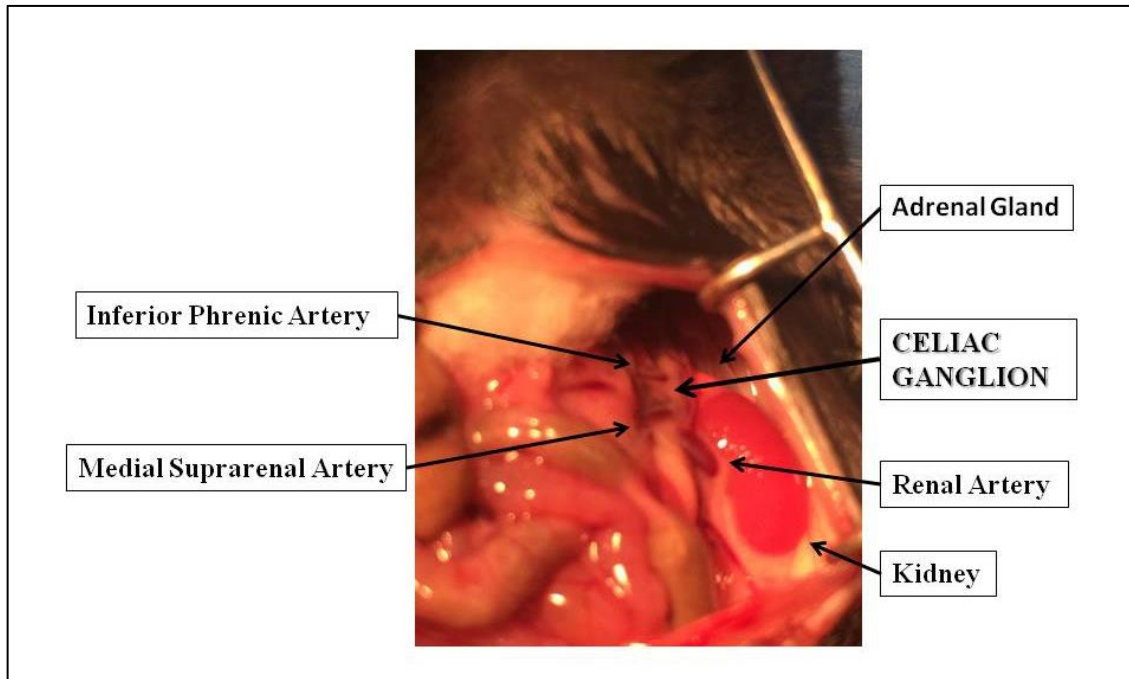
20 Este experimento foi realizado para responder a duas perguntas: **(1)** O fenótipo
observado pela microscopia intravital é, de fato, fagocitose ou apenas uma adesão das bactérias
22 na superfície das células? **(2)** O presente estudo tem alguma relevância clínica?

Para responder a essas perguntas, nós utilizamos um modelo de sepse subletal para
24 desafiar imunologicamente camundongos WT. A sepse foi induzida, após a sedação dos
animais, por meio da cirurgia de ligadura e punção cecal (CLP), na qual o intestino ceco é
26 amarrado em sua parte proximal por uma linha e posteriormente é perfurado por uma agulha de
diâmetro 26G, permitindo o extravazamento manual de fezes para a cavidade abdominal. Em
28 seguida, os animais receberam 1ml de salina por via subcutânea, foram suturados e deixados
em repouso (grupos Sham e Séptico) para recuperarem da cirurgia ou submetidos ao protocolo
30 de VNS (grupos Sham+VNS e Séptico+VNS).

2 Após seis horas da cirurgia CLP, tempo marcado pelo pico de produção de citocinas
inflamatórias na sepse (WALLEY et al., 1996), os animais de ambos os grupos foram
4 eutanasiados para coleta de sangue e fígado para análises posteriores. O fígado foi retirado de
forma estéril, e um fragmento do lobo maior foi pesado, diluído em salina fisiológica estéril 10
6 vezes e em seguida foi masserado utilizando-se duas lâminas foscas. Posteriormente 50µL do
fígado masserado foi plaqueado em placas de petri contendo o meio de cultura Müller Hinton.
8 As placas de petri foram deixadas em estufa de 37°C por 18 horas. Depois, o número de
unidades formadoras de colônia (UFC) foi contado. Os resultados foram plotados em gráfico
10 do Prisma como log da quantidade de UFC por 100 mg de tecido hepático. Esse experimento
foi realizado em colaboração com as Professora Daniela Bonaventura do departamento de
12 Farmacologia do ICB, Daniele Souza do departamento de Microbiologia do ICB e a aluna
Natália de Nóbrega do programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia do ICB.

14 **4.15 Esplenectomia (SPX), Adrenalectomia bilateral (ADX) e remoção do gânglio celíaco (CGX)**

16 Após serem anestesiados, os animais foram submetidos a uma incisão na região
dorsal direita e esquerda, para a remoção das glândulas adrenais, ou laparotomia medial na linha
18 alba para remoção do baço ou do gânglio celíaco. A localização anatômica do gânglio celíaco
é frequentemente descrita pela localização de estruturas arteriais próximas a ele. O gânglio
20 celíaco foi então identificado como sendo uma estrutura esbranquiçada, situado entre as artérias
frênica inferior e suprarenal média (FIGURA 5) e posteriormente foi removido. Todos os
22 animais foram suturados e deixados em repouso por uma semana para evitar qualquer viés da
ativação do nervo vago decorrente do procedimento cirúrgico. Durante o período de
24 recuperação, uma solução salina (NaCl 0,9%) foi usada como substituição da oferta de água
comum para os animais submetidos a adrenalectomia bilateral. Após o período de recuperação,
26 os animais foram divididos em grupos e submetidos ou não ao protocolo de VNS. Dessa forma,
foram obtidos os seguintes grupos: Controle, SPX, ADX, CGX, VNS, SPX+ VNS, ADX+ VNS
28 e CGX+ VNS. Todos os grupos foram utilizados para experimentos de microscopia intravital
utilizando os protocolos já descritos anteriormente. Ao final do experimento, os animais de
30 todos os grupos foram submetidos ao procedimento de eutanásia para retirada de sangue e
obtenção de soro para as dosagens específicas.



2
 4
 6
 FIGURA 5 - Localização anatômica do gânglio celíaco. - Estruturas maiores como o rim e a artéria renal foram identificadas inicialmente. Posteriormente, identificou-se estruturas que circundam o gânglio celíaco, as artérias frênica inferior e suprarenal média. O gânglio celíaco apresenta-se como uma estrutura esbranquiçada, situado entre essas artérias.

8 4.16 Participação da sinalização colinérgica na regulação da atividade fagocitária das células de Kupffer

10
 12
 14
 16
 18
 20
 O objetivo deste experimento foi demonstrar a participação da sinalização colinérgica resultante da estimulação do eixo parassimpático no mecanismo de fagocitose das células de Kupffer. Para isso, foram utilizados animais geneticamente alterados na via de sinalização colinérgica (camundongos VACHT KD^{hom}), apresentando deficiência de transportadores de vesícula neurotransmissora de acetilcolina e consequente redução de 60% na liberação de acetilcolina na fenda sináptica (PRADO et al., 2006). Esses animais, bem como animais WT foram subdivididos em grupos Controle e VNS e submetidos ao protocolo de microscopia intravital. Os resultados obtidos no experimento descrito acima foram comparados com os resultados de inibição farmacológica da sinalização colinérgica, pela administração dos antagonistas de receptores nicotínicos e muscarínicos, Mecamilamina (Meca) e Metilotropina (MetA), respectivamente. Essas substâncias foram administradas em conjunto, na dose de 1mg/kg em camundongos selvagens, por via intraperitoneal (i.p). Os animais foram subdivididos em grupos Meca+ MetA e Meca+ MetA+ VNS, além dos grupos Controle e VNS.

2 Os grupos Controle e VNS receberam uma injeção de salina. Após a administração dos
antagonistas dos receptores colinérgicos, os o grupos VNS e Meca+MetA-VNS foram
4 submetidos ao procedimento de estimulação elétrica do nervo vago. Posteriormente, todos os
grupos foram submetidos ao procedimento de microscopia intravital, para coleta de imagens.

6 **4.17 Análise estatística**

A comparação entre 2 grupos foi realizada utilizando o teste t-student. A
8 comparação entre 3 ou mais grupos foi realizada utilizando o teste OneWay-ANOVA e o pós-
teste de Newman-Keuls, caso as distribuições dos dados fossem gaussianas, ou o teste de
10 Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, caso as distribuições dos dados fossem não-
gaussianas.

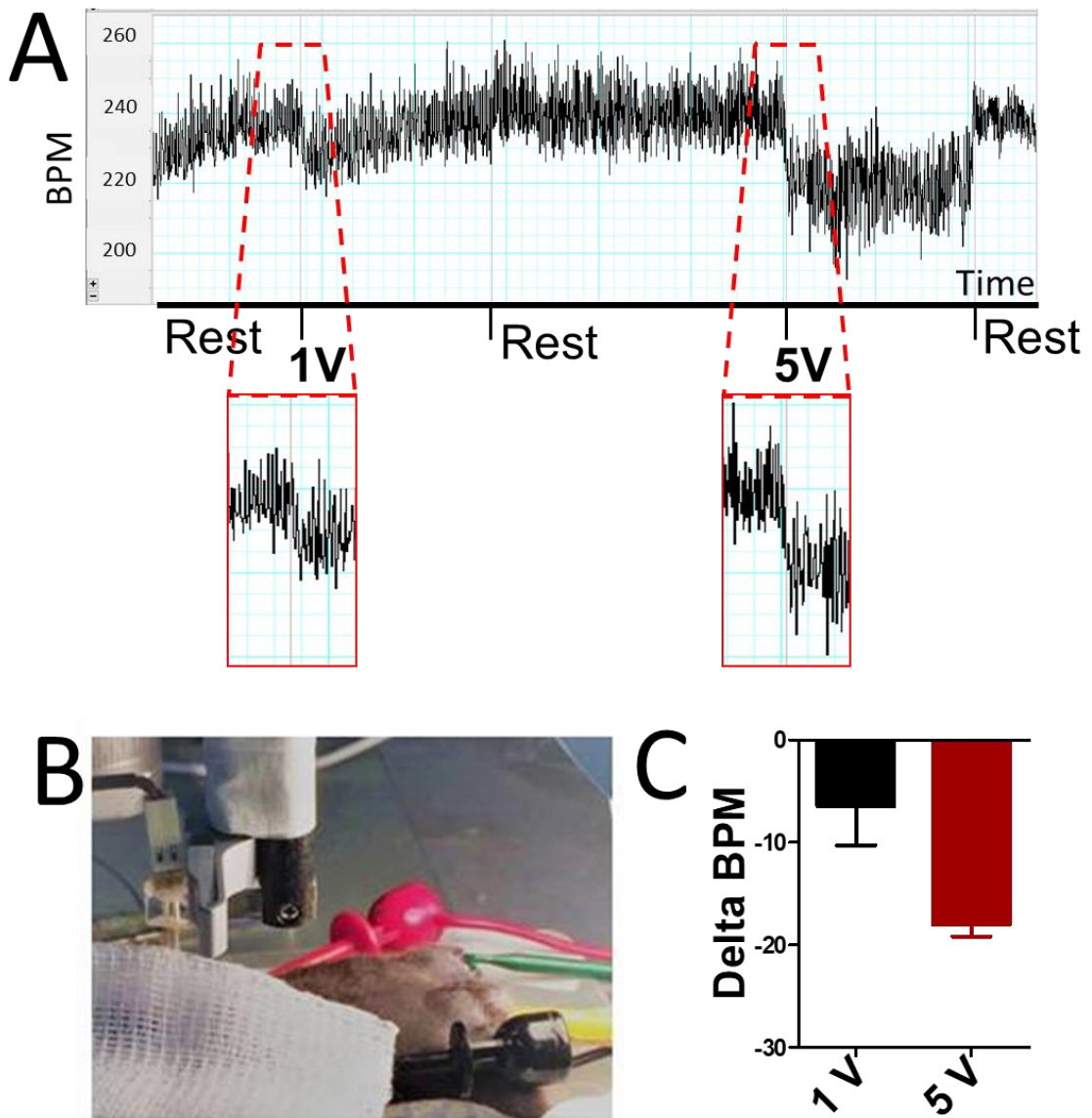
12

2 5 RESULTADOS

5.1 Padronização do estímulo elétrico do nervo vago.

4 Classicamente, a ativação do sistema nervoso parassimpático altera várias respostas
fisiológicas, como frequência respiratória e frequência cardíaca, sendo esta última o parâmetro
6 mais utilizado para demonstrar a ativação do nervo vago (HUSTON; TRACEY, 2011; SLOAN
et al., 2007). Em vista disso, a bradicardia foi o parâmetro positivo de resposta fisiológica para
8 testarmos a eficiência do nosso protocolo de VNS. Nesse sentido, a frequência cardíaca obtida
para os animais em repouso e sob anestesia foi de $238 \pm \text{SEM } 7,0$ bpm, condizente com dados
10 da literatura obtidos em animais em diferentes condições de anestesia (CARAVACA et al.,
2017). Foi constatado que nas condições experimentais de VNS (1V; 5Hz; 0,1 ms; 2 min)
12 ocorreu uma redução sutil na frequência cardíaca dos camundongos de aproximadamente $10 \pm$
SEM 3,7 bpm, o que indica a eficácia do protocolo utilizado. Em seguida, foi aplicado um
14 estímulo mais intenso (5V; 5 Hz; 0,1 ms; 2 min) no nervo vago com o objetivo de demonstrar
um decaimento mais pronunciado na frequência cardíaca após VNS, como é descrito na
16 literatura, e de contextualizar nossas condições de estímulo com as utilizadas em outros
trabalhos. Nesta situação foi observado um decaimento de aproximadamente $20 \pm \text{SEM } 1,1$ bpm
18 na frequência cardíaca dos animais, como esperado (FIGURA 6 C0).

As vias neurais colinérgicas que regulam os processos imunológicos e a frequência
20 cardíaca são distintas. Nos mamíferos as fibras neurais do tipo B e C regulam a frequência
cardíaca, enquanto as fibras do tipo A participam do reflexo inflamatório. Estímulos elétricos
22 de pouca intensidade são capazes de ativar as fibras do tipo A, enquanto as fibras do tipo B e C
são despolarizadas apenas em resposta a estímulos mais intensos (HUSTON et al., 2007).
24 Diante dessa informação, no presente trabalho consideramos que o estímulo de menor
intensidade é o mais adequado para ser empregado para o estudo das alterações nas funções
26 imunológicas das células de Kupffer, com o objetivo de eliminar qualquer possível interferência
das alterações cardiovasculares provocadas por VNS no fenótipo estudado. Dessa forma, o
28 estímulo elétrico de 1V, 5Hz e 0,1ms foi aplicado em todos os demais procedimentos de VNS.



2

4

6

8

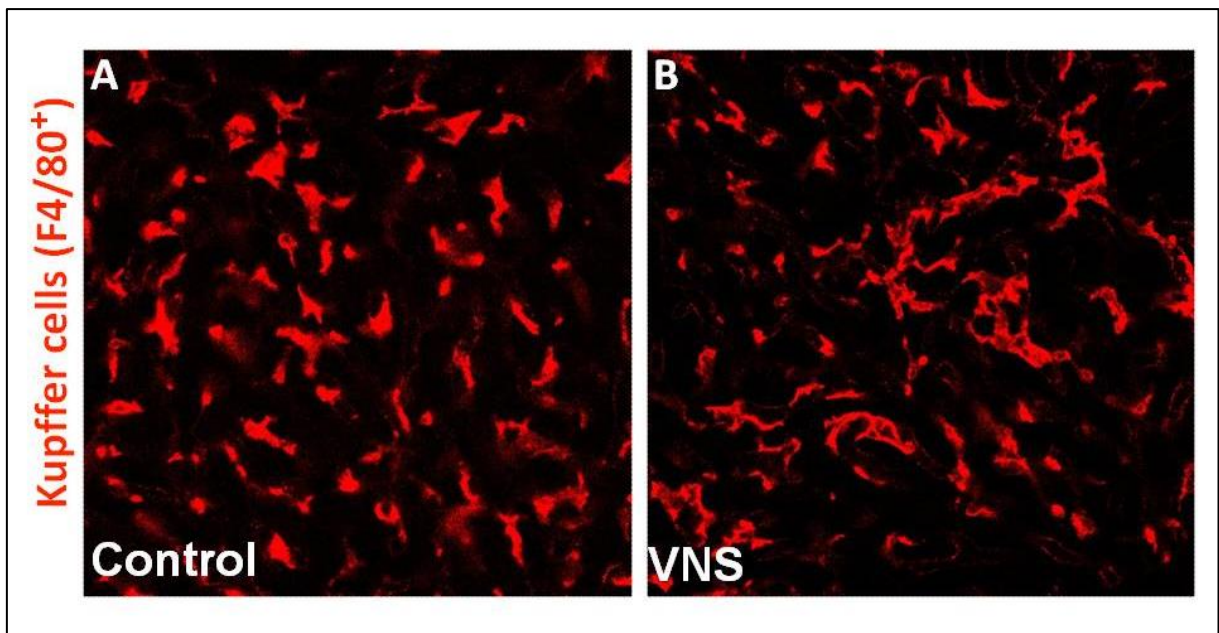
FIGURA 6 - Teste de eficiência do protocolo de estimulação do nervo vago. **A)** Registro representativo do eletrocardiograma durante estimulação elétrica. **B)** Imagem do campo experimental, onde o animal é conectado simultaneamente aos eletrodos de coleta da frequência cardíaca (eletrodos verde, vermelho e preto) e ao eletrodo de estimulação elétrica (campo superior esquerdo). **C)** Diferença (delta) entre a frequência cardíaca durante o estímulo do nervo vago e a frequência cardíaca basal no momento anterior ao estímulo (n=3).

10

2 5.2 Estimulação elétrica do nervo vago ativa os macrófagos residentes no fígado.

O reflexo colinérgico anti-inflamatório, mediado pelo nervo vago, é uma via neural conhecida por alterar a atividade celular de macrófagos em diversos tecidos (PAVLOV et al., 2003; PAVLOV; TRACEY, 2012a). Neste trabalho, estabelecemos um modelo animal de estimulação elétrica do ramo cervical do nervo vago, concomitante ao procedimento de microscopia intravital *in vivo* do fígado, para analisar a atividade das células de Kupffer.

Como resultado, nós observamos que após a ativação do nervo vago (grupo VNS), as células de Kupffer mudaram sua morfologia, passando de um aspecto fusiforme (grupo Controle), para um aspecto estrelado, com várias projeções celulares (FIGURA 7). A mudança na morfologia das células de Kupffer é um indício forte de ativação dessas células.



12

FIGURA 7 - Estimulação elétrica do nervo vago altera a morfologia das células de kupffer. Imagens das células de Kupffer marcadas pelo anticorpo F4/80 PE A) com aspecto fusiforme no grupo controle B) e com aparência estrelada após VNS, (n=5).

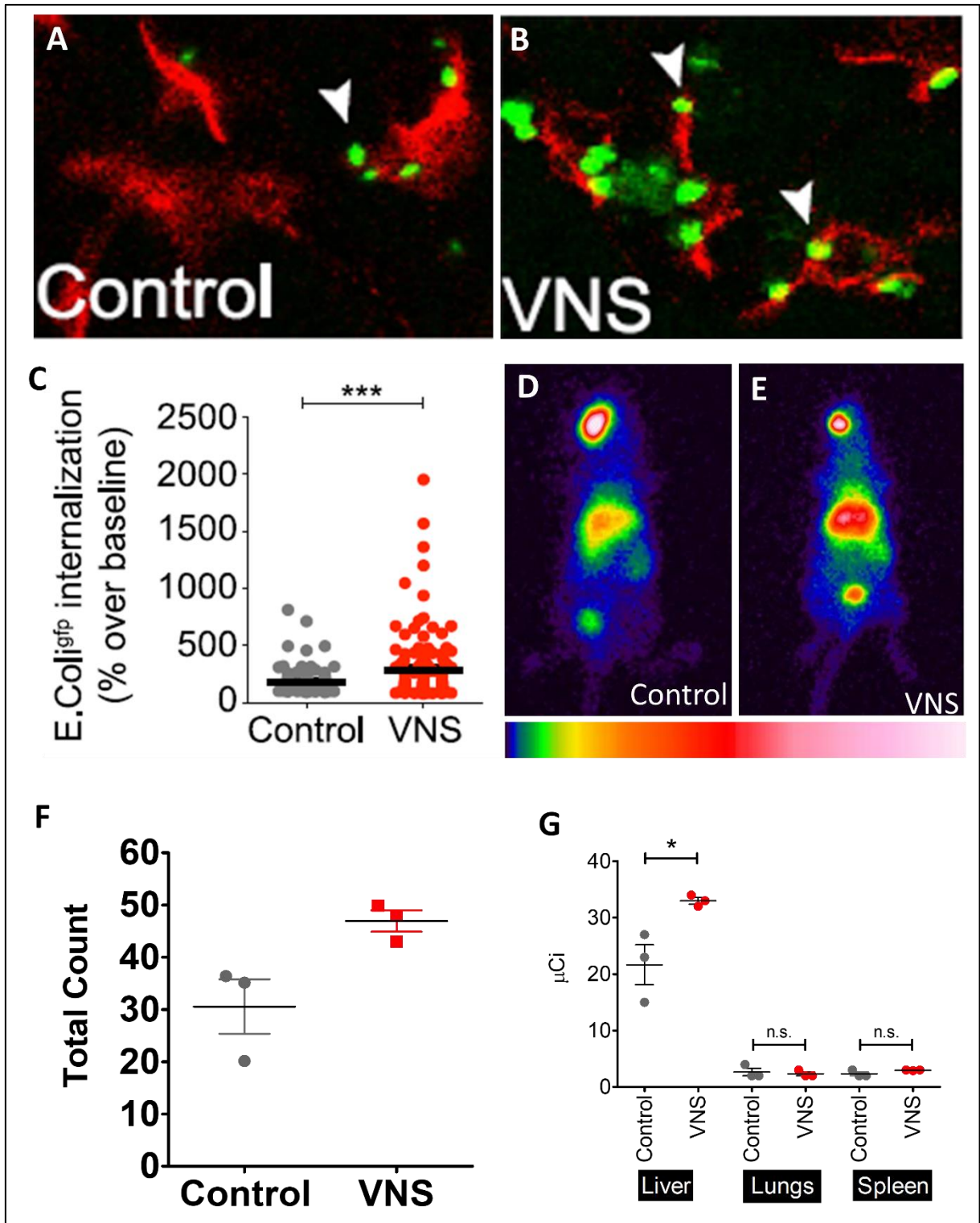
14

16 5.3 Estimulação elétrica do nervo vago aumenta a fagocitose das células de Kupffer

A ativação das células de Kupffer no fígado pode gerar, ao menos, dois fenótipos possíveis e importantes: (1) alterações na atividade fagocítica ou (2) na atividade secretora dessas células.

18

2 Neste trabalho, nós estabelecemos um protocolo de imageamento em tempo real
para inferir sobre a atividade fagocítica das células de Kupffer por microscopia intravital. Essa
4 técnica envolve a marcação dos macrófagos com anticorpo específico e a administração por via
intravenosa de *E.coli*^{gfp}. Toda a dinâmica do processo foi monitorada *in vivo*. Nossos resultados
6 sugerem que os macrófagos hepáticos apresentam atividade basal de fagocitose, evidenciada
pela adesão de bactérias à sua superfície (FIGURA 8-A, B e C). A estimulação elétrica do nervo
8 vago resultou em aumento significativo na capacidade de fagocitose pelas células de Kupffer.
Esse resultado foi comprovado pela técnica de cintilografia de estanho coloidal, marcado com
10 o radioisótopo tecnécio (Tn⁹⁹). Tal técnica possibilita rastrear o coloide após sua aplicação na
corrente sanguínea, por análise de imagens de cintilografia e quantificação da radiação total
12 presente em um órgão. As imagens de cintilografia foram representadas em um diagrama de
cores, sendo que as cores fortes indicam maior absorção do colóide. Nós observamos nas
14 imagens de cintilografia, que a maior concentração do colóide ocorreu no olho (local de
aplicação da solução) e no fígado (órgão que abriga a maior população de macrófagos do
16 corpo). Corroborando nossa hipótese, VNS aumentou a intensidade de fagocitose do colóide no
fígado (FIGURA 8- D, E e F). Curiosamente, a quantificação de radiação bruta mostrou que
18 VNS não impactou na atividade fagocítica do pulmão e baço, órgãos nos quais essa função
também é relevante (FIGURA 8-G). Portanto, concluímos que a ativação elétrica do X nervo
20 craniano provoca o aumento de fagocitose pelos macrófagos hepáticos.

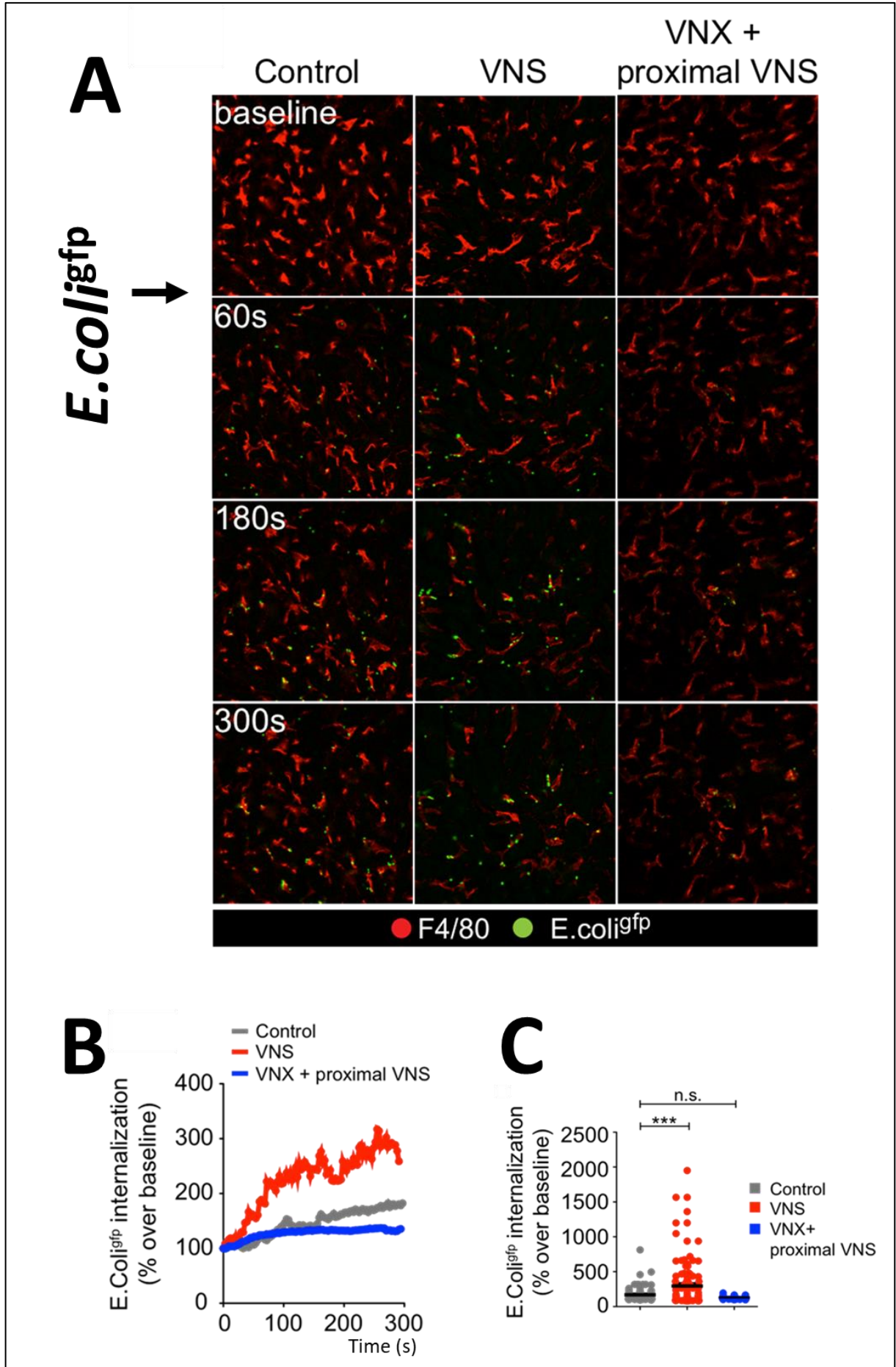


2
 4 FIGURA 8 - Estimulação elétrica do nervo vago aumenta a atividade de fagocitose pelas
 células de Kupffer. **A, B**) Bactérias *E.coli*^{gfp} (verde) aderidas às células de Kupffer
 (vermelho), como apontado pelas setas. **C**) Diferença na atividade fagocítica entre os grupos
 6 Controle e VNS, (n=5). **D, E e F**) Quantificação da fagocitose por cintilografia, (n=3). **G**)

2 quantificação de radiação total no fígado, pulmão e baço, (n=3). *representa diferença
estatística para $p < 0,05$ e *** representa diferença estatística para $p < 0,001$.

4 Para provar que o aumento da atividade fagocítica foi mediado pelas fibras eferentes
do nervo vago, submetemos um grupo de animais a uma cirurgia de vagotomia (VNX) do ramo
6 cervical esquerdo, seguida de estimulação do coto proximal, remanescente do nervo vago. De
forma muito interessante, esse procedimento implicou na redução da atividade de fagocitose,
8 suportando os resultados de que o aumento da fagocitose hepática é mediado pelo nervo vago
(FIGURA 9). Em conjunto, os experimentos apontam para a existência fisiológica de um
10 circuito neuro-imunológico- hepático, mediado pelo X nervo craniano, sendo as células de
Kupffer um de seus alvos.

2

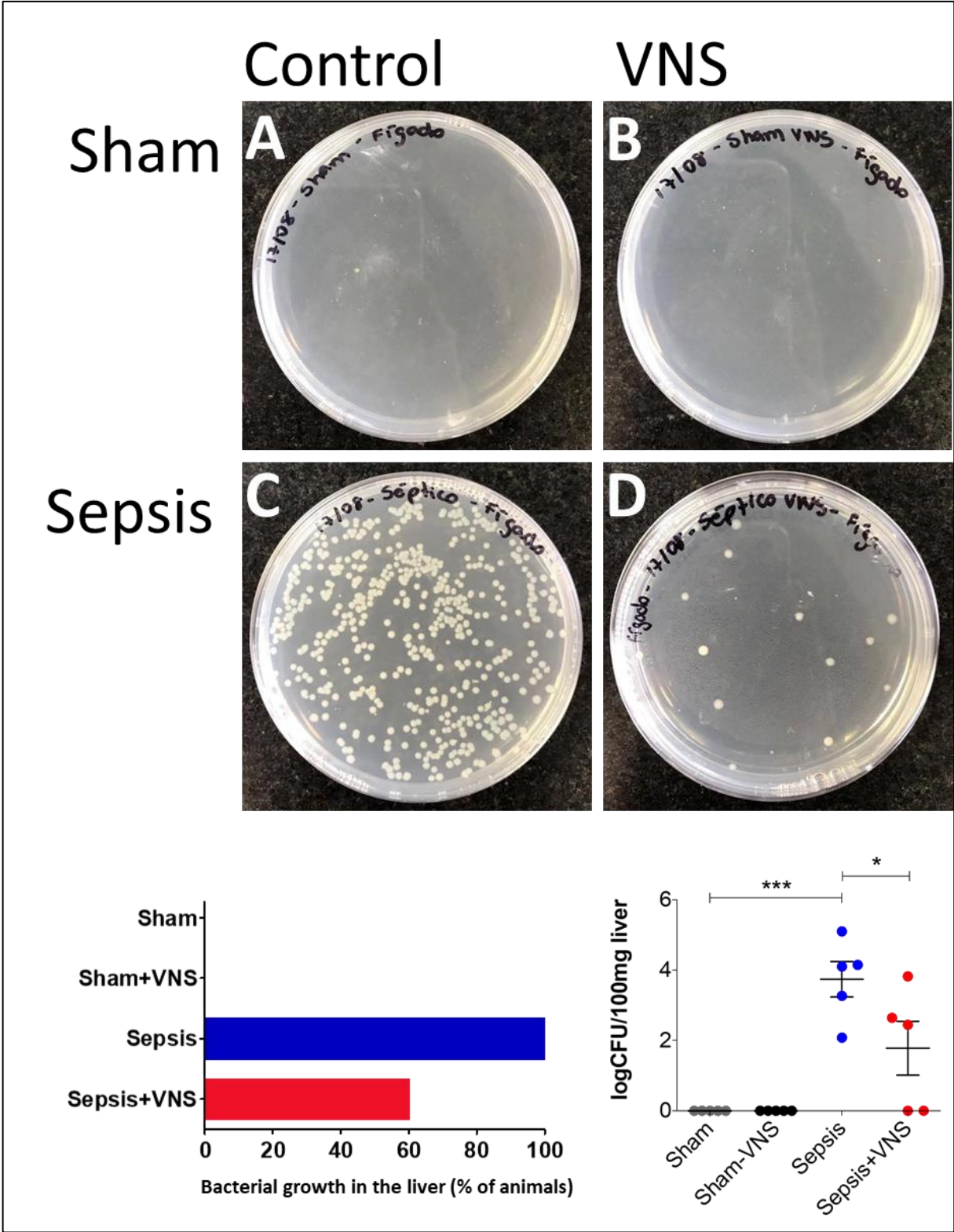


2 FIGURA 97 - Dinâmica de fagocitose dos macrófagos residentes do fígado é impactada pelo
tônus vagal eferente. **A)** Imagens da atividade de fagocitose das células de Kupffer, in vivo,
4 no tempo inicial e nos 60, 180 e 300 segundos dos vídeos de microscopia intravital. Os
macrófagos, marcados pelo anticorpo F4/80, são mostrados em vermelho. As bactérias são
6 mostradas em verde. **B e C)** O aumento de fagocitose mediado pelo nervo vago foi abolido
quando as fibras motoras do nervo foram interrompidas (n=52 células por grupo). ***
8 representa diferença estatística para $p < 0,001$.

5.4 Estimulação elétrica do nervo vago aumenta a depuração de bactérias no fígado

10 O fígado é uma das principais frentes de defesa do organismo em relação ao meio
externo. Em uma situação de infecção do trato gastrointestinal, proveniente da má ingesta
12 alimentar ou hábitos diversos, pode ocorrer translocação bacteriana para o fígado (GALLO;
HOOPER, 2012). Neste caso, a fagocitose pelas células de Kupffer é crucial para manter a
14 homeostase do indivíduo. Diante dessas informações, foi investigada a participação do circuito
neuro-hepático, proposto neste trabalho, na atividade de fagocitose pelos macrófagos hepáticos.
16 Para isso utilizamos o modelo patológico de indução de sepse por CLP, seguido ou não de VNS
(FIGURA 10- A, B, C e D). Notavelmente, apenas 40% dos animais submetidos à cirurgia CLP
18 seguida de VNS (grupo Séptico+VNS) apresentaram crescimento unidades formadoras de
colônia (UFC) no fígado (FIGURA 10-E). Além disso, o número de colônias formadas no
20 fígado dos demais animais do grupo Séptico+VNS foi 200 vezes menor comparado ao
crescimento bacteriano do grupo Séptico (FIGURA 10-F). Nos grupos Sham e Sham+ VNS
22 não observamos formação de UFC. Tal resultado demonstra que a ativação do nervo vago
aumentou a depuração de bactérias pelos macrófagos hepáticos.

24 O aumento da depuração de bactérias no fígado induzido por VNS é uma
contraprova de que a estimulação do nervo vago prima as células de Kupffer para a fagocitose
26 e aponta para uma importante relevância clínica do reflexo neuro-imunológico hepático.



2

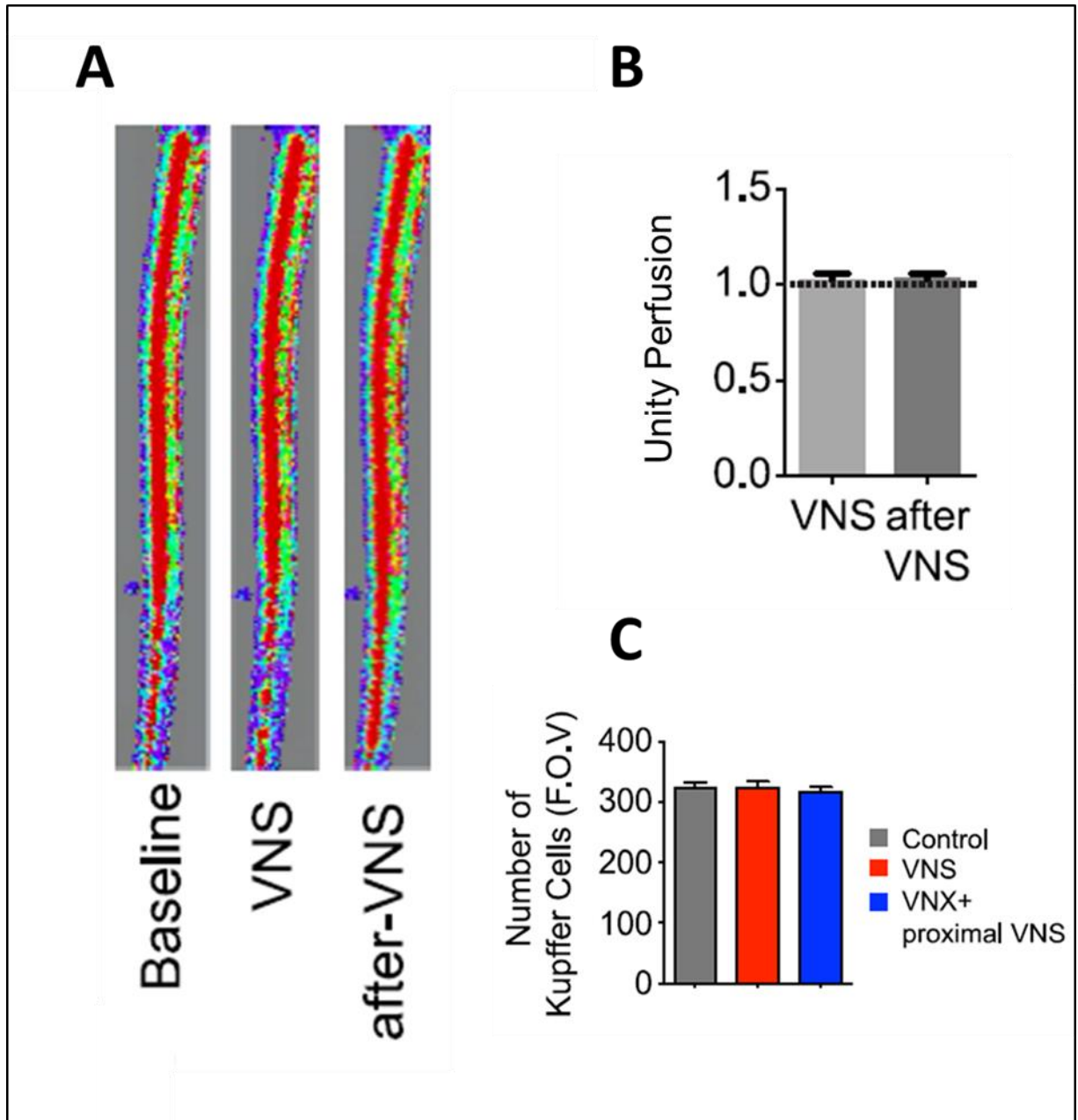
4

2 FIGURA 10- A estimulação do nervo vago aumentou a depuração de bactérias pelos
macrófagos hepáticos Crecimento bacteriano do fígado de animais dos grupos **A) Sham, B)**
4 **Sham+VNS, C) Séptico, D) Séptico+VNS. E e F) Diferença no crescimento de UFC entre os**
grupos experimentais, representado em porcentagem e logarítimo, respectivamente, (n=5).
6 *representa diferença estatística para $p<0,05$ e *** representa diferença estatística para
 $p<0,001$.

8 **5.5 A estimulação do nervo vago não altera o fluxo sanguíneo ou o número de células de Kupffer ou lesiona o fígado**

10 Foi hipotetizado que o aumento da fagocitose observada no fígado deve-se ao
aumento do número de células Kupffer em resposta à ativação do nervo vago. Para testar essa
12 hipótese, foi feita a contagem do número desses macrófagos, no programa ImageJ. O número
de células de Kupffer permaneceu inalterado entre os grupos controle, VNS e VNX, provando
14 que a modulação do nervo vago não altera o número de macrófagos no fígado (FIGURA 11-
C).

16 Posteriormente, foi ponderado se o aumento da fagocitose observado no fígado após
VNS é devido a alterações do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, da perfusão hepática,
18 propiciando maior aporte de bactérias para o fígado ou maior tempo de contato entre as
bactérias e as células de Kupffer. Com o auxílio da técnica de monitoramento e imagem do
20 fluxo sanguíneo com aparelho Laser Doppler, foi mostrado que a ativação elétrica do nervo
vago utilizada nesse estudo não alterou o fluxo sanguíneo sistêmico dos animais (FIGURA 11-
22 A e B). Embora a ativação do nervo vago provoque alterações na frequência cardíaca, a
intensidade do estímulo elétrico utilizado neste trabalho não foi suficiente para alterar o fluxo
24 sanguíneo sistêmico e provavelmente não aumentou o aporte de bactérias para o fígado.



2

4

6

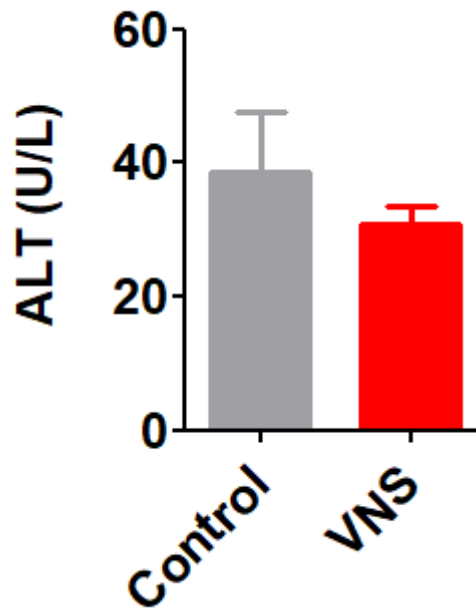
8

FIGURA 11 - Ativação do nervo vago não alterou o fluxo sanguíneo e nem o número de células de Kupffer. **A**) Imagens do fluxo sanguíneo na calda dos camundongos durante o repouso (basal), imediatamente e 5 minutos após VNS. As cores quentes indicam maior fluxo sanguíneo. **B**) VNS não alterou de forma significativa a intensidade do fluxo sanguíneo sistêmico, (n=3). **C**) O número de macrófagos hepáticos não foi alterado pela modulação do nervo vago, (n=5).

10

As respostas imunológicas no microambiente hepático podem ser iniciadas e reguladas por lesões no parênquima do órgão. Com o objetivo de investigar se as alterações na atividade das células de Kupffer estavam relacionadas com algum grau de lesão no fígado após

2 o protocolo de VNS, nós analisamos se esse procedimento causa danos hepáticos. Para isso, a
enzima alanina transferase (ALT) foi dosada do soro dos animais. A presença de ALT em
4 grandes quantidades na circulação sistêmica indica danos celulares em hepatócitos. Comparado
com o grupo controle, os níveis séricos de ALT não foram alterados pela VNS, indicando
6 ausência de lesão das células parênquimas do fígado (FIGURA 12).

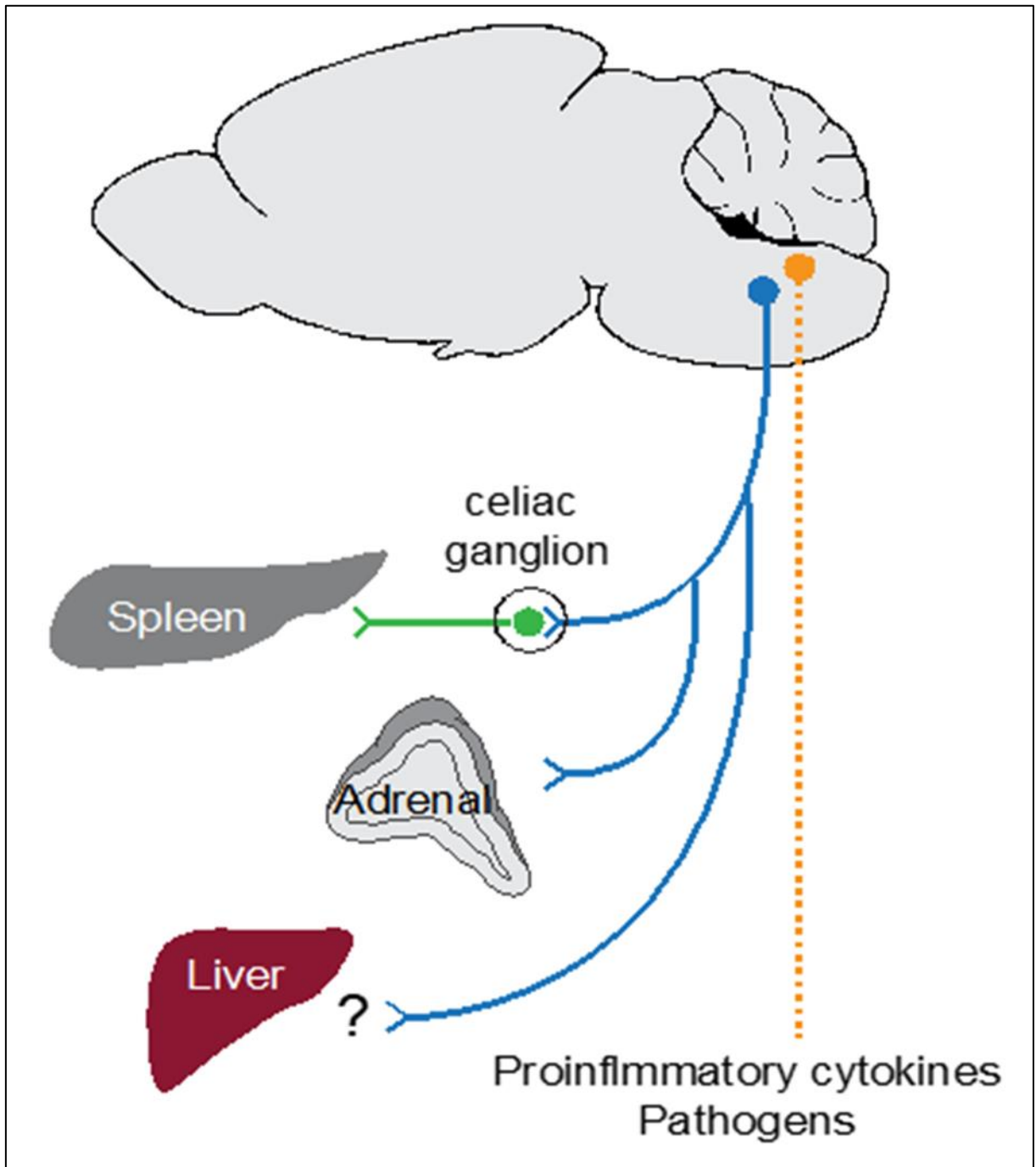


8 FIGURA 12 - Estimulação do nervo vago não altera os níveis séricos da enzima alanina
transferase (ALT). O grupo VNS (vermelho) não possui lesão hepática em comparação com o
10 grupo controle (cinza), (n=3).

5.6 O circuito neuroimunológico mediado pelo nervo vago tem ações diretas no fígado

12 Os circuitos neuroimunológicos estão presentes em diversos órgãos como o baço,
glândulas adrenais e intestino (BOROVIKOVA et al., 2000b; GABANYI et al., 2016;
14 TORRES-ROSAS et al., 2014a). No eixo esplênico, as fibras colinérgicas que se projetam para
o baço fazem sinapse com o gânglio celíaco em primeira instância. A acetilcolina liberada nesta
16 sinapse ativa o nervo esplênico, que é noradrenérgico. A noradrenalina liberadas por estas
fibras, no baço, induz as células T a liberarem acetilcolina, que se liga a seus receptores na
18 superfície de macrófagos, resultando na redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias
(BOROVIKOVA et al., 2000b) (FIGURA 13). Por outro lado, a sinalização colinérgica para as
20 glândulas adrenais, desencadeia a liberação de dopamina, a qual induz um perfil anti-

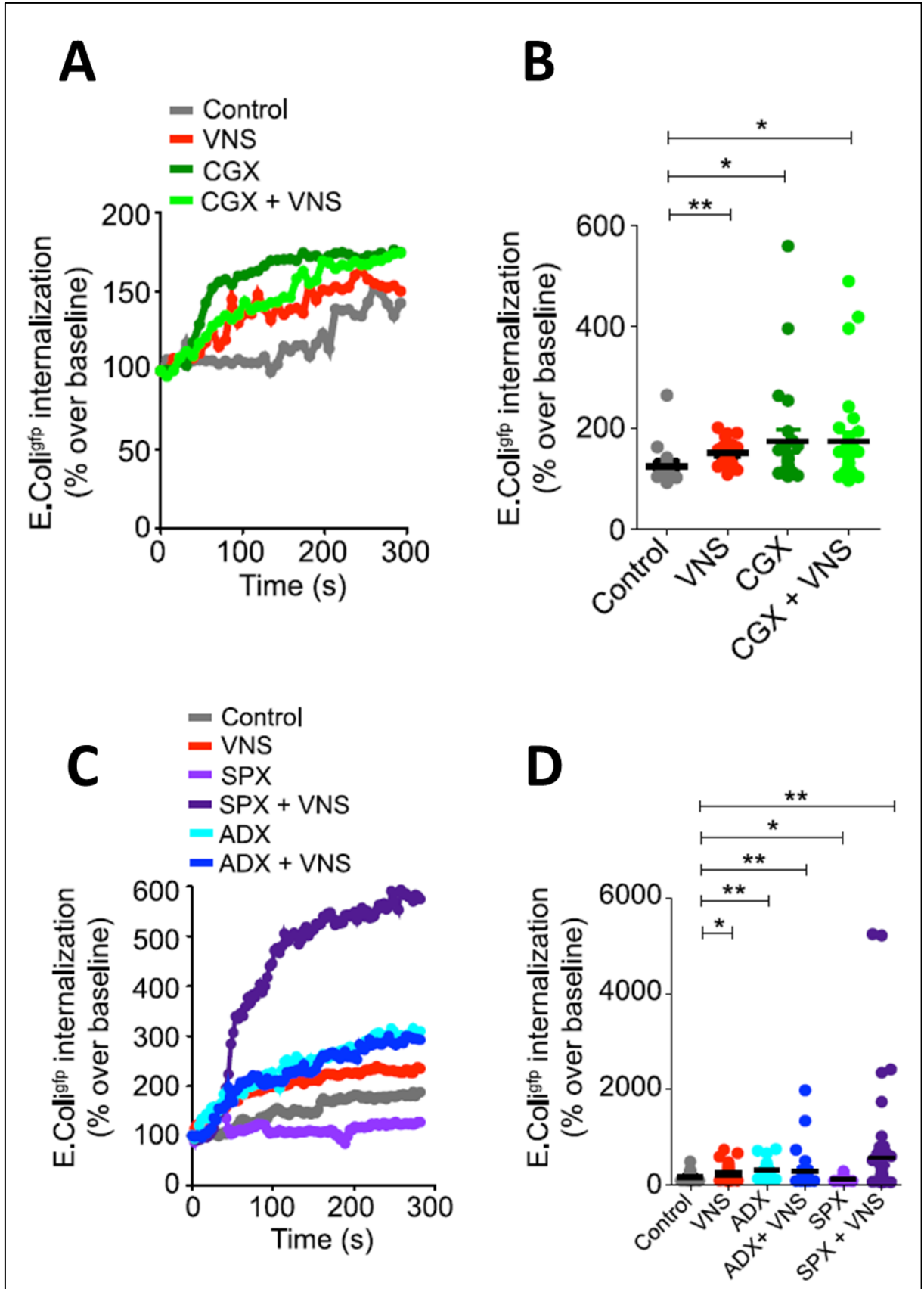
- 2 inflamatório, juntamente com a corticosterona, hormônio produzido no córtex dessas glândulas
 (TORRES-ROSAS et al., 2014). Tendo em vista a participação do nervo vago nas respostas
 4 descritas acima, investigamos se o fenótipo observado no fígado é originado pela sinalização
 direta do nervo vago ou se decorre da ativação colinérgica de outros órgãos.



8 FIGURA 8 - Esquema da hipótese de que o nervo vago modula, diretamente, a atividade das células de Kupffer. Linha pontilhada laranja representa as fibras aferentes do nervo vago

2 chegando no núcleo do trato solitário, no bulbo. As fibras eferentes do nervo vago foram
prepresentadas pela linha azul.

4 Para esclarecer esse ponto, nós realizamos a remoção cirúrgica dos componentes
do circuito anti-inflamatório clássico, a saber: gânglio celíaco (CGX) (FIGURA 14-A e B),
6 baço (esplenectomia, SPX) ou glândulas adrenais (adrenalectomia bilateral, ADX) (FIGURA
14-C e D). De maneira interessante, não observamos a perda do reflexo vagal sobre as células
8 de Kupffer em nenhuma das condições experimentais acima. No entanto, constatamos o
aumento da atividade de fagocitose no fígado dos animais dos grupos CGX, CGX+VNS, ADX,
10 ADX+VNS e SPLX+VNS, em relação ao grupo Controle. Curiosamente, verificamos que na
ausência do baço a atividade de fagocitose é marcadamente elevada no fígado em resposta à
12 estimulação do nervo vago (grupo SPLX+VNS) quando comparada aos demais grupos
experimentais. Esses resultados sugerem que os componentes clássicos do circuito anti-
14 inflamatório não são a origem do fenótipo estudado, embora possam modulá-lo de alguma
forma.



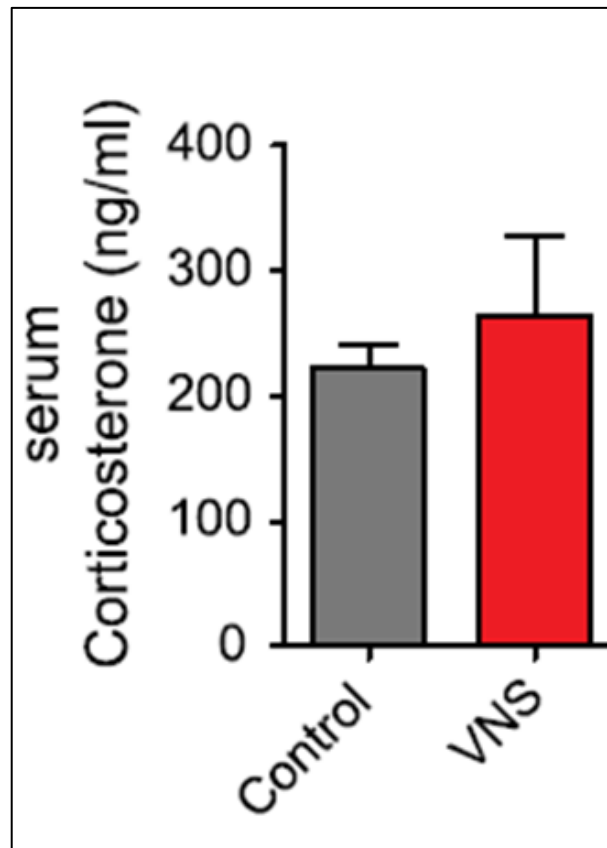
2

FIGURA 9: Existe um ramo hepático do reflexo anti-inflamatório colinérgico. **A e B)** A resposta de fagocitose hepática é elevada quando o gânglio é removido. **C e D)** Esse mesmo

4

2 padrão de resposta foi observado quando as glândulas adrenais foram removidas. Entretanto,
3 nos animais esplenectomizados, o fenótipo foi reproduzido apenas mediante VNS. n=5. *
4 representa diferença estatística para $p < 0,05$ e ** significa diferença estatística para $p < 0,01$

5 Em seguida, os níveis séricos de corticosterona, produzido pelas glândulas adrenais
6 foram medidos entre os grupos controle e VNS com o objetivo de verificar se o perfil anti-
7 inflamatório do fenótipo em estudo é devido à ação dessa substância. Foi observado que os
8 níveis séricos de corticosterona não são alterados por VNS, de forma imediata, corroborando
9 com a não participação das glândulas adrenais para a gênese da atividade de fagocitose nas
10 células de Kupffer (FIGURA 15).



12 FIGURA 10 - Ativação do nervo vago não alterou concentrações séricas de corticosterona.
13 n=4.

14 Tendo em vista os achados deste trabalho, nós propusemos que o aumento da
15 atividade fagocítica pelos macrófagos residentes do fígado é um efeito da estimulação do nervo
16 vago diretamente no fígado.

2 5.7 Proximidade espacial entre fibras colinérgicas e células de Kupffer

Uma vez que os resultados deste trabalho indicam uma interação entre as fibras eferentes do nervo vago e as células de Kupffer, nós aplicamos um neurotraçador, DIO fluorescente no comprimento de onda verde, na região cervical do nervo vago para demonstrar a localização de estruturas neuronais colinérgicas no fígado. Por imagens de microscopia intravital do fígado, observamos estruturas positivas para o neurotraçador (verde) (FIGURA 16-A) localizadas muito próximas de algumas células de Kupffer (vermelho) (FIGURA 16-B e C). Esse é um indício de que existe uma interação direta do nervo vago com os macrófagos residentes hepáticos.

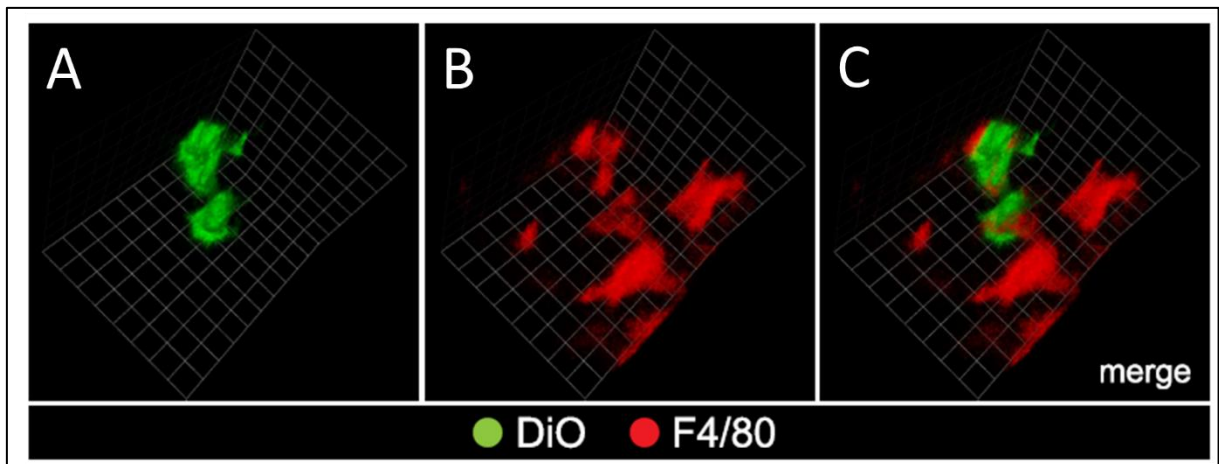
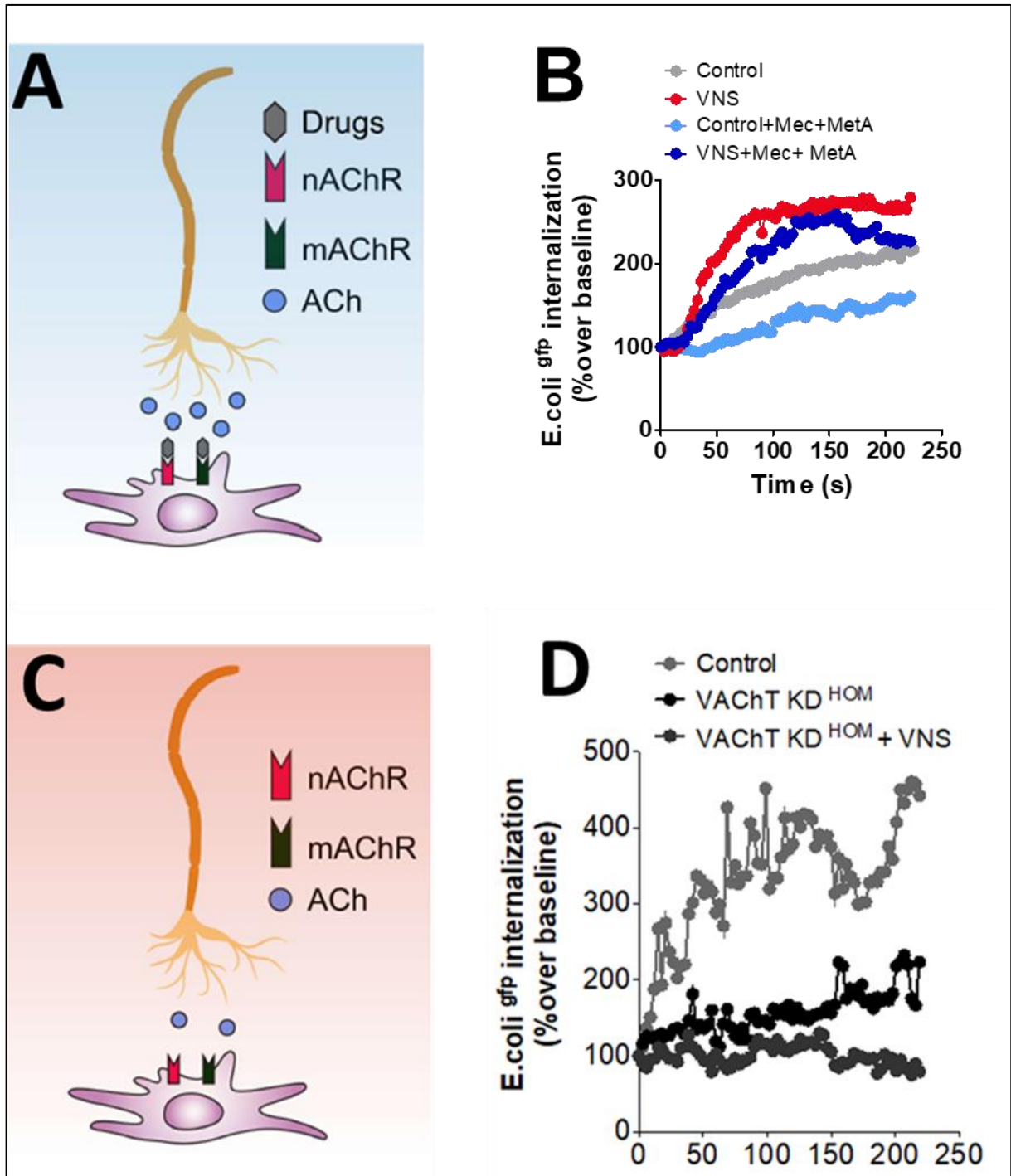


FIGURA 11 - Proximidade entre o nervo vago e as células de Kupffer. Imagem de microscopia confocal 3D, mostrando **A**) estruturas positivas para o neurotraçador (verde), **B**) células de Kupffer marcadas com o anticorpo F4/80 (vermelho) e **C**) sobreposição das imagens A e B.

16 5.8 Inibição da sinalização colinérgica resulta em redução da atividade basal dos macrófagos hepáticos

Finalmente, para comprovar a existência do circuito neuroimunológico no fígado, avaliamos a atividade de fagocitose das células de Kupffer após a modulação farmacológica ou genética da sinalização colinérgica. Uma vez que o principal neurotransmissor do nervo vago é a acetilcolina, foi administrado um coquetel com antagonistas de seus receptores nicotínicos e muscarínicos (mecamilamina e metil-atropina, respectivamente) para bloquear a via de sinalização (FIGURA 17-A). Constatamos que o bloqueio farmacológico dos receptores de

2 acetilcolina impacta o fenótipo de aumento de fagocitose pelas células de Kupffer, tanto em
condições basais quanto em resposta à VNS (grupo VNS+Meca+MetA) (FIGURA 17-B). Nos
4 camundongos da linhagem VAcHT-KD^{HOM} as vias de sinalização colinérgica são deficientes,
uma vez que esses animais possuem aproximadamente 60% menos transportadores de
6 acetilcolina em comparação a camundongos selvagens (FIGURA 17-C). A análise da dinâmica
de fagocitose demonstrou que os animais do grupo VAcHT-KD^{HOM} apresentam atividade de
8 fagocitose basal reduzida, se comparada ao grupo Controle. Além disso, a estimulação do nervo
vago não foi eficiente em aumentar a fagocitose no grupo VAcHT-KD^{HOM} +VNS (FIGURA
10 17-D).



2

4

6

8

FIGURA 12 - A modulação da sinalização colinérgica reduz a atividade basal de fagocitose nos macrófagos residentes do fígado. **A)** Esquema da inibição farmacológica dos receptores de acetilcolina. **B)** Os receptores colinérgicos são essenciais para o aumento de fagocitose mediado por VNS. **C)** Representação da diminuição de acetilcolina na fenda sináptica resultante da modulação genética dos animais VACHT KD^{HOM}. **D)** A modulação da ação da acetilcolina impediu o aumento da fagocitose hepática.

2 Juntos, esses dados corroboram com os resultados de que o sistema nervoso modula
a atividade de fagocitose no fígado por mediação do nervo vago, uma vez que o bloqueio de
4 um dos componentes do circuito proposto (sinalização colinérgica) implica em ausência do
fenótipo observado.

6 **5.9 Estimulação elétrica do nervo vago modula o perfil secretório hepático**

8 O reflexo colinérgico anti-inflamatório é classicamente estudado em modelos de
desafio imunológico (endotoxemia) e é bem estabelecido que a ativação desse reflexo não
impacta a expressão da interleucina 10, mas diminui a expressão de citocinas pró-inflamatórias
10 no baço (TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-18) (Borovikova, Ivanova, Zhang, *et al.*, 2000; Tracey, 2002).
Diante do exposto, investigamos em nosso modelo de estudo se VNS altera o perfil secretório
12 hepático, além de impactar na atividade fagocítica das células de Kupffer. Constatamos que a
expressão de citocinas no fígado não é alterada nos primeiros 20 minutos após a VNS (tempo
14 decorrente entre o estímulo elétrico do nervo e o ensaio de fagocitose) (FIGURA 18).

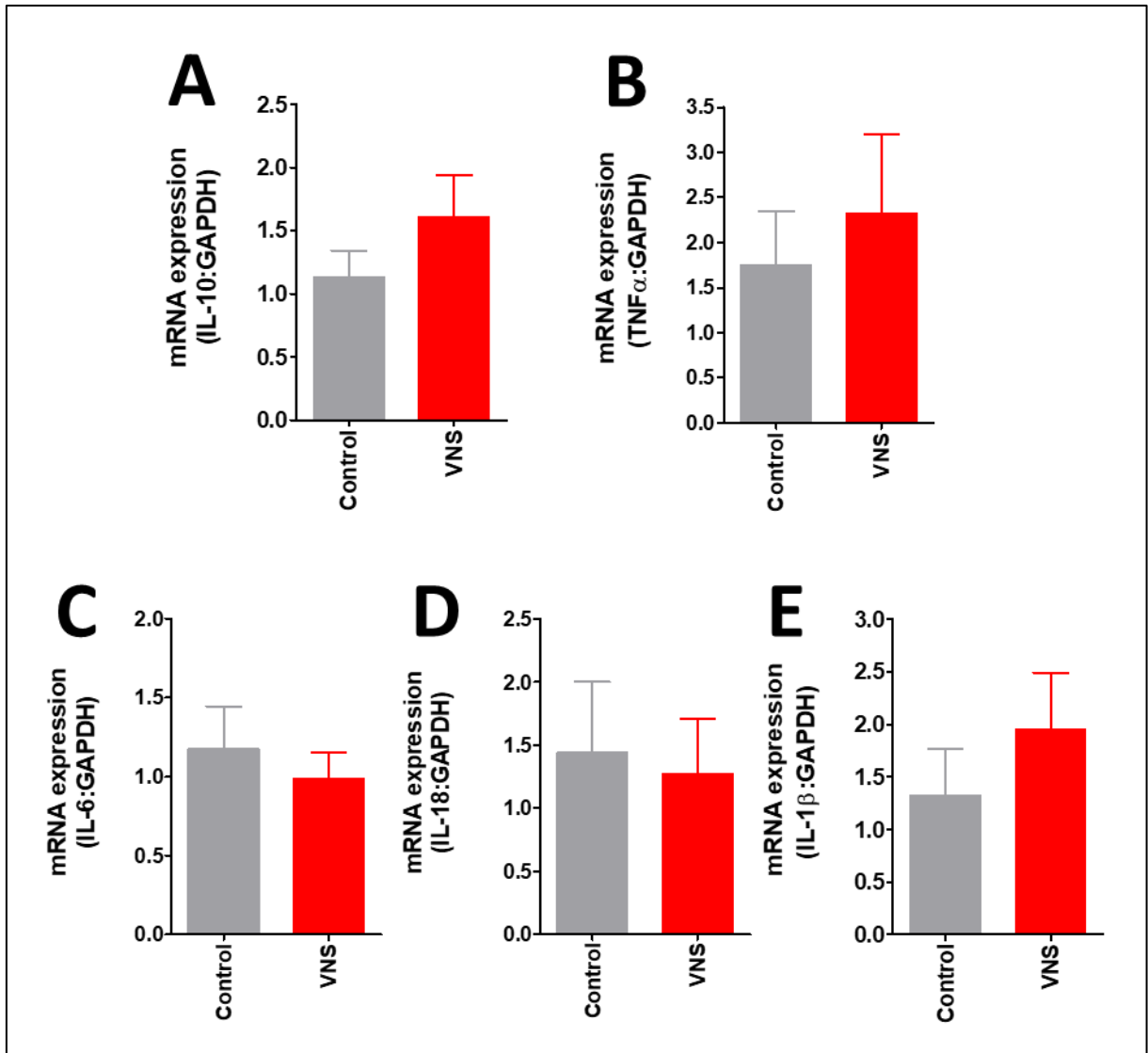
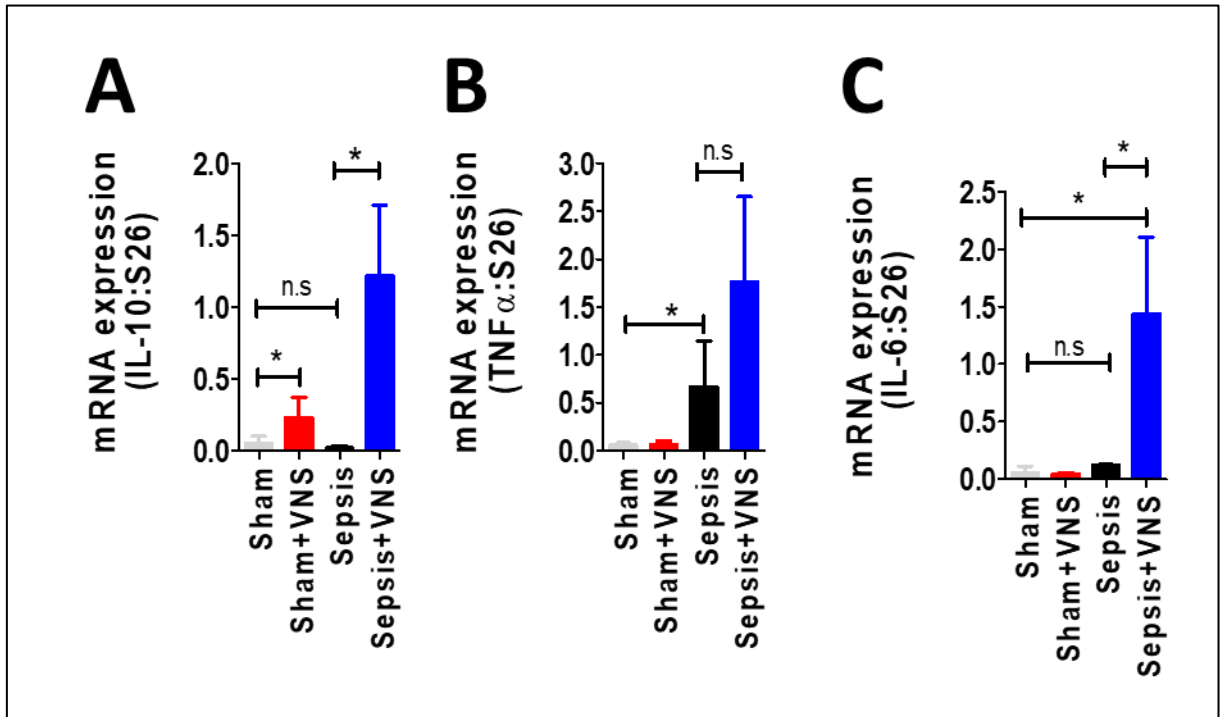


FIGURA 13 - A estimulação do nervo vago não altera a expressão de citocinas hepáticas imediatamente. Expressão relativa das citocinas **A)** IL-10, **B)** TNF- α , **C)** IL-6, **D)** IL-18, **E)** IL-1 β ; n=4.

Posteriormente, pesquisamos se o circuito colinérgico hepático é capaz de impactar a expressão de citocinas em animais desafiados imunologicamente. Utilizamos, para tanto, o modelo de sepse não letal induzida por ligadura e punção do ceco (CLP) e analisamos a expressão gênica das citocinas 6 horas após VNS (FIGURA 19). Curiosamente, observamos que VNS induziu o aumento da expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 nos animais que não foram submetidos ao desenvolvimento de sepse e não alterou os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6. Dessa forma, mostramos pela primeira vez, que que o circuito colinérgico promove um perfil anti-inflamatório no fígado tanto em estado fisiológico quanto durante um desafio imunológico (FIGURA 19-A). Entretanto, VNS não impactou a expressão

- 2 gênica de TNF- α em nenhuma das situações estudadas (FIGURA 19-B). Intrigantemente,
verificamos uma elevação da expressão hepática de IL-6 nos animais sépticos em resposta à
4 VNS (FIGURA 19-C).



- 6 FIGURA 14 - Perfil secretório do fígado em resposta à VNS. Expressão hepática de A) IL-10,
B) TNF- α e C) IL-6; n=4.

2 6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, demonstramos a existência de um circuito neuroimunológico hepático mediado pelo nervo vago, capaz de aumentar a atividade fagocítica dos macrófagos residentes no fígado (células de Kupffer), além de induzir um fenótipo anti-inflamatório e pró-regenerativo. Nossos resultados sugerem que esse circuito pode ser considerado como o ramo hepático de um grande circuito neuroimunológico sistêmico integrado pelo X nervo craniano, que tem como objetivo manter a homeostase imunológica dos tecidos por meio do balanço entre resistência (respostas de proteção efetiva) e tolerância (capacidade de limitar a severidade de uma doença iniciada por infecção patogênica ou inflamação).

A estimulação elétrica do nervo vago (VNS) induziu uma mudança significativa na morfologia nas células de Kupffer, que passaram de células predominantemente fusiformes para células com maior número de prolongamentos e uma morfologia “estrelada”. Essa alteração morfológica pode ocorrer em função do remodelamento das fibras corticais de actina e miosina (VAN DER ZANDEN et al., 2009) e está associada com a ativação desse tipo celular, como descrito para outros tecidos (GOLD et al., 1999). Nesse sentido, as células de Kupffer de animais submetidos a VNS apresentaram maior capacidade de aderência de bactérias à superfície dessas células, sugerindo um aumento da capacidade fagocítica pelos macrófagos hepáticos. De fato, VNS promoveu maior eficiência no *clearance* bacteriano em um modelo de sepse não-letal induzido por perfuração e ligadura cecal, confirmando os achados da microscopia intravital. Interessantemente, essas alterações morfológicas supracitadas bem como a modulação da aderência bacteriana na superfície das células de Kupffer não foram observadas após a vagotomia do ramo cervical esquerdo do nervo vago, principal fonte de fibras eferentes para o trato gastrointestinal - incluindo o fígado (BERTHOUD; NEUHUBER, 2000) -, e estimulação do coto proximal do nervo. Em adição, nós utilizamos um outro modelo de investigação de atividade fagocitária baseado em imagens de cintilografia. Nesse modelo, nós injetamos estanho coloidal marcado com tecnécio-99, um radiofármaco bastante utilizado na investigação da função e da morfologia hepática pelo fato de ser ativamente fagocitado pelas células de Kupffer no fígado (KYUNG et al., 2009). Após a injeção intravenosa desse composto, nós observamos que o fígado é o principal local de captação do coloide e que VNS aumenta a capacidade do fígado de fagocitar o radiofármaco. Ainda, não observamos aumento nos níveis de radiação em outros órgãos que abrigam macrófagos residentes, como pulmão e baço. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a estimulação do nervo vago ativa as células de Kupffer e aumenta a capacidade das mesmas em fagocitar substâncias, mostrando uma nova

2 interação neuroimunológica capaz de modular uma resposta imunológica inata do organismo.
3 Nossos achados também corroboram dados na literatura que sugerem que o fígado seja um dos
4 principais órgãos envolvidos no patrulhamento e remoção de substâncias/bactérias que
5 translocam do epitélio intestinal (DAVID et al., 2016; JENNE; KUBES, 2013).

6 As fibras do nervo vago que inervam o fígado são sabidamente colinérgicas em sua
7 maioria. Cerca de 90% do neurônios pré-ganglionares do nervo vago são colinérgicos e apenas
8 10% são catecolaminérgicos. Os neurônios pós-ganglionares associados ao nervo vago são
9 também majoritariamente colinérgicos, mas nesse caso também existem neurônios contendo
10 óxido nítrico peptídeo intestinal vasoativo (VIP) peptídeo liberador de gastrina (GRP) dentre
11 outros mediadores neuroendócrinos importantes (BERTHOUD, 2004; BERTHOUD;
12 CARLSON; POWLEY, 1991; BERTHOUD; KRESSEL; NEUHUBER, 1992; DE JONGE et
13 al., 2005; NEUHUBER et al., 1998). De qualquer forma, é possível estabelecer que a
14 acetilcolina é um dos principais neurotransmissores associados ao nervo vago, tendo sido
15 associada no eixo clássico da sinalização colinérgica anti-inflamatória (PAVLOV; TRACEY,
16 2012a). Por isso, nós investigamos a participação da sinalização colinérgica na modulação da
17 atividade de fagocitose das células de Kupffer no fígado em um modelo animal, VACHT-
18 KD^{HOM} , que apresenta deficiência dos transportadores de acetilcolina e, conseqüentemente 60%
19 menos liberação do neurotransmissor na fenda sináptica (LIMA et al., 2010). Quando
20 comparado com animais selvagens (WT), as células de Kupffer dos animais VACHT- KD^{HOM}
21 apresentaram menor capacidade basal de fagocitose de bactérias, indicando a importância da
22 participação da sinalização da acetilcolina nessa resposta. A estimulação do nervo vago não foi
23 capaz de aumentar a atividade fagocitária nos animais VACHT- KD^{HOM} . Sabe-se que no sistema
24 nervoso central as fibras vagais são ativadas através da sinalização dos receptores muscarínicos
25 de acetilcolina enquanto que periféricamente, os receptores nicotínicos são responsáveis por
26 desencadear a cascata de sinalização que resulta nas respostas anti-inflamatórias (PAVLOV et
27 al., 2003). Sendo assim, nós utilizamos um modelo animal de inibição farmacológica de
28 receptores muscarínicos e nicotínicos periféricos pela administração de metiltropina e
29 mecamilamina. O antagonismo de receptores colinérgicos diminuiu a capacidade de fagocitose
30 pelas células de Kupffer tanto em condições basais quanto após VNS. A ligação da acetilcolina
31 aos receptores nAChR- $\beta 2$ na superfície dos macrófagos foi descrita por Esmerij et al como o
32 mecanismo desencadeador da exocitose de endomembranas e formação do fagossomo por
33 intermédio da via de sinalização de $\alpha 2$ -GTPase (VAN DER ZANDEN et al., 2009). Por
34 outro lado, está bem estabelecido que os receptores nAChR- $\alpha 7$ participam da cascata de

2 sinalização que provoca os efeitos anti-inflamatórios do circuito colinérgico clássico
(BOROVIKOVA et al., 2000a). Portanto, o mecanismo molecular que ativa as células de
4 Kupffer para sua atividade de fagocitose e altera seu perfil de ativação ainda precisa ser
elucidado.

6 O eixo anti-inflamatório clássico mediado pelo nervo vago pode ser dividido em
duas vias gerais. A primeira, é a ação direta do nervo vago e do principal neurotransmissor
8 associado a essas fibras que é a acetilcolina. A segunda via envolve sinapses do nervo vago em
gânglios catecolaminérgicos cujos nervos inervam órgãos secundários, como o baço e as
10 glândulas adrenais. A sinalização do nervo vago para as glândulas adrenais resulta na produção
do neurotransmissor dopamina, que diminui a expressão de citocinas pró-inflamatórias
12 (TORRES-ROSAS et al., 2014b). Esse efeito também acontece no baço, após a liberação de
norepinefrina pelo nervo esplênico, induzida pela ativação colinérgica do gânglio celíaco
14 (BERNIK et al., 2002; BOROVIKOVA et al., 2000b; PAVLOV et al., 2003; ROSAS-
BALLINA et al., 2011; TRACEY, 2002). No presente estudo, mostramos que a remoção
16 cirúrgica do baço, gânglio celíaco ou das glândulas adrenais não aboliu o aumento da fagocitose
após VNS. Pelo contrário, na ausência do gânglio celíaco ou das glândulas adrenais, essa
18 resposta foi exacerbada mesmo antes da VNS, indicando que esses órgãos podem modular, mas
não originar tal fenótipo. A participação das glândulas adrenais na resposta fagocítica foi
20 novamente excluída, devido ao fato de que a VNS não alterou os níveis séricos de
corticosterona, um hormônio de ação anti-inflamatória produzido no córtex dessas glândulas.
22 Uma outra evidência importante, e já mencionada, de que o circuito descrito neste trabalho é
específico do fígado são os experimentos envolvendo estanho coloidal cojugado com tecnécio-
24 99, haja visto que apenas os macrófagos residentes no fígado tiveram sua atividade fagocítica
modulada pela estimulação do nervo vago.

26 Até este ponto do estudo nós descrevemos um circuito neural mediado pelo nervo
vago capaz de ativar especificamente e de maneira direta as células de Kupffer no fígado. Sendo
28 assim, nós hipotetizamos a existência de uma comunicação direta entre o nervo vago e o
parênquima hepático. Nós evidenciamos a interação entre o nervo vago e as células de Kupffer
30 após a coloração do ramo cervical do nervo com o neurotraçador DIO. Apesar do fígado ser um
órgão ricamente inervado, existe muito pouca informação acerca da distribuição e função
32 específica de fibras nervosas no parênquima hepático. Essa lacuna na literatura foi
brilhantemente compartilhada por Lautt em seus trabalhos na década de 80 e persiste até hoje
34 na literatura (LAUTT, 1980, 2009a). Na verdade, isso se deve pela grande variação da inervação

2 e distribuição dos nervos hepáticos em diferentes espécies. Por exemplo, fígados de
camundongos apresentam inervação pouco extensa, sendo que a mesma chega no fígado através
4 do hilo hepático e acompanha a trajetória dos vasos sanguíneos e ductos biliares no interior do
órgão, restringindo-se ao espaço periportal e zona 1 do lóbulo hepático. Por outro lado, em
6 humanos, terminações nervosas já foram descritas em contato com células de Kupffer, células
de Ito, endoteliais e hepatócitos em diferentes extensões do lóbulo hepático (LAUTT, 2009b).
8 No presente estudo, nossos resultados sugerem uma proximidade entre algumas células de
Kupffer e fibras vagais, interação esta que pode ser responsável pela modulação da atividade
10 dos macrófagos residentes no fígado que descrevemos no presente trabalho. Funcionalmente,
essa comunicação é sustentada pela demonstração do efeito modulador da sinalização
12 colinérgica sobre as funções metabólicas e imunológicas das células de Kupffer (KESSLER et
al., 2012; KIMURA et al., 2016; NISHIO et al., 2017). No entanto, esse é um achado que precisa
14 ser melhor explorado futuramente utilizando ferramentas mais específicas.

Finalmente, demonstramos a importância de ativação do circuito colinérgico
16 hepático frente a um desafio imunológico: a indução de sepse por ligadura e perfuração cecal.
Nesse modelo experimental, a ativação do nervo vago impactou o perfil secretório. Tal fato,
18 associado ao aumento da atividade fagocítica hepática, resultou na redução, na ordem de 2 log,
do crescimento bacteriano em placas de cultura do fígado, ou seja, propiciou maior depuração
20 das bactérias no fígado dos animais vago-estimulados. Incrivelmente, apenas 40% dos animais
submetidos à VNS apresentaram crescimento de unidades formadoras de colônia no fígado. Em
22 suporte aos nossos resultados, foi exposto que a sinalização colinérgica por meio dos receptores
 $\alpha 7$ -nAChR previne contra a inflamação sistêmica e sepse experimental e que pacientes sépticos
24 apresentam um desbalanço do tônus vagal devido à super excitação do sistema parassimpático
(HUANG et al., 2010; HUSTON, 2012). Existe ainda, uma correlação entre o tônus vagal
26 impactado em indivíduos obesos e uma elevada taxa de mortalidade por sepse, durante o
período hospitalar desses pacientes (DE LARTIGUE; DE LA SERRE; RAYBOULD, 2011;
28 PAVLOV; TRACEY, 2012a; WANG; YIN; YAO, 2016). Com relação ao perfil de secreção
de citocinas no fígado durante a sepse, nossos resultados, em um primeiro olhar, parecem
30 paradoxais. A estimulação do nervo vago, eixo anti-inflamatório, aumentou, simultaneamente,
a expressão de IL-10 e IL-6, sem alterar os níveis de TNF- α . Inclusive, observamos que o
32 aumento de IL-10 em resposta à VNS ocorreu em estado fisiologicamente estável (grupo
Sham+ VNS), assim como em animais submetidos ao protocolo de sepse (grupo Séptico+VNS).
34 Acreditamos que o fenótipo anti-inflamatório desencadeado pela sinalização colinérgica, em

2 condições fisiológicas, se dá pelos elevados níveis de IL-10, citocina anti-inflamatória, em
detrimento da supressão da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α , IL-18 e IL-
4 1 β) que acontece no baço (BOROVIKOVA et al., 2000b). Embora os primeiros estudos tenham
mostrado que a ativação do reflexo colinérgico clássico, por endotoxemia, não altera a
6 expressão de IL-10 em macrófagos humanos (BOROVIKOVA et al., 2000b), o resultado
apresentado neste trabalho tem suporte nos ensaios experimentais onde a adição de nicotina,
8 um agonista dos receptores de acetilcolina, no meio de cultura de macrófagos intestinais
provocou o aumento de IL-10 no meio (VAN DER ZANDEN et al., 2009). Assim, apesar da
10 ativação do circuito neuro-hepático ter proporcionado um fenótipo anti-inflamatório, aumentou
a expressão de IL-6 e não diminuiu a expressão de TNF- α . Isto pode ser explicado pela ação
12 regenerativa das citocinas IL-6 e TNF- α no fígado. A citocina IL-6 é o principal estimulador
mitogênico dos hepatócitos e o ativador da via de transcrição 3 (STAT3), primordial para a
14 ocorrências dos eventos iniciais da regeneração (MEIJER et al., 2000; SPECTOR et al., 1997;
ZHONG; WEN; DARNELL, 1994). Após uma injúria hepática, a citocina TNF- α liga-se ao
16 receptor tipo 1 do fator de necrose tumoral (TNFRI) nas células de Kupffer e por meio da
ativação do fator de transcrição nuclear, kappa B, aumenta a expressão gênica de IL-6
18 (LIBERMANN; BALTIMORE, 1990; YAMADA et al., 1998). Por sua vez, a IL-6 secretada
pelos macrófagos hepáticos liga-se a seus receptores na superfície dos hepatócitos e promove a
20 ativação de STAT3, que é o sinal para a quebra da quiescência dos hepatócitos e implica na
ativação do ciclo celular para a regeneração (CRESSMAN; DIAMOND; TAUB, 1995). De
22 fato, o nervo vago está relacionado com uma melhor dinâmica de regeneração hepática, por
mediar o aumento da secreção de IL-6 pelas células de Kupffer (IKEDA et al., 2009). Portanto,
24 é provável que a sinalização colinérgica no fígado não diminua a expressão de TNF- α e IL-6
para que a atividade proliferativa do fígado possa ser ativada rapidamente. Assim, nossa
26 interpretação para os resultados é de que o nervo vago promove, no fígado, um fenótipo anti-
inflamatório pelo aumento de IL-10, e pró-regenerativo, por manter elevados os níveis de IL-6
28 e TNF- α .

O mecanismo de ativação do circuito neuro-hepático aqui proposto permanece
30 obscuro, embora hipotetizamos que ele seja ativado em estado fisiológico e diante de um
desafio imunológico. É provável que, fisiologicamente o reflexo neuro-hepático seja ativado
32 pelas fibras aferentes do nervo vago mecano e quimiossensíveis, no momento pós-prandial,
com o objetivo de conter uma eventual infecção por patógenos, advinda do hábito alimentar.
34 Essa hipótese é sustentada pelo fato de que as fibras aferentes do sistema portal hepático e do

2 intestino estão envolvidas na detecção de nutrientes, regulação de curto prazo do
comportamento alimentar e movimentos musculares do trato gastro-intestinal (GOEHLER et
4 al., 2000; MALJAARS et al., 2008; PAVLOV; TRACEY, 2012b; RÜTTIMANN et al., 2009).
Essas fibras aferentes transmitem as informações detectadas referentes aos níveis de lipídeos,
6 colecistocinina, leptina, peptídeo YY e insulina para o cérebro e culminam na ativação de fibras
motoras do nervo vago (OWYANG; HELDSINGER, 2011; YI et al., 2010). A sinalização
8 colinérgica provoca, fisiologicamente, um aumento transitório na permeabilidade intestinal
(VAN DER ZANDEN et al., 2009), podendo ser um momento crítico com relação a
10 translocação de patógenos. Agentes infecciosos que translocam da luz intestinal para o
organismo são drenados ao fígado por meio da veia porta (MACPHERSON;
12 HEIKENWALDER; GANAL-VONARBURG, 2016). Dessa forma, o aumento da fagocitose
pelas células de Kupffer e a ativação de um eixo anti-inflamatório e pró-regenerativo pelo
14 mesmo circuito neural pode acontecer simultaneamente para que patógenos ou outras toxinas
possam ser depurados ou metabolizados no fígado, sitio de maior *clearance* bacteriano
16 (HOSPITAL, 1958; MACPHERSON; HEIKENWALDER; GANAL-VONARBURG, 2016;
MANWARING; COE, 2014; WARDLAW; HOWARD, 1959) sem que haja uma resposta
18 inflamatória e danos significativos ao órgão. A translocação bacteriana por meio do epitélio
intestinal está associada ao desenvolvimento de diversas doenças, a saber: doença intestinal
20 inflamatória, colite ulcerativa, doença de Crohn, úlceras duodenais, pancreatite, diarreia,
enterocolite necrotizante e doenças que acometem outros órgãos sistêmicos, como sepsis,
22 artrite, esteatohepatites, síndrome de resposta inflamatória sistêmica, síndrome de disfunção de
múltiplos órgãos, doença celíaca, diabetes e obesidade (BALZAN et al., 2007; BISCHOFF,
24 2011; CAMILLERI, 2012; CANI et al., 2008; NAGPAL; YADAV, 2017). Portanto, o estudo
minucioso do novo circuito neuro-imunológico hepático que, por meio da sinalização
26 colinérgica eferente, capacita o fígado a adaptar-se e prevenir-se contra as perturbações
provocadas pela presença de patógenos, mantendo a homeostase fisiológica e imunológica do
28 indivíduo, pode elucidar novas estratégias terapêuticas para melhorar o quadro clínico dos
pacientes que apresentam aumento da permeabilidade intestinal e pode levar ao
30 desenvolvimento de metodologias para melhorar a regeneração hepáticas de pacientes.

2 7 CONCLUSÃO

Neste trabalho mostramos a existência de um circuito neuro-imunológico hepático, mediado pelo nervo vago, que impacta as células de Kupffer por ativar resposta imune inata (aumento de fagocitose) e altera o perfil secretório do fígado criando um ambiente anti-inflamatório (aumento de IL-10) e pró-regenerativo (aumento de IL-6). A ativação desse novo circuito aumenta o *clearance* de bactérias translocadas para o fígado e pode ser, futuramente, uma estratégia terapêutica para os pacientes com doenças inflamatórias do fígado, que possuem a barreira epitelial do intestino comprometida ou sépticos.

10

2 8 REFERÊNCIAS

- 4 **Agilent Genomics : Tools - Bio Calculators**. Disponível em:
 <<https://www.genomics.agilent.com/biocalculators/calcODBacterial.jsp>>. Acesso em: 8 mar. 2018.
- 6 AMINZADEH, M. et al. TRPM2 dependence of ROS-induced NLRP3 activation in
 Alzheimer’s disease. **International Immunopharmacology**, v. 54, n. April 2017, p. 78–85,
 8 2018.
- BALZAN, S. et al. Bacterial translocation: Overview of mechanisms and clinical impact.
 10 **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 22, n. 4, p. 464–471, abr. 2007.
- BANKS, W. A. The blood-brain barrier in neuroimmunology: Tales of separation and
 12 assimilation. **Brain, behavior, and immunity**, v. 44, p. 1–8, fev. 2015.
- BERNIK, T. R. et al. Cholinergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis
 14 factor during ischemia reperfusion. **Journal of Vascular Surgery**, v. 36, n. 6, p. 1231–1236,
 dez. 2002.
- 16 BERTHOUD, H. R. Anatomy and function of sensory hepatic nerves. **Anatomical Record -
 Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 280, n. 1, p. 827–
 18 835, 2004.
- BERTHOUD, H. R.; CARLSON, N. R.; POWLEY, T. L. Topography of efferent vagal
 20 innervation of the rat gastrointestinal tract. **The American journal of physiology**, v. 260, n. 1
 Pt 2, p. R200-7, 1991.
- 22 BERTHOUD, H. R.; KRESSEL, M.; NEUHUBER, W. L. An anterograde tracing study of
 the vagal innervation of rat liver, portal vein and biliary system. **Anatomy and Embryology**,
 24 v. 186, n. 5, p. 431–442, 1992.
- BERTHOUD, H. R.; NEUHUBER, W. L. Functional and chemical anatomy of the afferent
 26 vagal system. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 85, n. 1–3, p. 1–17, 2000.
- BISCHOFF, S. C. “Gut health”: a new objective in medicine? **BMC medicine**, v. 9, p. 24, 14
 28 mar. 2011.
- BOROVIKOVA, L. V. et al. Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated
 30 suppression of acute inflammation. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 85, n.
 1–3, p. 141–147, 2000a.
- 32 BOROVIKOVA, L. V et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory
 response to endotoxin. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 458–462, 2000b.
- 34 BOSE, T. Role of immunological memory cells as a therapeutic target in multiple sclerosis.
Brain Sciences, v. 7, n. 11, 2017.
- 36 CAMILLERI, M. Irritable bowel syndrome: how useful is the term and the “diagnosis”?
Therapeutic Advances in Gastroenterology, v. 5, n. 6, p. 381–386, 27 nov. 2012.
- 38 CANI, P. D. et al. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced
 Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. **Diabetes**, v. 57, n. 6,
 40 p. 1470–1481, 1 jun. 2008.

- 2 CARAVACA, A. S. et al. A novel flexible cuff-like microelectrode for dual purpose, acute
and chronic electrical interfacing with the mouse cervical vagus nerve. **Journal of Neural**
4 **Engineering**, v. 14, n. 6, p. 66005, 1 dez. 2017.
- 6 CHAVAN, S. S.; PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. Mechanisms and Therapeutic Relevance
of Neuro-immune Communication. **Immunity**, v. 46, n. 6, p. 927–942, 2017.
- 8 CLARK, J. M. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. **Journal of**
Clinical Gastroenterology, v. 40, n. SUPPL. 1, p. 5–10, 2006.
- 10 CRESSMAN, D. E.; DIAMOND, R. H.; TAUB, R. Rapid activation of the Stat3 transcription
complex in liver regeneration. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 21, n. 5, p. 1443–9, maio
1995.
- 12 DAVID, B. A. et al. Combination of Mass Cytometry and Imaging Analysis Reveals Origin,
Location, and Functional Repopulation of Liver Myeloid Cells in Mice. **Gastroenterology**, v.
14 151, n. 6, p. 1176–1191, 2016.
- 16 DAVIES, L. C. et al. Europe PMC Funders Group Tissue-resident macrophages. v. 14, n. 10,
p. 986–995, 2014.
- 18 DE JONGE, W. J. et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by
activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. **Nature Immunology**, v. 6, n. 8, p. 844–851,
2005.
- 20 DE LARTIGUE, G.; DE LA SERRE, C. B.; RAYBOULD, H. E. Vagal afferent neurons in
high fat diet-induced obesity; intestinal microflora, gut inflammation and cholecystokinin.
22 **Physiology & behavior**, v. 105, n. 1, p. 100–5, 30 nov. 2011.
- 24 DECK, J. et al. $\alpha 7$ -Nicotinic acetylcholine receptor subunit is not required for
parasympathetic control of the heart in the mouse. **Physiological Genomics**, v. 22, n. 1, p.
86–92, 2005.
- 26 ERICKSON, M. A.; DOHI, K.; BANKS, W. A. Neuroinflammation: A common pathway in
CNS diseases as mediated at the blood-brain barrier. **NeuroImmunoModulation**, v. 19, n. 2,
28 p. 121–130, 2012.
- 30 FREDMAN, G.; TABAS, I. Boosting Inflammation Resolution in Atherosclerosis: The Next
Frontier for Therapy. **American Journal of Pathology**, v. 187, n. 6, p. 1211–1221, 2017.
- 32 FUNG, T. C.; OLSON, C. A.; HSIAO, E. Y. Interactions between the microbiota, immune
and nervous systems in health and disease. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 145–155,
2017.
- 34 GABANYI, I. et al. Neuro-immune Interactions Drive Tissue Programming in Intestinal
Macrophages. **Cell**, 2016.
- 36 GALLO, R. L.; HOOPER, L. V. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine.
Nature Reviews Immunology, v. 12, n. 7, p. 503–516, 2012.
- 38 GALLOWITSCH-PUERTA, M.; PAVLOV, V. A. Neuro-immune interactions via the
cholinergic anti-inflammatory pathway. **Life Sciences**, v. 80, n. 24–25, p. 2325–2329, 2007.
- 40 GAMMELLA, E. et al. Macrophages: central regulators of iron balance. **Metallomics**, v. 6, n.
8, p. 1336–1345, 2014.
- 42 GOEHLER, L. E. et al. Vagal immune-to-brain communication: A visceral chemosensory

- 2 pathway. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 85, n. 1–3, p. 49–59, 2000.
- 4 GOLD, E. S. et al. Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages. **The Journal of experimental medicine**, v. 190, n. 12, p. 1849–56, 1999.
- 6 GUSTOT, T. et al. Sepsis in alcohol-related liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 67, n. 5, p. 1031–1050, 2017.
- 8 HAMANO, R. et al. Stimulation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor inhibits CD14 and the toll-like receptor 4 expression in human monocytes. **Shock**, v. 26, n. 4, p. 358–364, 2006.
- 10 HEIJTZ, R. D. et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 7, p. 3047–3052, 2011.
- 12 HEYMANN, F. et al. Liver Inflammation Abrogates Immunological Tolerance Induced by Kupffer Cells. **Hepatology**, v. 62, n. 1, p. 279–291, 2015.
- 14 HONDA, K.; LITTMAN, D. R. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 75–84, 2016.
- 16 HOSPITAL, M. The Opsonic Effect of Normal Serum on the Uptake of Bacteria by the Reticulo-Endothelial System. p. 338–352, 1958.
- 18 HUANG, L. T. et al. Activation of presynaptic $\alpha 7$ nicotinic receptors evokes an excitatory response in hippocampal CA3 neurones in anaesthetized rats: An in vivo iontophoretic study. **British Journal of Pharmacology**, v. 159, n. 3, p. 554–565, 2010.
- 20 HUSTON, J. M. et al. Transcutaneous vagus nerve stimulation reduces serum high mobility group box 1 levels and improves survival in murine sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 35, n. 12, p. 2762–2768, 2007.
- 22 HUSTON, J. M. The vagus nerve and the inflammatory reflex: wandering on a new treatment paradigm for systemic inflammation and sepsis. **Surgical infections**, v. 13, n. 4, p. 187–93, ago. 2012.
- 24 HUSTON, J. M.; TRACEY, K. J. The pulse of inflammation: heart rate variability, the cholinergic anti-inflammatory pathway and implications for therapy. **Journal of internal medicine**, v. 269, n. 1, p. 45–53, jan. 2011.
- 26 HUSTON, J. M.; TRACEY, K. J. The pulse of inflammation: heart rate variability, the cholinergic anti-inflammatory pathway and implications for therapy. **Journal of internal medicine**, v. 269, n. 1, p. 45–53, jan. 2011.
- 28 IKEDA, O. et al. Autonomic Regulation of Liver Regeneration After Partial Hepatectomy in Mice. **Journal of Surgical Research**, v. 152, n. 2, p. 218–223, 1 abr. 2009.
- 30 JENNE, C. N.; KUBES, P. Immune surveillance by the liver. **Nature Immunology**, v. 14, n. 10, p. 996–1006, 2013.
- 32 JI, H. et al. Central cholinergic activation of a vagus nerve-to-spleen circuit alleviates experimental colitis. **Mucosal Immunology**, v. 7, n. 2, p. 335–347, 24 mar. 2014.
- 34 KESSLER, W. et al. The role of the nerve: Modulation of the inflammatory reaction in murine polymicrobial sepsis. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, 2012.
- 36 KIMURA, K. et al. Central Insulin Action Activates Kupffer Cells by Suppressing Hepatic Vagal Activation via the Nicotinic Alpha 7 Acetylcholine Receptor. **Cell Reports**, v. 14, p. 2362–2374, 2016.
- 38 KRENKEL, O.; TACKE, F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 5, p. 306–321, 2017.
- 40

- 2 KRISTIANSEN, M. et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 198–201, 2001.
- 4 KYUNG, M. S. et al. A detailed examination of pulmonary uptake of ^{99m}Tc-tin colloid in healthy mature miniature pigs. **In Vivo**, 2009.
- 6 LARAUCHE, M.; MULAK, A.; TACHÉ, Y. Stress and visceral pain: From animal models to clinical therapies. **Experimental Neurology**, v. 233, n. 1, p. 49–67, 2012.
- 8 LAUTT, W. W. Hepatic nerves: a review of their functions and effects. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 58, n. 2, p. 105–23, fev. 1980.
- 10 LAUTT, W. W. **Hepatic Circulation**. [s.l.] Morgan & Claypool Life Sciences, 2009a.
LAUTT, W. W. Hepatic Nerves. 2009b.
- 12 LAVIN, Y. et al. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. **Cell**, v. 159, n. 6, p. 1312–1326, 2014.
- 14 LEE, Y. K. et al. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. Supplement_1, p. 4615–4622, 2011.
- 16 LENNON, E. M. et al. Early life stress triggers persistent colonic barrier dysfunction and exacerbates colitis in adult IL-10^{-/-} Mice. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 19, n. 4, p. 712–719, 2013.
- 18 LIBERMANN, T. A.; BALTIMORE, D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. **Molecular and Cellular Biology**, v. 10, n. 5, p. 2327–2334, 1990.
- 20
22 LIMA, R. D. F. et al. Quantal release of acetylcholine in mice with reduced levels of the vesicular acetylcholine transporter. **Journal of Neurochemistry**, v. 113, n. 4, p. 943–951, 2010.
- 24
26 LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 1 dez. 2001.
- 28
30 LOPEZ, B. G. et al. Characterization of Kupffer cells in livers of developing mice. **Comparative Hepatology**, v. 10, n. 1, p. 2, 2011.
- 32 MACPHERSON, A. J.; HEIKENWALDER, M.; GANAL-VONARBURG, S. C. The Liver at the Nexus of Host-Microbial Interactions. **Cell Host and Microbe**, v. 20, n. 5, p. 561–571, 2016.
- 34 MADARA, J. L. Warner-Lambert/Parke-Davis Award lecture. Pathobiology of the intestinal epithelial barrier. **The American journal of pathology**, v. 137, n. 6, p. 1273–1281, 1990.
- 36 MAGALHAES, J. G.; TATTOLI, I.; GIRARDIN, S. E. **The intestinal epithelial barrier: How to distinguish between the microbial flora and pathogens** **Seminars in Immunology**, 2007.
- 38
40 MALJAARS, P. W. J. et al. Effect of ileal fat perfusion on satiety and hormone release in healthy volunteers. **International Journal of Obesity**, v. 32, n. 11, p. 1633–1639, 16 nov. 2008.

- 2 MANWARING, W. H.; COE, H. C. Endothelial Opsonins. p. 401–408, 2014.
- 4 MARQUES, P. E. et al. **Understanding liver immunology using intravital microscopy** *Journal of Hepatology*, 2015.
- 6 MEIJER, C. et al. Kupffer cell depletion by CI2MDP-liposomes alters hepatic cytokine expression and delays liver regeneration after partial hepatectomy. *Liver*, v. 20, n. 1, p. 66–77, fev. 2000.
- 8 NADER, L. A.; DE MATTOS, A. A.; BASTOS, G. A. N. Burden of liver disease in Brazil. *Liver International*, v. 34, n. 6, p. 844–849, 2014.
- 10 NAGPAL, R.; YADAV, H. Bacterial Translocation from the Gut to the Distant Organs: An Overview. *Annals of Nutrition and Metabolism*, v. 71, n. 1, p. 11–16, 2017.
- 12 NAITO, M. et al. Differentiation and function of Kupffer cells. *Medical Electron Microscopy*, v. 37, n. 1, p. 16–28, 2004.
- 14 NEUHUBER, W. L. et al. Vagal efferent and afferent innervation of the rat esophagus as demonstrated by anterograde DiI and DiA tracing: Focus on myenteric ganglia. *Journal of the Autonomic Nervous System*, v. 70, n. 1–2, p. 92–102, 1998.
- 16 NEW, R. et al. Efficacy of bioactive cyclic peptides in rheumatoid arthritis: Translation from in vitro to in vivo models. *Molecules*, v. 22, n. 10, 2017.
- 18 NISHIO, T. et al. Hepatic vagus nerve regulates Kupffer cell activation via $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Gastroenterology*, v. 52, n. 8, p. 965–976, 2 ago. 2017.
- 20 OUYANG, C.; HELDSINGER, A. Vagal control of satiety and hormonal regulation of appetite. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, v. 17, n. 4, p. 338–348, 2011.
- 22 PAVLOV, V. A. et al. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, v. 9, n. 5–8, p. 125–34, 2003.
- 24 PAVLOV, V. A. et al. Central muscarinic cholinergic regulation of the systemic inflammatory response during endotoxemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 13, p. 5219–5223, 2006.
- 26 PAVLOV, V. A. et al. Selective $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis*. *Critical Care Medicine*, v. 35, n. 4, p. 1139–1144, abr. 2007.
- 28 PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. **The vagus nerve and the inflammatory reflex - Linking immunity and metabolism** *Nature Reviews Endocrinology*, 2012a.
- 30 PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. The vagus nerve and the inflammatory reflex - Linking immunity and metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 8, n. 12, p. 743–754, 2012b.
- 32 PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. Neural regulation of immunity: Molecular mechanisms and clinical translation. *Nature Neuroscience*, v. 20, n. 2, p. 156–166, 2017.
- 34 POWELL, N.; WALKER, M. M.; TALLEY, N. J. The mucosal immune system: Master regulator of bidirectional gut-brain communications. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, v. 14, n. 3, p. 143–159, 2017.

- 2 PRADO, V. F. et al. Mice Deficient for the Vesicular Acetylcholine Transporter Are
Myasthenic and Have Deficits in Object and Social Recognition. **Neuron**, v. 51, n. 5, p. 601–
4 612, 2006.
- 6 QIU, B. S. et al. The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced
reactivation of experimental colitis. **Nature Medicine**, v. 5, n. 10, p. 1178–1182, 1999.
- 8 REA, K.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. The microbiome: A key regulator of stress and
neuroinflammation. **Neurobiology of Stress**, v. 4, p. 23–33, 2016.
- 10 REHM, J. et al. Alcohol as a risk factor for liver cirrhosis: A systematic review and meta-
analysis. **Drug and Alcohol Review**, v. 29, n. 4, p. 437–445, 2010.
- 12 REN, T.-H. et al. Effects of neonatal maternal separation on neurochemical and sensory
response to colonic distension in a rat model of irritable bowel syndrome. **American Journal
of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 292, n. 3, p. G849–G856, 2007.
- 14 ROOK, G. A. W.; RAISON, C. L.; LOWRY, C. A. Microbiota, Immunoregulatory Old
Friends and Psychiatric Disorders. In: **Advances in experimental medicine and biology**. [s.l.:
16 s.n.]. v. 817p. 319–356.
- 18 ROSAS-BALLINA, M. et al. Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a
Vagus Nerve Circuit. **Science**, v. 334, n. 6052, p. 98–101, 7 out. 2011.
- 20 RÜTTIMANN, E. B. et al. Intrameal hepatic portal and intraperitoneal infusions of glucagon-
like peptide-1 reduce spontaneous meal size in the rat via different mechanisms.
Endocrinology, v. 150, n. 3, p. 1174–81, mar. 2009.
- 22 SCHOEMAKER, M. H.; MOSHAGE, H. Defying death: the hepatocyte's survival kit.
Clinical science (London, England : 1979), v. 107, n. 1, p. 13–25, 2004.
- 24 SCOTT, C. L. et al. Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully
differentiated Kupffer cells. **Nature Communications**, v. 7, p. 1–10, 2016.
- 26 SLOAN, R. P. et al. RR interval variability is inversely related to inflammatory markers: the
CARDIA study. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 13, n. 3–4, p. 178–84, 2007.
- 28 SPECTOR, M. S. et al. Differential regulation of the mitogen-activated protein and stress-
activated protein kinase cascades by adrenergic agonists in quiescent and regenerating adult
30 rat hepatocytes. **Molecular and cellular biology**, v. 17, n. 7, p. 3556–65, jul. 1997.
- 32 THU NGUYEN-LEFEBVRE, A.; HORUZSKO, A. Kupffer Cell Metabolism and Function.
Journal of Enzymology and Metabolism, v. 1, n. 1, p. 583–592, 2015.
- 34 TORRES-ROSAS, R. et al. Dopamine mediates vagal modulation of the immune system by
electroacupuncture. **Nature Medicine**, v. 20, n. 3, p. 291–295, 2014a.
- 36 TORRES-ROSAS, R. et al. Dopamine mediates vagal modulation of the immune system by
electroacupuncture. **Nature Medicine**, 2014b.
- TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853–859, 19 dez. 2002.
- 38 VAN DER ZANDEN, E. P. et al. Vagus Nerve Activity Augments Intestinal Macrophage
Phagocytosis via Nicotinic Acetylcholine Receptor $\alpha 4\beta 2$. **Gastroenterology**, 2009.
- 40 VARGHESE, A. K. et al. Antidepressants Attenuate Increased Susceptibility to Colitis in a
Murine Model of Depression. **Gastroenterology**, v. 130, n. 6, p. 1743–1753, 2006.

- 2 VOLLMAR, B.; MENGER, M. D. The Hepatic Microcirculation: Mechanistic Contributions
and Therapeutic Targets in Liver Injury and Repair. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 4, p.
4 1269–1339, 2009.
- 6 WALLEY, K. R. et al. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of
murine sepsis. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 11, p. 4733–4738, 1996.
- 8 WANG, D. W.; YIN, Y. M.; YAO, Y. M. Vagal Modulation of the Inflammatory Response in
Sepsis. **International Reviews of Immunology**, v. 35, n. 5, p. 415–433, 2016.
- 10 WANG, G. et al. The utility of food antigen test in the diagnosis of Crohn’s disease and
remission maintenance after exclusive enteral nutrition. **Clinics and Research in Hepatology
and Gastroenterology**, 2017.
- 12 WANG, H. et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of
inflammation. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 384–388, 2003.
- 14 WANG, Y. et al. Plasma cholesteryl ester transfer protein is predominantly derived from
Kupffer cells. **Hepatology**, v. 62, n. 6, p. 1710–1722, 2015.
- 16 WARDLAW, A C.; HOWARD, J. G. A comparative survey of the phagocytosis of different
species of bacteria by Kupffer cells; perfusion studies with the isolated rat liver. **British
18 journal of experimental pathology**, v. 40, n. 2, p. 113–117, 1959.
- 20 WILLIAMS, E. K. K. et al. Sensory Neurons that Detect Stretch and Nutrients in the
Digestive System. **Cell**, 2016.
- 22 WREE, A.; MARRA, F. The inflammasome in liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 65,
n. 5, p. 1055–1056, 2016.
- 24 XIANG, Y.-X. et al. Electrical stimulation of the vagus nerve protects against cerebral
ischemic injury through an anti-inflammatory mechanism. **Neural regeneration research**, v.
10, n. 4, p. 576–82, abr. 2015.
- 26 YAMADA, Y. et al. Analysis of liver regeneration in mice lacking type 1 or type 2 tumor
necrosis factor receptor: Requirement for type 1 but not type 2 receptor. **Hepatology**, v. 28, n.
28 4, p. 959–970, out. 1998.
- 30 YI, C. X. et al. The role of the autonomic nervous liver innervation in the control of energy
metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1802, n. 4, p.
416–431, 2010.
- 32 ZANNETTI, C. et al. Characterization of the Inflammasome in Human Kupffer Cells in
Response to Synthetic Agonists and Pathogens. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 1, p.
34 356–367, 2016.
- 36 ZHONG, Z.; WEN, Z.; DARNELL, J. E. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine
phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. **Science (New
York, N.Y.)**, v. 264, n. 5155, p. 95–8, 1 abr. 1994.
- 38 ZIEMKA-NALECZ, M.; JAWORSKA, J.; ZALEWSKA, T. Insights into the
neuroinflammatory responses after neonatal hypoxia-ischemia. **Journal of Neuropathology
and Experimental Neurology**, v. 76, n. 8, p. 644–654, 2017.
-