

Hércules Ribeiro Leite



**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA COLINÉRGICO NA INFLAMAÇÃO E NO
COMPORTAMENTO DOENTIO EM ANIMAIS DEFICIENTES PARA O
TRANSPORTADOR VESICULAR DE ACETILCOLINA (VAcHT)**

Belo Horizonte

2013

HÉRCULES RIBEIRO LEITE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE NEUROCIÊNCIAS

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA COLINÉRGICO NA INFLAMAÇÃO E NO
COMPORTAMENTO DOENTIO EM ANIMAIS DEFICIENTES PARA O
TRANSPORTADOR VESICULAR DE ACETILCOLINA (VACHT)**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. André Ricardo Massensini

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Grace Schenatto
Pereira Moraes

Belo Horizonte

2011

RESUMO

A produção de mediadores inflamatórios é necessária para proteger o organismo contra patógenos e promover a reparação tecidual, mas a liberação excessiva de citocinas pode levar à inflamação sistêmica, neuroinflamação e “comportamentos doentios”. O sistema nervoso central interage dinamicamente com o sistema imune para modular o processo inflamatório através de vias humorais e neurais. Neste contexto, tem sido discutida a via “antiinflamatória colinérgica”, capaz de inibir a produção de algumas citocinas, uma vez que sinais transmitidos via nervo vago convergem às células do sistema imune que expressam o receptor colinérgico nicotínico alfa 7 (nAChR $\alpha 7$), prevenindo a liberação de mediadores pró-inflamatórios. Prado e colaboradores desenvolveram um modelo animal de hipofunção colinérgica central e periférica, onde o gene do transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT) teve sua expressão diminuída em 45% da proteína VAcHT. Assim, objetivou-se neste estudo caracterizar o processo inflamatório sistêmico e cerebral e suas implicações na geração do “comportamento doentio” após administração de lipopolissacarídeo (LPS) em animais deficientes para o VAcHT KD^{HOM} . Para isto, camundongos machos foram divididos em grupos: salina (WT SAL ou VAcHT KD^{HOM} SAL) ou que receberam o tratamento com LPS (WT LPS ou VAcHT KD^{HOM} LPS); bem como animais que receberam administração de inibidor da acetilcolinesterase (ACEI) (WT LPS ACEI ou VAcHT KD^{HOM} LPS ACEI) ou do agonista nicotina (NIC) (WT LPS NIC ou VAcHT KD^{HOM} LPS NIC). Inicialmente, os animais receberam um dose letal de LPS i.p (10 mg/Kg) para avaliação da taxa de sobrevivência dos mesmos. Posteriormente, administraram-se dose subletal de LPS (0.1 mg/Kg) objetivando-se controlar de forma adequada os parâmetros a serem avaliados: marcadores inflamatórios, atividade neuronal no tronco encefálico e comportamento doentio. Para avaliação da reversão do fenótipo, os animais receberam previamente administração de piridostigmina (3 mg/Kg) ou nicotina (0.4 mg/kg). Os animais foram sacrificados 1 ou 3 h após administração de dose subletal de LPS i.p. Os resultados revelaram uma menor sobrevivência dos animais VAcHT KD^{HOM} após administração de dose letal de LPS. Além disso, a inflamação sistêmica demonstrou um aumento do perfil pró-inflamatório esplênico (TNF α , IL-1 β , IL-6) e antiinflamatório (IL-10) no grupo VAcHT KD^{HOM} LPS. Concomitantemente foi demonstrado um aumento da atividade dos macrófagos esplênicos, bem como um maior recrutamento dos folículos linfóides neste mesmo órgão, indicando que o déficit colinérgico foi capaz de alterar o balanço inflamatório. O perfil sérico mostrou-se alterado no grupo VAcHT KD^{HOM} LPS, onde os mediadores TNF α e IL-6 mostraram-se elevados, entretanto sem modificar os níveis sanguíneos e peritoneais dos leucócitos totais. A reversão de fenótipo através do ACEI demonstrou-se eficaz apenas em reduzir os níveis de TNF α séricos e esplênicos. Entretanto, o agonista nicotínico reduziu quase totalmente os mediadores inflamatórios séricos e esplênicos. Interessantemente, foi demonstrada uma maior atividade neuronal via gene c-Fos nos núcleos do complexo vagal dorsal nos animais VAcHT KD^{HOM} LPS (Área postrema – AP; Núcleo do Trato Solitário – NTS; e Núcleo Motor Dorsal – DMN), responsáveis em modular as aferências sensoriais e eferências motoras da via antiinflamatória colinérgica vagal. Este aumento da atividade nos núcleos vagais, seria a porta de entrada para a modulação da neuroinflamação encontrada neste presente estudo, onde verificamos um aumento dos níveis de TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-10, revertido em 100% através do agonista nicotínico em animais deficientes para o VAcHT. Tanto os mecanismos humorais quanto neuronais, estão relacionados ao aparecimento do comportamento doentio em situações de inflamação sistêmica e neuroinflamação. Dessa forma, verificamos em nosso estudo que o espectro de alterações encontradas poderia ter influenciado positivamente para as alterações termorregulatórias, bem como no perfil depressivo, redução da atividade exploratória geral e locomotora espontânea nos animais VAcHT KD^{HOM} tratados com a endotoxina LPS. Nossos resultados demonstram pela primeira vez, que a redução da expressão do VAcHT é capaz de alterar o balanço inflamatório frente à invasão de patógenos, culminando com alterações inflamatórias sistêmicas e cerebrais, termorregulatórias, além de déficits comportamentais.

Palavras-chave: inflamação, acetilcolina, comportamento doentio.

ABSTRACT

The production of inflammatory mediators is necessary to protect the body against pathogens and promote tissue repair, but the excessive release of cytokines can lead to systemic inflammation, neuroinflammation and "sickness behavior". The central nervous system dynamically interacts with the immune system to modulate the inflammatory process through humoral and neural pathways. In this context has been discussed the "cholinergic anti-inflammatory" pathway able to inhibiting cytokine production, since signals transmitted through the vagus nerve converge to immune system cells that express the alpha 7 nicotinic cholinergic receptor ($\alpha 7$ nAChR), preventing the release of pro-inflammatory mediators. Prado *et al* developed an animal model of central and peripheral cholinergic hypofunction, where the gene of vesicular acetylcholine transporter (VACHT) has his expression decreased in 45% of the protein VACHT. In this context, cholinergic balance adjustment appears to be closely involved with the generation and progression of the inflammatory process. Thus, changes in cholinergic tone could increase susceptibility to inflammatory lesions, both systemic and in the central nervous system. Thus, this study aimed to characterize the systemic and cerebral inflammatory process, neuronal activity in brainstem and its implications in the generation of "sickness behavior" after administration of LPS in homozygous mice deficient for VACHT (VACHT KD^{HOM}). For this purpose, male mice were divided into groups: saline (SAL WT or VACHT KD^{HOM} SAL) or animals treated with lipopolysaccharide (LPS) (LPS WT or VACHT KD^{HOM} LPS), as well as animals that received administration of acetylcholinesterase inhibitor (ACEI) (WT LPS ACEI or VACHT KD^{HOM} LPS ACEI) or nicotine agonist (NIC) (WT LPS NIC or LPS VACHT KD^{HOM} NIC). Initially, animals were given a lethal dose of LPS i.p (10 mg/kg) to evaluate survival rate. Subsequently, we administered sublethal dose of LPS (0.1 mg/kg) in order to adequately control the parameters to be evaluated, inflammatory markers and sickness behavior. To assess the reversal of the phenotype, animals were prior administered with pyridostigmine (3 mg/kg) or nicotine (0.4 mg/kg). Animals were sacrificed 1 or 3 h after administration of sublethal dose of LPS i.p. The results showed a lower survival of animals VACHT KD^{HOM} after administration of a lethal dose of LPS. In addition, systemic inflammation showed an increase in splenic proinflammatory (TNF, IL-1 β , IL-6) and anti-inflammatory (IL-10) status in the VACHT KD^{HOM} LPS. Concomitantly, was observed an increased activity of splenic macrophages, as well as an increased recruitment of lymphoid follicles in the same organ, indicating that the cholinergic deficit was able to alter the inflammatory balance. The serum profile was altered in VACHT KD^{HOM} LPS group, where mediators TNF and IL-6 were elevated, however without changing blood and peritoneal leukocytes levels. The reversal of phenotype by ACEI showed to be effective only in reducing the TNF levels of serum and spleen. However, the nicotinic agonist reduced almost totally the inflammatory mediators in serum and spleen. Interestingly, it was demonstrated an increased neuronal activity through c-Fos gene in the nuclei of the dorsal vagal complex in animals VACHT KD^{HOM} LPS (Postrema Area – PA, Nucleus of the Solitary Tract - NST, and Dorsal Motor Nucleus - DMN), responsible for modulating afferent sensory and motor efferent vagal cholinergic anti-inflammatory pathway. An increased vagal activity in those nuclei would be the a gateway to the modulation of neuroinflammation found in the present study, where we showed an increased of TNF, IL-1 β , IL-6 and IL-10 levels reversed 100% by nicotinic agonist in mice deficient for the VACHT. Both humoral and neuronal mechanisms are related to the onset of sickness behavior in situations of systemic inflammation and neuroinflammation. Thus, in our study we found that the spectrum of abnormalities could positively influenced the thermoregulatory changes, as well as depressive profile, and reduced exploratory activity and general spontaneous locomotor activity in VACHT KD^{HOM} animals treated with endotoxin LPS. Our results

also demonstrate for the first time evidences that the decreased expression of VAcHT is able to alter the inflammatory balance against the invasion of pathogens, leading to systemic and brain inflammatory changes, thermoregulation, besides behavioral deficits.

Key-words: inflammation, acetylcholine, sickness behaviors.