

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Expressão de Factores Colinérgicos em Monócitos/Macrófagos na Inflamação

Paula Alexandra Gomes de Oliveira

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR HUMANA

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Expressão de Factores Colinérgicos em Monócitos/Macrófagos na Inflamação

Paula Alexandra Gomes de Oliveira

Dissertação de mestrado orientada

pelo Professor Doutor Ângelo Calado

Unidade de Biologia Microvascular e Inflamação
Instituto de Medicina Molecular

e pela Professora Doutora Margarida Telhada

Departamento de Química e Bioquímica
Faculdade de Ciências - Universidade de Lisboa

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR HUMANA

2009

Este trabalho foi realizado na Unidade de Biologia Microvascular e Inflamação do Instituto de Medicina Molecular

RESUMO

A inflamação reconhece e elimina agentes patogénicos invasores, promovendo a cicatrização dos tecidos e o restabelecimento da homeostasia. Para tal, a resposta inflamatória envolve mecanismos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios que a controlam e regulam. Neste contexto, a acetilcolina (ACh) assume uma função reguladora na via colinérgica anti-inflamatória. Nesta a ACh libertada actua em receptores específicos expressos por células imunes, como monócitos e macrófagos inibindo a síntese e libertação de citocinas pró-inflamatórias. A concentração e actividade de ACh podem ser reguladas por factores intervenientes na sua síntese, degradação e ligação a receptores. Assim, este trabalho centra-se no estudo da expressão molecular desses factores em monócitos/macrófagos humanos na resposta inflamatória mediada pelo lipopolissacarídeo (LPS). De entre os receptores nicotínicos, estudou-se o nAChR $\alpha 7$ não se observando alterações de expressão significativas. Em relação aos factores colinérgicos envolvidos na síntese de ACh, verificou-se que macrófagos, ao contrário de monócitos, expressam *CHAT* e *CHTI*. No entanto e por acção do LPS, observou-se um silenciamento da expressão destes genes em macrófagos. Estes dados sugerem que macrófagos possam inicialmente ter a capacidade de sintetizar ACh a qual poderá ser eliminada/diminuída durante a resposta inflamatória. Contudo nestes dois tipos celulares, verificou-se a expressão de *CTLI* e *CRAT*, que poderão constituir vias alternativas para síntese de ACh. Para o gene *ACHE* observou-se um aumento de transcrito por acção do LPS em monócitos e macrófagos. A nível proteico verificou-se uma expressão diferencial deste factor nestes tipos celulares por acção do estímulo inflamatório. Estes resultados sugerem a existência de diferentes mecanismos que especificamente regulam a expressão da AChE em monócitos e macrófagos. Neste estudo, demonstrou-se a variação da expressão de factores colinérgicos específicos na resposta inflamatória em monócitos e macrófagos humanos. Estudos futuros possibilitarão uma melhor compreensão da acção desses factores na inflamação assim como a investigação dos mecanismos subjacentes.

Palavras-Chaves

Inflamação * Sistema Colinérgico Não-neuronal * Acetilcolina

Monócitos * Macrófagos

ABSTRACT

Inflammation recognizes and eliminates invading pathogenic agents, promoting tissue healing and homeostasis recovery. The inflammatory response is balanced by pro-inflammatory and anti-inflammatory mechanisms. In this context, acetylcholine (ACh) assumes a regulatory function in the anti-inflammatory cholinergic pathway. By binding to specific receptors expressed in immune cells, such as monocytes and macrophages, released ACh inhibits the synthesis and release of pro-inflammatory cytokines. The concentration and activity of ACh may be regulated by factors that participate in its synthesis, degradation, and receptor binding. Therefore, this work was focused in the study of molecular expression of these factors in the inflammatory response of human monocytes/macrophages triggered by LPS stimulation. Among the nicotinic receptors, the nAChR α 7 was studied and no significant changes were found in its expression. Concerning the cholinergic factors involved in ACh synthesis, it was verified that macrophages, unlike monocytes, express *CHAT* and *CHT1*. However expression of these genes was silenced in macrophages by LPS stimulation. These data suggest that macrophages may normally have the ability to synthesize ACh, and this ability may be lost/diminished during the course of inflammation. However these two cell types, express *CTLI* and *CRAT*, which may constitute an alternative for the synthesis of ACh. In relation to AChE, an increase at the transcript level was found in monocytes and macrophages upon LPS stimulation. At the protein level, a differential expression of this factor in these different cellular types was observed by the action of the inflammatory stimulus. These results suggest the existence of different mechanisms that may specifically regulate the expression of AChE in monocytes and macrophages. In this study, the variation of specific cholinergic factors was demonstrated in the inflammatory response of human monocytes and macrophages. Futures studies will make possible a better understanding of the action of these factors over the inflammation process and also in the underlying mechanisms.

Keywords

Inflammation * Non-neuronal Cholinergic System * Acetylcholine

Monocytes * Macrophages

AGRADECIMENTOS

Depois de finalizado este trabalho agradeço a todos que o tornaram possível...

À Professora Carlota Saldanha por me ter aceite no seu grupo de trabalho;

Ao Professor Ângelo Calado pelo empenho na realização deste trabalho, pela dedicação com que me orientou e pelo apoio de última hora;

À professora Margarida Telhada por ter aceite ser minha orientadora interna;

A todos os UBIMIs pela boa disposição e pela forma como sempre me trataram e ajudaram. Um obrigado especial à Vanda e à Sofia pelas incansáveis aulas de citometria de fluxo.

Ao Daniel e à Zita, pela amizade e companheirismo e que apesar do pouco tempo disponível ao longo deste último ano, arranjam sempre uns minutinhos para um cafezinho de libertação de stresses ;)

Aos meus padrinhos, Bão e Lena, por estarem sempre presentes em todos os momentos importantes da minha vida e por lembrarem aqui à caminheira que não há caminho, o caminho faz-se a andar...já dizia o profeta!

À Xana que não sendo só “a prima” é a amiga. Depois de ultrapassadas as “guerras” de infância aqui estamos, *always friends*.

À pequena Patita pela alegria que trás dentro de si e que nos contagia a todos.

À avó Bá pela forma como me educou transmitindo sempre uma força de vontade invejável, pelos miminhos que ainda hoje faz questão de dar e principalmente pela fonte de coragem que tem revelado nestes últimos anos.

Aos meus pais, Hortense e Ivo, que sempre tornaram tudo possível, muitas vezes lembrando que os “quases” são “nuncas” e que uma instrução difícil leva a uma batalha fácil. Obrigada pelo amor, carinho e apoio incondicional ao longo de tantas e tantas caminhadas.

The last but not the least, ao meu namorado Ricardo, pela boa disposição com que acorda todas as manhãs, por me ter acompanhado em mais uma jornada, com tanto amor e carinho e principalmente pela paciência que tem nos meus *dark sides*. @ @ @ - @ @

Muito Obrigada!!

ABREVIATURAS

ACh - Acetilcolina

AChE - Enzima acetilcolinesterase

ACHE - Gene que codifica para a enzima acetilcolinesterase

ACTB - Gene que codifica para a proteína β -actina

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

ChAT - Enzima colina acetiltransferase

CHAT - Gene que codifica para a enzima colina acetiltransferase

CHRNA7 - Gene que codifica para o receptor nicotínico alfa 7

CHT - Transportador de colina de alta afinidade

CHT1 - Gene que codifica para a proteína transportadora de colina de alta afinidade

CRAT - Gene que codifica para a proteína carnitina acetiltransferase

CTL - Gene que codifica para a (proteína semelhante ao transportador de colina)1

dNTP - Trifosfato de desoxinucleótido

DTT - Ditioneitol

EDTA - Ácido etilendiamino tetra-acético

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

FBS - Soro bovino fetal

GAPDH - Gene que codifica para a proteína Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HRP - *Horseradish Peroxidase*

ICAM-1 - *Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*

IL - Interleucinas

JAK2-STAT3 - *Janus kinase 2-Signal Transducers and Activators of Transcription protein 3*

LPS - Lipopolissacarídeo

Mac-1 - *Macrophage 1 antigen*

mAChR - Receptores muscarínicos

MCSF - *Macrophage-Colony Stimulating Factor*

mRNA - RNA mensageiro

nAChR - Receptores nicotínicos

nAChR $\alpha 7$ - Receptor nicotínico $\alpha 7$

NF- κ B - *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos

pb - Pares de bases

PBS - Tampão fosfato salino

PBS-T - PBS 1x + Tween 20 0,1%

PRRs - Receptores de reconhecimento de patógeno

RNA - Ácido ribonucleico

RT-PCR - *Reverse transcription polymerase chain reaction*

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - *SDS-Policrilamide Gel Electrophoresis*

TBE - Tris-borato EDTA

TNF - Fator de necrose tumoral

TNFA - Gene que codifica para a proteína TNF- α

VACHT - Transportador vesicular de ACh

VCAM-1 - *Vascular cell adhesion molecule-1*

VLA-4 - *Integrin alpha4beta1 (Very Late Antigen-4)*

Índice

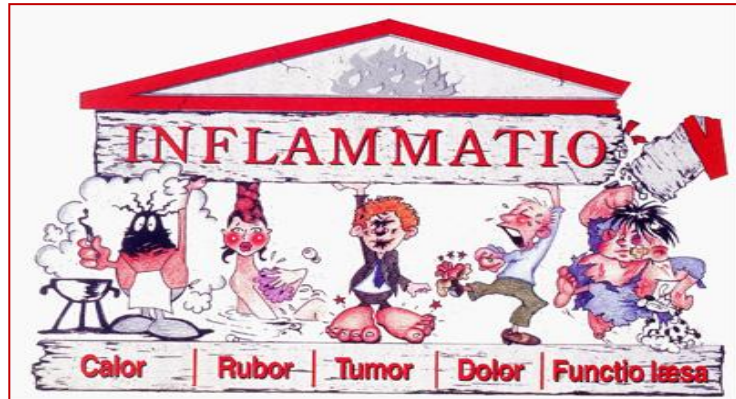
1 - Introdução	1
1.1 - Inflamação.....	1
1.2 - Sistema colinérgico neuronal	3
1.3 - Sistemas colinérgicos não neuronal.....	4
1.4 - Via colinérgica anti-inflamatória.....	5
2 - Objectivos	6
3 - Materiais e Métodos	6
3.1 - Isolamento de monócitos	6
3.2 - Cultura de células	6
3.2.1 - Cultura de linhas celulares humanas de leucemia aguda monocítica (THP-1)6	
3.2.2 - Cultura de monócitos	7
3.3 - Estudo da expressão de componentes colinérgicos, em monócitos, após estimulação colinérgica com agonistas nicotínicos	7
3.4 - Diferenciação e cultura de macrófagos.....	8
3.5 - Análise de expressão por RT-PCR (<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)	8
3.6 - Determinação quantitativa da concentração de TNF- α pela técnica de ELISA (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>) (<i>Quantikine Human TNF-α/TNFSF1A Immunoassay - R&D Systems</i>).....	9
3.7 - Análise por citometria de fluxo	10
3.8 - Análise proteica por <i>Western Blotting</i>	10
3.8.1 - Preparação da amostra	10
3.8.2 - Electroforese por SDS-PAGE (<i>Sodium dodecyl Sulfate Poliacrilamide Gel Electrophoresis</i>) e <i>Western Blotting</i>	10
4 - Resultados.....	12
4.1 - Estudo da expressão de componentes colinérgicos em células THP-1 na resposta inflamatória	12
4.1.1 - Determinação da concentração de TNF- α	12
4.1.2 - Estudo da expressão molecular dos componentes colinérgicos a nível de mRNA	13
4.1.3 - Estudo da expressão proteica da AChE	14
4.2 - Estudo da expressão de componentes colinérgicos em monócitos na resposta inflamatória	15
4.2.1 - Análise por citometria de fluxo	15
4.2.2 - Determinação da concentração de TNF- α	17

4.2.3 - Estudo da expressão molecular dos componentes colinérgicos a nível de mRNA	17
4.2.4 - Estudo da expressão proteica da AChE	19
4.2.5 - Estudo da expressão molecular de componentes colinérgicos após estimulação com agonistas nicotínicos	19
4.3 - Estudo da expressão de componentes colinérgicos em macrófagos na resposta inflamatória	20
4.3.1 - Determinação da concentração de TNF- α	21
4.3.2 - Estudo da expressão molecular dos componentes colinérgicos a nível de mRNA	21
4.3.3 - Estudo da expressão proteica da AChE	23
5 - Discussão.....	24
6 – Conclusão e Perspectivas Futuras	27
7 - Bibliografia	28
Anexo I.....	A1
Anexo II	A2
Anexo III.....	A3

1 - Introdução

1.1 - Inflamação

A inflamação é uma resposta localizada e altamente regulada que o organismo dispõe para localizar, neutralizar e eliminar um agente agressor, assim como reparar os danos causados e promover a cicatrização.^[1,2] A resposta inflamatória consiste numa complexa série de reacções caracterizadas por cinco sinais clínicos: calor, rubor, tumor, dor e perda de função (Figura 1.1).^[3]



A detecção de um agente patogénico está associada a padrões moleculares associados a patogénios (PAMPs). Estes são moléculas associadas a grupos de agentes patogénicos que uma vez reconhecidos por células do sistema imune inato activam uma resposta inflamatória. Estes são reconhecidos por receptores de reconhecimento de patogénios (PRRs) que incluem por exemplo os receptores TLR (*Toll-Like receptors*).^[4,5] O lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias é considerado um exemplo típico de PAMP, constituído por um domínio hidrofóbico, o lípido A (ou endotoxina), um *core* de oligossacarídeos e um polissacarídeo (ou antigénio O) ligados por uma ligação covalente. O lípido A é um glicofosfolípido cuja função consiste na participação dos mecanismos de patogenicidade da célula bacteriana. Esta molécula constitui o principal componente encontrado na membrana externa das bactérias Gram-negativas e que contribui em grande parte para a sua integridade estrutural. Como PAMP este liga-se ao complexo de receptores CD14/TLR4/MD2 activando a via de sinalização do TLR4 que por sua vez estimula através da activação da via do NF- κ B, a expressão de citocinas pró-inflamatórias em muitos tipos de células, especialmente em macrófagos.^[5,6,7] Assim, desencadeia-se uma resposta inflamatória que é regra geral caracterizada pela expressão de mediadores pró-inflamatórios como citocinas ou interleucinas (IL), como o factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), ou a IL-1 β , moléculas de adesão, mediadores vasoactivos, espécies reactivas de oxigénio, entre outros.^[2] Estes mediadores pró-inflamatórios promovem a vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular, o aumento de aderência das células endoteliais e a migração de leucócitos do sangue para os tecidos.^[3]

A entrada dos leucócitos para o sítio de inflamação é em grande parte modulada pela duração da resposta inflamatória, pelo tipo de estímulo inflamatório e pelas condições do fluxo sanguíneo. Este processo migratório envolve tanto a activação do endotélio como dos leucócitos circulantes e decorre em vários passos: a aproximação, rolamento e adesão dos leucócitos ao endotélio, a transmigração através do endotélio e a migração nos tecidos intersticiais (Figura 1.2).^[9] Tais processos são determinados em grande parte pela interacção de moléculas de adesão complementares no leucócito e na superfície endotelial. Os receptores de adesão envolvidos pertencem a três famílias: as selectinas (selectina- E, P e L), as integrinas (Mac-1 e VLA-4) e as imunoglobulinas (ICAM-1 e VCAM-1).^[10]

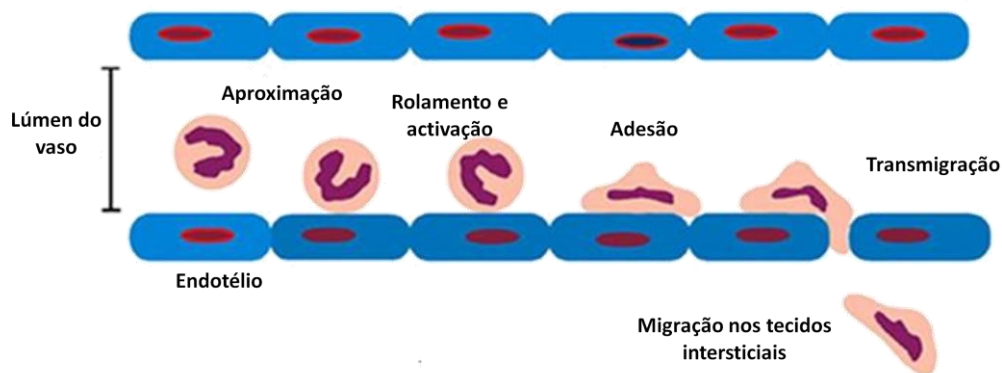


Figura 1.2 - Processo migratório dos leucócitos na inflamação.

No processo inflamatório agudo diferentes leucócitos migram para os tecidos a diferentes tempos da resposta inflamatória. Regra geral, os neutrófilos são os primeiros leucócitos a migrar para o local da infecção permanecendo aí durante 6 a 24 horas. A sua função centra-se na destruição e eliminação de agentes patogénicos. Por fim, e como resultado do seu processo de activação, entram em apoptose e promovem subsequentemente a entrada de monócitos que aí se diferenciam em macrófagos. Por fagocitose, estes podem inicialmente contribuir para a eliminação e erradicação dos agentes patogénicos e posteriormente promover a eliminação de células apoptóticas, e assim contribuir para a resolução do processo inflamatório.^[10,11]

No entanto, o restabelecimento da homeostasia nem sempre ocorre. Uma resposta inflamatória insuficiente pode resultar no aumento de susceptibilidade para infecções e cancro. Por outro lado, uma resposta excessiva está associada a doenças inflamatórias crónicas e autoimunes como a diabetes, entre outras. Quando o controlo da resposta imune é perdido, os mediadores pró-inflamatórios podem-se apresentar em quantidades excessivas em circulação resultando numa inflamação sistémica que pode progredir para choque, falha de

órgãos e morte.^[2,12] Por exemplo, a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias pode ser mais danoso para o organismo que a infecção inicial, tornando-se extremamente importante o controlo da resposta inflamatória.^[2] Esse controlo é normalmente feito por mecanismos anti-inflamatórios, utilizando mediadores como os glucocorticoides e as citocinas anti-inflamatórias (IL-10, IL-4, TGF- β), que restringem a produção de mediadores pró-inflamatórios e a acção de células inflamatórias.^[13] Recentemente, foi descoberta uma nova via de controlo da síntese de citocinas pró-inflamatórias regulada pelo sistema nervoso autónomo, a via colinérgica anti-inflamatória que irei abordar posteriormente.^[14,15]

1.2 - Sistema colinérgico neuronal

O sistema colinérgico foi inicialmente identificado a nível do sistema nervoso onde medeia a propagação do impulso nervoso em sinapses neuronais e neuro-musculares, através da acção do conhecido neurotransmissor, acetilcolina (ACh) (Figura 1.3).^[16,17]

No neurónio pré-sináptico, a enzima colina acetiltransferase (ChAT-*choline acetyltransferase*) catalisa a síntese de ACh a partir de colina e acetil-coenzima A.^[18] Para tal, a colina é transportada do meio extracelular para dentro da célula pelo transportador de colina (CHT-*high affinity choline transporter*) para o qual tem grande afinidade.^[17] A ACh sintetizada é então armazenada

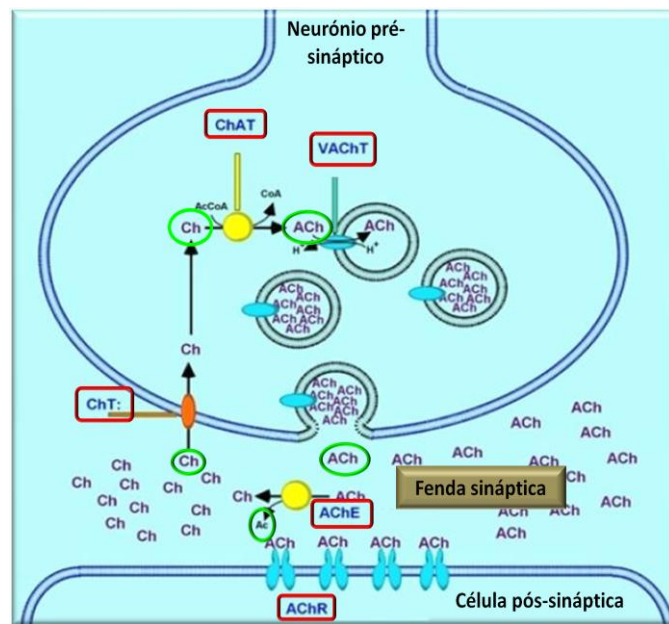


Figura 1.3 - Sistema colinérgico neuronal.

em vesículas sinápticas através da actividade do transportador vesicular de ACh (VAcHT-*vesicular acetylcholine transporter*).^[19] Durante a propagação do impulso nervoso, potenciais de acção libertam a ACh para a fenda sináptica, permitindo que esta se possa ligar a receptores específicos expressos na membrana plasmática da célula pós-sináptica. Estes receptores podem ser de dois tipos: nicotínicos e muscarínicos. Os receptores nicotínicos (nAChR) são canais iónicos activados por ligandos formando estruturas homo e heteropentaméricas a partir de subunidades α , β , γ , δ e/ou ϵ . Existem pelo menos 10 subunidades α e 4 subunidades β , sendo que a combinação de diferentes subunidades confere

ao receptor diferentes propriedades. Os receptores muscarínicos (mAChR) são receptores associados a proteínas G sendo conhecidos cinco tipos: M1 a M5.^[14,18,20,21] Apesar de ambos os tipos de receptores estarem distribuídos no sistema nervoso central e periférico, eles têm diferentes localizações sinápticas e exibem variadas funções na transmissão colinérgica.^[1] Por fim, a enzima acetilcolinesterase (AChE-*cholinesterase*) é responsável pela hidrólise da ACh, originando colina e acetato, regulando a concentração do transmissor na sinapse e modulando assim a transmissão do impulso nervoso.^[18]

1.3 - Sistemas colinérgicos não neuronal

Diversos estudos demonstraram a expressão de ACh também em células não neuronais, desenvolvendo-se assim o conceito de sistema colinérgico não neuronal. Vários dos componentes colinérgicos têm sido identificados em vários tipos celulares como em células epiteliais, endoteliais e mesoteliais e vários tipos de leucócitos.^[22] Estudos demonstraram a expressão de ChAT em macrófagos alveolares, monócitos humanos e de ratinho, linfócitos e granulócitos.^[23] Os receptores muscarínicos e nicotínicos são também expressos por vários tecidos não neuronais. Por exemplo o receptor nAChR α 7 é expresso em vários tipos de macrófagos (humanos e de ratinho) e linfócitos, assim como em células epiteliais do intestino, da pele e das vias respiratórias humanas.^[21,24] A enzima AChE também tem sido identificada em células epiteliais e endoteliais humanas, em células do sangue nomeadamente em eritrócitos e monócitos de ratinho.^[21,25,26] Também o transportador ChT1 está presente em células não neuronais tais como células endoteliais e epiteliais humanas e de murino, assim como células do sistema imune como é o caso de linfócitos, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos.^[24,27]

Os sistemas colinérgicos neuronal e não neuronal, diferem no processo de síntese, armazenamento e libertação de ACh. Como descrito anteriormente, no sistema colinérgico neuronal a ACh é sintetizada no nervo terminal, armazenada em vesículas e libertada em grandes quantidades para permitir uma rápida e efectiva neurotransmissão. Num sistema colinérgico não-neuronal, a ACh pode ser sintetizada por toda a célula e libertada directamente depois da sua síntese, não existindo compartimentos de armazenamento. Neste caso, a sua eliminação é mais lenta devido à baixa actividade da AChE em células não neuronais.^[21]

Em sistemas colinérgicos não neuronais, a ACh pode assumir funções celulares diversas. Por exemplo em sistemas vasculares, actua como vasodilatador e está envolvida na

angiogénese.^[28,29] Pode igualmente desempenhar funções importantes em vários processos celulares, como na proliferação, diferenciação, organização do citosqueleto, secreção, locomoção, entre outros.^[30] Mais recentemente foi também atribuído à ACh um papel fundamental na regulação da inflamação através da via colinérgica anti-inflamatória.^[15]

1.4 - Via colinérgica anti-inflamatória

A via colinérgica anti-inflamatória representa um mecanismo de resposta do sistema nervoso central à presença de estímulos inflamatórios em circulação sendo mediada pela acção do nervo vago.^[16] O nervo vago é o maior constituinte da parte parassimpática do sistema nervoso autónomo.^[15] Este nervo surge no tronco cerebral e percorre o pescoço, tórax e abdómen dirigindo-se para os órgãos viscerais. Contém fibras que possuem componentes sensoriais (aférentes) e motores (eferentes) que controlam as funções destes órgãos.^[13,31] Evidências experimentais demonstraram que a activação do nervo vago eferente diminui os níveis de TNF- α sistémico e de outras citocinas pró-inflamatórias, inibindo assim a resposta inflamatória.^[1,32] Estes factos revelaram que para além das suas funções clássicas de regulação do batimento cardíaco e gastrointestinal, o nervo vago também é um regulador da resposta inflamatória.^[1]

Produtos inflamatórios como a IL-1 β ou o LPS activam as fibras aférentes do nervo vago, as quais servem de sensor para a inflamação.^[14,21] Esta informação é transmitida ao sistema nervoso central o qual estimula o nervo vago eferente para a produção de ACh.^[21] Esta induz então a inibição da síntese e libertação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e outras células produtoras de citocinas. Este processo é mediado pela activação do receptor nAChR $\alpha 7$ expresso na membrana plasmática destas células do sistema imune.^[33] Estudos mostraram que este receptor é crucial para os efeitos anti-inflamatórios do nervo vago, pois a estimulação deste nervo torna-se ineficiente na supressão dos níveis de TNF- α em ratinhos *knockout* para o gene codificante para o receptor, ao contrário do que acontece com ratinhos controlo.^[1]

A activação do receptor nAChR $\alpha 7$ durante um estímulo inflamatório pode inibir a via de sinalização do NF- κ B por inibição da sua translocação para o núcleo. Este factor de transcrição é fundamental para a expressão de TNF- α e de outras citocinas pró-inflamatórias.^[15,31] Por outro lado, a activação do receptor nAChR $\alpha 7$ pode estimular a via de sinalização anti-inflamatória JAK2-STAT3, contribuindo também assim para a diminuição e libertação de citocinas pró-inflamatórias.^[13,31,34] Assim, a via colinérgica anti-inflamatória

representa um mecanismo fisiológico pelo qual o sistema nervoso interaccua com o sistema imune inato para controlar a resposta inflamatória.^[15]

Desta forma, a actividade funcional da via colinérgica anti-inflamatória poderá ser modulada através da acção de componentes colinérgicos neuronais a nível do nervo vago eferente e não neuronais expressos pelas células produtoras de citocinas.^[15] Assim, neste trabalho pretendeu-se estudar a expressão molecular dos componentes colinérgicos de monócitos/macrófagos na resposta inflamatória e anti-inflamatória de forma a determinar se estes componentes podem desempenhar um papel importante na inflamação.

2 - Objectivos

Os objectivos deste trabalho foram:

- Caracterizar a expressão molecular de vários componentes colinérgicos em culturas de THP-1, monócitos e macrófagos, e analisar as variações de expressão obtidas por estimulação colinérgica destes tipos celulares.
- Estudar a expressão molecular de componentes colinérgicos em células THP-1, monócitos e macrófagos na resposta inflamatória induzida por acção de LPS de *E.coli* e na resposta anti-inflamatória mediada por estímulos colinérgicos.

3 - Materiais e Métodos

3.1 - Isolamento de monócitos

O isolamento foi efectuado a partir de *buffy-coats* de dadores saudáveis, fornecidos pelo Instituto Português do Sangue, ao abrigo de um protocolo estabelecido entre este e a Unidade de Biologia Microvascular e Inflamação do Instituto de Medicina Molecular. O isolamento de monócitos decorreu em duas etapas. Na primeira foram isolados leucócitos mononucleados a partir de *buffy-coats* por gradiente de *Ficoll-Paque* (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Estes foram posteriormente utilizados para o isolamento de monócitos por separação magnética. O protocolo detalhado está apresentado no Anexo I.

3.2 - Cultura de células

3.2.1 - Cultura de linhas celulares humanas de leucemia aguda monocítica (THP-1)

As células THP1 foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), 1x Penicilina/Streptomicina, 1x Piruvato de sódio, 1x Hepes 1M pH 8, 1x

aminoácidos não essenciais e 50 μ M de β - mercaptoetanol, e incubadas a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂. Todos os suplementos usados assim como o meio de cultura foram provenientes da Invitrogen.

Tendo as células em cultura, foi adicionado o estímulo inflamatório LPS de *E.coli* serotipo 055:B5 (Sigma) para uma concentração final de 1 μ g/mL, efectuando-se paralelamente culturas controlo às quais se adicionou igual volume de PBS 1x pH 7,4. Ambas foram reincubadas nas condições anteriores, fazendo-se recolhas das células a diferentes tempos de incubação durante as 24h seguintes. As células recolhidas foram usadas para isolamento de RNA total e para análise proteica. Os sobrenadantes das culturas foram utilizados para medição da concentração de TNF- α .

3.2.2 - Cultura de monócitos

Para o estudo da resposta inflamatória em monócitos, foi utilizada uma densidade de 1,0x10⁶ células/mL cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de FBS e 1x Penicilina/Streptomicina. Posteriormente foi adicionado o estímulo inflamatório LPS para uma concentração final de 1 μ g/mL e culturas controlo foram efectuadas, como se referiu anteriormente. Ambas foram incubadas a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂ e foram efectuadas recolhas de células a diferentes tempos de incubação durante as 24h seguintes. As células recolhidas foram usadas para isolamento de RNA total e para análise proteica. Os sobrenadantes das culturas foram utilizados para medição da concentração de TNF- α .

3.3 - Estudo da expressão de componentes colinérgicos, em monócitos, após estimulação colinérgica com agonistas nicotínicos

Para o estudo da resposta anti-inflamatória mediada por estimulação com agonistas nicotínicos foram cultivados monócitos numa densidade de 1,0x10⁶ células/mL, em meio RPMI suplementado com 10% de FBS, 1x Penicilina/Streptomicina. Foi utilizada nicotina (Sigma), como agonista nicotínico, numa concentração final de 10⁻⁶ M. Efectuaram-se igualmente culturas controlo às quais se adicionou igual volume de PBS 1x pH 7,4. Todas as culturas foram incubadas a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂ durante 2h sendo os seus sobrenadantes recolhidos para medição da concentração de TNF- α . Após 2h, a restante cultura foi subdividida em duas condições experimentais: **1** – adicionou-se o estímulo inflamatório LPS para uma concentração final de 1 μ g/mL e **2** – adicionou-se igual volume de PBS 1x pH 7,4 (culturas controlo). As culturas foram reincubadas nas condições anteriores durante 24h

efectuando-se recolhas dos sobrenadantes a diferentes tempos de incubação, para medição da concentração de TNF- α .

3.4 - Diferenciação e cultura de macrófagos

Para o estudo da diferenciação de monócitos em macrófagos na resposta inflamatória foi utilizada uma densidade de $1,0 \times 10^6$ células/mL. Os monócitos foram cultivados em meio RPMI suplementado com 10% de FBS, 1x Penicilina/Streptomicina e MCSF (*Macrophage-Colony Stimulating Factor* - Sigma) para uma concentração final de 50 ng/mL. As culturas foram incubadas a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂ durante 4 dias. Ao 4º dia de incubação foi readicionado meio de cultura suplementado com MCSF na mesma concentração. Ao 7º dia removeram-se as células não aderentes lavando a cultura de macrófagos com meio de cultura. Efectuaram-se recolhas de células de algumas culturas para isolamento de RNA total e para análise proteica, sendo os seus sobrenadantes recolhidos para medição da concentração de TNF- α . As restantes culturas de macrófagos foram tratadas com o estímulo inflamatório LPS para uma concentração final de 1 μ g/mL. Neste caso também foram efectuadas culturas controlo, às quais se adicionou igual volume de PBS 1x pH 7,4. As culturas foram incubadas a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂ durante 24h, posteriormente as células foram recolhidas para isolamento de RNA total e para análise proteica e os sobrenadantes das culturas utilizados para medição da concentração de TNF- α .

3.5 - Análise de expressão por RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*)

Para este estudo, o RNA total foi isolado pelo reagente Trizol (Invitrogen). Em seguida, 5 μ g de RNA total, de cada amostra foi tratada com TurboDNase (*Turbo DNA-free Kit* – Ambion). Posteriormente foi efectuada a síntese de cDNA para 1 μ g de RNA total (*SuperScript II Reverse Transcriptas* –Invitrogen). Os protocolos detalhados estão apresentados no Anexo II.

A reacção de amplificação foi realizada num volume final de 20 μ l contendo: 2 μ l de cDNA, tampão apropriado numa concentração de 1x, 1,0-2,0 mM MgCl₂ consoante o gene estudado, 0,2 mM de cada dNTP (Fermentas, Life Sciences), 0,5 μ M de cada primer específico, 0,5U de GoTaq polimerase (Promega) ou e apenas para o gene da *ACHE* 0,5U de Imolase (Bioline) e água estéril. Em cada ensaio realizou-se um controlo negativo em que o cDNA foi substituído por água.

A reacção de amplificação para os genes *CTLI*, *CRAT*, *CHT1*, *CHAT*, *CHRNA7*, *TNFA*, *GAPDH* e *ACTB*, consistiu num passo inicial de desnaturação da cadeia de DNA durante 2

minutos a 95°C, seguido de 25-40 ciclos constituídos por uma desnaturação de 45 segundos a 95°C, uma etapa de emparelhamento dos primers a 53-60°C durante 45 segundos e uma etapa de extensão de 45 segundos a 72°C. No final, efectuou-se uma extensão a 72°C durante 10 minutos. Foi utilizado um Termociclador *Biometra TPersonal* (Alfa Gene). Para o gene da *ACHE*, a reacção de amplificação apresentou as seguintes alterações: o passo inicial de desnaturação foi de 8 minutos a 95°C e durante o ciclo de amplificação, a etapa de extensão foi de 1 minuto a 72°C. Os primers utilizados assim como a temperatura de *annealing*, a concentração de MgCl₂, o número de ciclos da reacção de amplificação e os tamanhos dos produtos esperados estão apresentados no Anexo III para cada um dos genes estudados.

Os produtos amplificados foram detectados por electroforese em gel de agarose de 2%, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml), em tampão de corrida TBE 0,5x (0,045 M Tris-borato; 0,01 M EDTA; pH 8). Foi utilizado o marcador de peso molecular *HyperLadder IV* (Bioline). A electroforese ocorreu a 120 volts durante 30-60 minutos de acordo com o tamanho do fragmento. Os géis foram visualizados num transiluminador (UVP) com luz UV e documentados mediante a utilização do sistema *Kodak Edas 290* (Kodak).

3.6 - Determinação quantitativa da concentração de TNF- α pela técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) (*Quantikine Human TNF- α /TNFSF1A Immunoassay - R&D Systems*)

Nesta técnica foi usada uma microplaca de 96 poços já revestidos com um anticorpo monoclonal específico para TNF- α . Foram efectuadas diluições da solução padrão de TNF- α para posterior elaboração da curva padrão. Tanto as diluições padrão como as amostras em estudo foram colocadas nos poços da microplaca e o TNF- α presente em cada uma ligou-se ao anticorpo monoclonal específico para TNF- α . Após incubação de 2 horas à temperatura ambiente foram efectuadas 4 lavagens com o tampão de lavagem apropriado de modo a retirar as substâncias não ligadas. Seguiu-se a adição do conjugado (anticorpo policlonal específico para TNF- α ligado a uma enzima) e após 1 hora de incubação à temperatura ambiente foram efectuadas mais 4 lavagens com tampão de lavagem apropriado de forma a remover o conjugado que não se ligou. Em seguida foi adicionado o substrato e incubou-se a placa 20 minutos, no escuro e à temperatura ambiente. Neste passo ocorre o desenvolvimento de coloração, a qual é proporcional à quantidade de TNF- α ligado no passo inicial. O desenvolvimento de coloração foi parado pela adição da solução stop e a intensidade da cor medida a 450 e 570 nm no aparelho *Infinite M200* (TECAN).

3.7 - Análise por citometria de fluxo

Monócitos numa densidade de $1,0 \times 10^6$ células/mL foram fixados com paraformaldeído 1% durante 15 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se uma centrifugação a 1390 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente e ressuspensão em PBS 1x pH 7,4 para a mesma densidade celular. As células foram marcadas com os seguintes anticorpos: FITC anti-humano CD14 (eBioscience), PERCP-anti-humano CD19 (Biolegend), FITC anti-humano CD66b (Biolegend) e com uma mistura de anticorpos constituída por PE-Cy5 anti-humano CD3 + PE anti-humano CD4 + FITC anti-humano CD8 (Biolegend)), e incubadas 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. As células marcadas foram novamente centrifugadas nas condições anteriores e ressuspensas em PBS 1x pH 7,4. Em seguida foi feita a leitura no *FACSCalibur* através do *software CellQuest* e os dados analisados pelo programa *Flowjo*.

3.8 - Análise proteica por Western Blotting

3.8.1 - Preparação da amostra

Centrifugaram-se $1,5 \times 10^6$ células a 3000 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente e ressuspendeu-se o pellet em 1mL de PBS 1x pH 7,4 repetindo-se a centrifugação. O pellet foi ressuspendido em 120 μ L de tampão de solução 1x (50mM Tris-Cl pH 6,8/ 100mM DTT/ 2% SDS/ 0,1% Azul Bromofenol/ 10% Glicerol/ 5% β -mercaptoetanol) e suplementou-se com MgCl₂ 5mM, solução de inibidores de proteases 1x (*Set V - Calbiochem*) e 24U de benzonase (Sigma). As amostras foram desnaturadas a 99°C durante 10 minutos e foram aplicadas de imediato no gel ou armazenadas a -20°C.

3.8.2 - Electroforese por SDS-PAGE (*Sodium dodecyl Sulfate Policrilamide Gel Electrophoresis*) e Western Blotting

Para a análise da expressão proteica da AChE efectuou-se de início uma electroforese de SDS-PAGE em gel de resolução com 8% de acrilamida e gel de concentração com 5% de acrilamida. Após polimerização e montagem dos géis no suporte colocou-se o tampão de corrida de electroforese (25 mM Tris/192 mM Glicina/0,1% SDS, pH8,3), as amostras e o marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein Sandards - Bio Rad*). A corrida foi efectuada a 25 mA por gel, utilizando o sistema de electroforese *Mini-PROTEAN 3 Cell* (Bio Rad). Para a transferência formaram-se sanduíches com as esponjas, os papéis 3mm, o gel e a membrana de nitrocelulose, todos previamente embebidos em tampão de transferência (25 mM Tris/192 mM Glicina/etanol 20%, pH 8,3). As sanduíches foram colocadas no sistema de transferência (*Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell - Bio Rad*) de modo que a

corrente passasse do gel (pólo negativo) para a membrana (pólo positivo). A transferência efectuou-se a 100 volts durante 60 minutos. Em seguida efectuou-se a coloração com solução de *Ponceau S* (0,5% *Ponceau S* (m/v) em ácido tricloroacético 5% (m/v)) para avaliar a eficiência da transferência e marcação das bandas do marcador. De seguida a membrana foi lavada com PBS 1x pH 7,4 até ser retirada toda a coloração e procedeu-se ao bloqueio da membrana com 5% de leite em tampão PBS 1x pH 7,4 + Tween 20 0,1% (PBS-T) durante 1 hora à temperatura ambiente. Após bloqueio, esta foi incubada com o anticorpo primário N-19 (Santa Cruz), diluído 1/500 em 5% de leite PBS-T, *overnight* a 4°C com agitação. Seguiram-se 3 lavagens de 10 minutos com PBS-T. Posteriormente a membrana foi incubada com o anticorpo secundário *Donkey anti-goat* IgG conjugado com HRP (*Horseradish Peroxidase*) (Santa Cruz), diluído 1/5000 em 5% de leite PBS-T, durante 1h à temperatura ambiente e com agitação. Por fim, a membrana foi novamente lavada como anteriormente em que a ultima lavagem foi efectuada com PBS 1x pH 7,4. A detecção do sinal foi efectuada através de uma reacção de quimioluminescência utilizando o *Kit Super Signal West Pico* (Pierce), seguindo-se o protocolo recomendado. De seguida as chapas de autoradiografia (*Fuji medical x-ray film - Fujifilm*) foram impressionadas durante diferentes tempos sobre a membrana e a sua revelação e fixação feitas no aparelho *Curix 60* (Agfa). Após revelação da proteína da AChE as membranas foram lavadas com PBS 1x pH 7,4 e reutilizadas para análise proteica da β -actina. As alterações relativamente ao protocolo da AChE foram: **1)** - Bloqueio da membrana durante 15 minutos à temperatura ambiente. **2)** - Incubação com o anticorpo primário AC-15 (Sigma), diluído 1/800, durante 30 minutos à temperatura ambiente com agitação. **3)** - Incubação com o anticorpo secundário *Goat anti-mouse* IgG conjugado com HRP (Santa Cruz), diluído 1/5000, durante 30 minutos à temperatura ambiente com agitação. A detecção do sinal foi efectuada como descrita anteriormente para a AChE.

4 - Resultados

De acordo com os objectivos deste estudo procedeu-se à análise da expressão molecular de diferentes factores, na resposta inflamatória induzida pela acção de LPS de *E. coli*. Os genes estudados foram:

- (i) O gene *CHT1* e o *CTLI*, que codificam para proteínas intervenientes no transporte de colina do meio extracelular para o interior da célula, respectivamente CHT e CDw92
- (ii) O gene *CHAT* e o *CRAT* que codificam respectivamente para as proteínas ChAT e CrAT que possibilitam a síntese de ACh
- (iii) O gene *CHRNA7* codificante do receptor nAChR $\alpha 7$ que localizado na membrana plasmática da célula possibilita a ligação da ACh
- (iv) O gene da *ACHE* que codifica para a enzima AChE, responsável pela hidrólise de ACh.

Os modelos celulares utilizados foram, uma linha celular humana de leucemia aguda monocítica, THP-1, culturas primárias de monócitos isolados de *buffy-coat* obtido de sangue periférico humano e também culturas de macrófagos obtidas por diferenciação das culturas primárias de monócitos.

4.1 - Estudo da expressão de componentes colinérgicos em células THP-1 na resposta inflamatória

Neste estudo e como abordagem inicial foram utilizadas linhas celulares humanas de leucemia aguda monocítica, THP-1, dado tratarem-se de células imortalizadas. As culturas de células THP-1 neste estudo foram incubadas na presença ou ausência do estímulo inflamatório LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), realizando-se recolhas a diferentes tempos de incubação até um máximo de durante 24h.

4.1.1 - Determinação da concentração de TNF- α

De forma a controlar a indução da resposta inflamatória em células THP-1 por acção do LPS, determinaram-se as concentrações de TNF- α , citocina pró-inflamatória, em sobrenadantes de culturas de THP-1 (Figura 4.1). Conforme esperado na ausência de LPS as concentrações de TNF- α são baixas. Por estimulação com o LPS, as concentrações de THF- α aumentam consideravelmente mesmo para tempos de incubação curtos como às 4h.

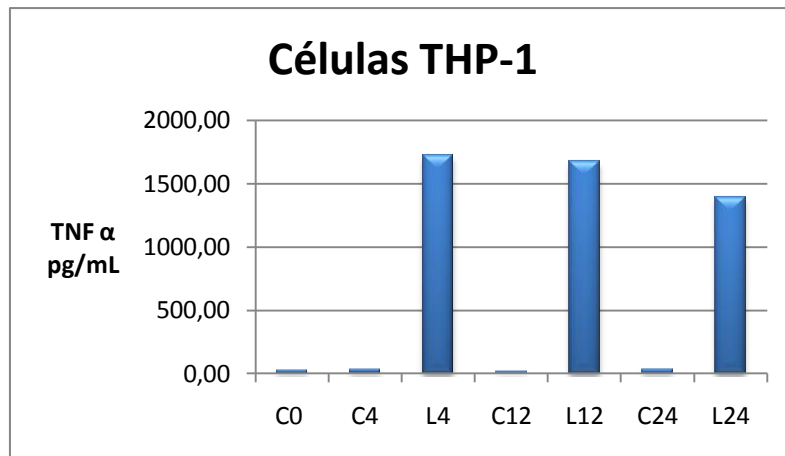


Figura 4.4 – Doseamento de TNF- α em sobrenadantes de culturas de células THP-1 quando tratadas ou não com LPS (1 μ g/mL). Cx – cultura não tratada com LPS e recolhida a x horas de incubação, Lx – cultura tratada com LPS e recolhida a x horas de incubação.

4.1.2 - Estudo da expressão molecular dos componentes colinérgicos a nível de mRNA

Uma vez confirmada a indução da resposta inflamatória procedeu-se ao estudo de expressão molecular dos componentes colinérgicos em células THP-1 incubadas como referido anteriormente (Figura 4.2). Primeiramente foi estudado o gene do *GAPDH* (codificante da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), já que sendo este um gene house-keeping, a sua expressão na célula não deverá variar dentro das condições estudadas, tal como os nossos resultados comprovam. A reacção inflamatória foi controlada pelo estudo do gene do *TNFA* (que codifica para a proteína TNF- α), pois sabe-se que na resposta inflamatória o nível de transcrito de TNF- α aumenta por acção do LPS.^[35] A análise da expressão do *TNFA* nas nossas amostras revela esse aumento de expressão. Para os genes *CTLI*, *CRAT* e *CHRNA7*, apesar de expressos nestas células, não se obtiveram alterações de expressão na presença do estímulo inflamatório relativamente às amostras controlo. Tanto para o gene da *CHAT* como para o do *CHT1* não há expressão quer nas condições inflamatórias quer em situações controlo. Há a salientar neste estudo o aumento substancial de expressão do mRNA da *ACHE* na presença de LPS quando comparado com células incubadas sem LPS.

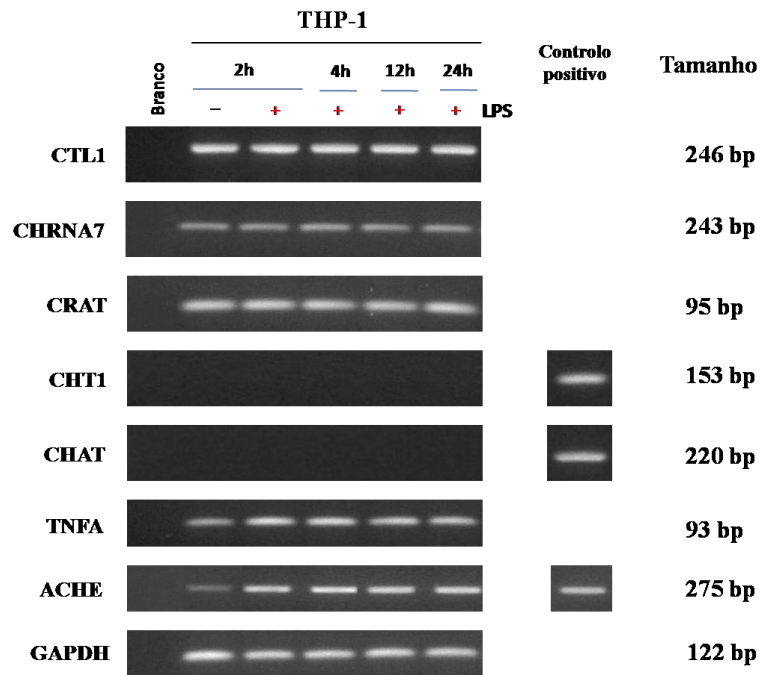


Figura 4.5 - Modulação da expressão de factores colinérgicos pela acção do LPS (1µg/mL) em células THP-1 por RT-PCR. Células HeLa, CEM e K562 foram usadas como controlo positivo da expressão dos genes *CHT1*, *CHAT* e *ACHE*, respectivamente e o branco usado como controlo negativo. O *GAPDH* foi usado como controlo interno.

4.1.3 - Estudo da expressão proteica da AChE

De acordo com os estudos realizados por RT-PCR, que revelaram significativas alterações de expressão para o gene da *ACHE*, tornou-se pertinente uma análise da expressão proteica para este factor colinérgico (Figura 4.3). O anticorpo primário (N-19) usado para a análise proteica permite reconhecer todas as isoformas da AChE conhecidas até ao momento. Assim, pela análise por *Western blotting* observa-se em células THP-1 a existência de duas bandas, correspondentes a duas isoformas da AChE, com pesos moleculares distintos: uma com cerca de 68 kDa correspondente ao produto *full-length* e uma isoforma de menor peso molecular (>50kDa). Na presença de LPS verifica-se um aumento de expressão de ambas as isoformas, sendo esse aumento mais significativo para a isoforma de menor peso molecular. Também é notório na presença de LPS, o aparecimento de uma nova banda de peso molecular intermédio das duas anteriores. Possivelmente essa banda corresponde à expressão de novo de outra isoforma da AChE.

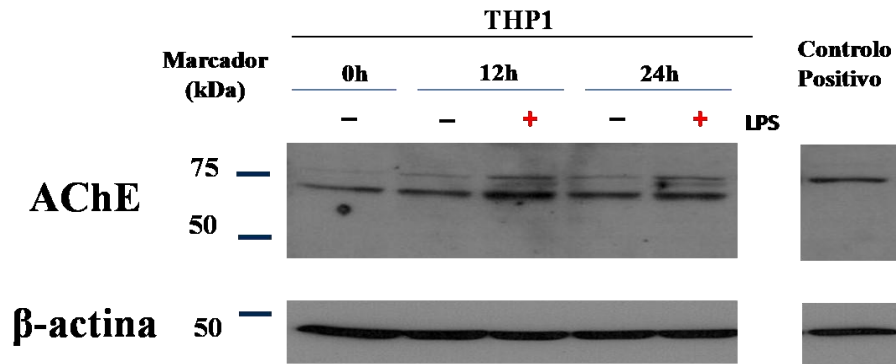


Figura 6.3 - Extractos proteicos de células THP-1 analisados por *Western blotting*. As células K562 foram utilizadas como controlo positivo da expressão proteica do produto *full-length* do gene da *ACHE*. A β -actina foi usada como controlo de carregamento.

4.2 - Estudo da expressão de componentes colinérgicos em monócitos na resposta inflamatória

Após o estudo de uma linhagem imortalizada de células tornou-se importante estudar culturas primárias, nomeadamente monócitos derivados de sangue periférico, de forma a perceber se as variações de expressão obtidas em THP-1 se observam igualmente em culturas primárias de monócitos. As culturas de monócitos neste estudo foram incubadas na presença ou ausência do estímulo inflamatório LPS (1 μ g/mL), realizando-se recolhas a diferentes tempos de incubação até um máximo de durante 24h.

4.2.1 - Análise por citometria de fluxo

Após isolamento, a população de células foi posteriormente caracterizada por citometria de fluxo. Na figura 4.4 estão representados exemplos dos resultados obtidos por citometria de fluxo, onde é possível observar um gráfico de *forward scatter* (FSC-H) vs *side scatter* (SSC-H) para a cultura de monócitos (Figura 4.4a). Na figura é possível observar uma região de células homogéneas em tamanho e complexidade delineadas como região 1 (R1). Neste estudo assumiu-se que a região 1 é composta maioritariamente por monócitos, as restantes células localizadas fora da região 1 são principalmente plaquetas ou detritos celulares. Na Figura 4.4b observa-se a população de células da região 1, anteriormente seleccionada, marcada com o anticorpo CD14 conjugado com FITC sendo este detectado pelo canal FL1-H. A tabela 1 apresenta os resultados de citometria de fluxo para os vários ensaios realizados, onde se pode observar que a pureza dos nossos ensaios variou entre 73-94%. Analisando os diferentes ensaios de monócitos isolados observa-se que todos eles foram positivos para CD14, sendo este um marcador de monócitos. Ao estudar as marcações por CD19, CD66, CD3 e CD8 pretendeu-se despistar contaminações por linfócitos B, granulócitos e Linfócitos T. Desta forma verificou-se que os nossos ensaios não continham contaminações por estes

tipos celulares. Em relação à marcação por CD4, este também pode ser expresso em monócitos. A sua inconstante expressão nos ensaios realizados pode estar relacionada com a heterogeneidade dos dadores de sangue.

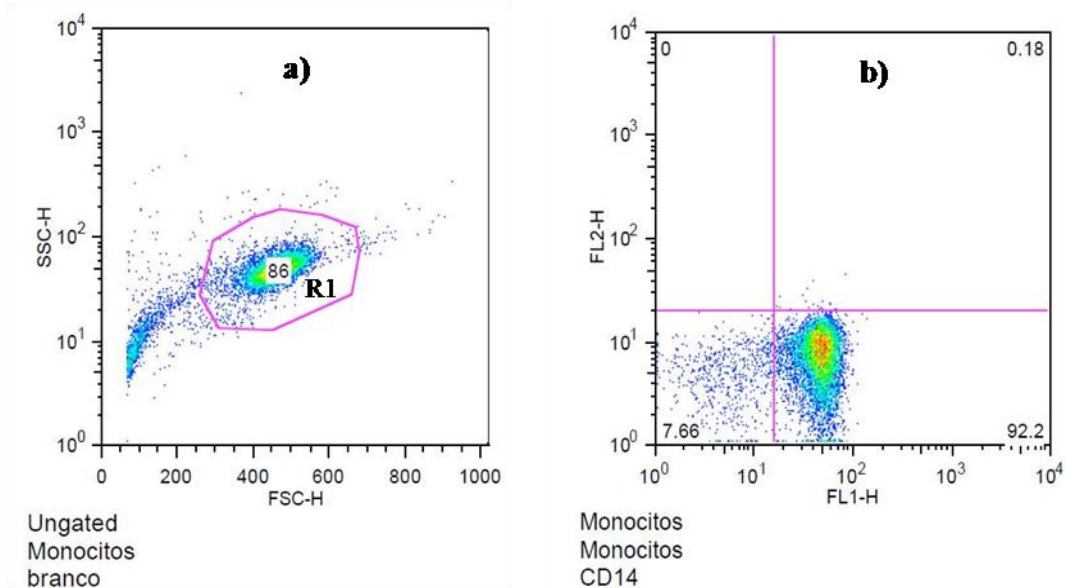


Figura 4.4 – Exemplo representativo de gráficos obtidos por citometria de fluxo após análise pelo programa *Flowjo*. a) gráfico de *forward scatter* (FSC-H) vs *side scatter* (SSC-H) para células após isolamento em que R1 corresponde à região maioritariamente composta por monócitos; b) gráfico de marcação com o anticorpo FITC- anti CD14 humano, visualizado em FL1-H para a população de células seleccionada anteriormente em R1.

Tabela 1 – Resultados obtidos por citometria de fluxo, (ND – Não Determinado).

Ensaio	Marcações						
	Pureza	CD14	CD19	CD66b	CD3	CD4	CD8
#1	87,3%	+	-	-	-	-	-
#2	81,9%	+	-	-	-	+/-	-
#3	86%	+	-	-	-	+/-	-
#4	94,1%	+	-	-	-	+	-
#5	74,6%	+	-	-	-	-	-
#6	72,4%	+	-	-	-	+	-
#7	86,7%	+	-	ND	-	+	-
#8	91,2%	+	-	-	-	+	-

4.2.2 - Determinação da concentração de TNF- α

Tal como em células THP-1 também em monócitos a indução da resposta inflamatória por acção do LPS, foi controlada pela determinação das concentrações de TNF- α em sobrenadantes de culturas de monócitos (Figuras 4.5 a) e b)). De acordo com o esperado, na ausência de LPS, as concentrações de TNF- α permanecem muito baixas. No entanto após estimulação com o LPS, as concentrações de TNF- α aumentam consideravelmente mesmo para tempos de incubação iniciais como à 1h.

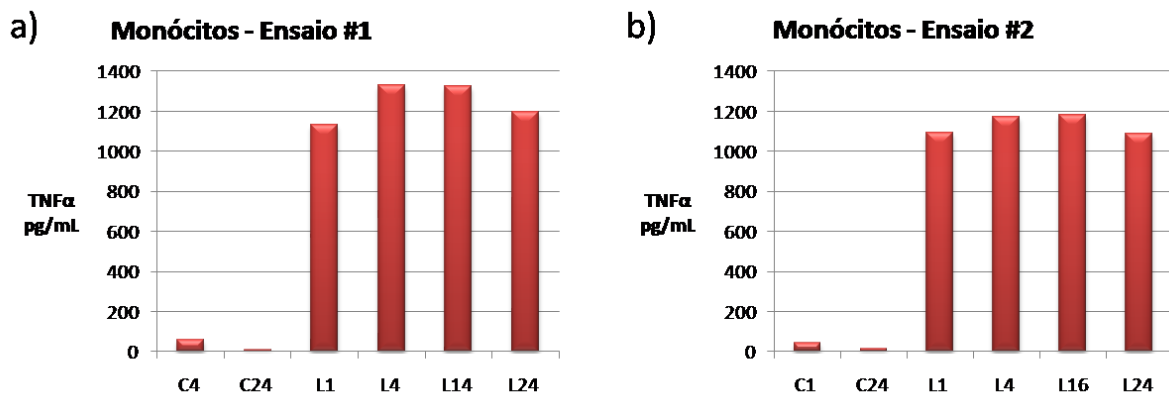


Figura 4.5 a) e b) – Doseamento de TNF- α em sobrenadantes de culturas de monócitos quando tratadas ou não com LPS (1 μ g/mL). Cx – cultura não tratada com LPS e recolhida a x hora de incubação, Lx – cultura tratada com LPS e recolhida a x hora de incubação.

4.2.3 - Estudo da expressão molecular dos componentes colinérgicos a nível de mRNA

Após verificação da indução da resposta inflamatória procedeu-se ao estudo de expressão molecular dos componentes colinérgicos em monócitos do sangue periférico, estimuladas ou não com LPS (Figuras 4.6 e 4.7). Numa primeira fase foi estudada a expressão do gene da *ACTB* (codificante da proteína β -actina), sendo este um gene *house-keeping* a sua expressão na célula não deverá variar dentro das condições estudadas, tal como os nossos resultados comprovam. Tal como no caso das células THP-1, também nos monócitos a reacção inflamatória foi controlada pela análise de expressão do gene do *TNFA*, uma vez que estudos mostram que na resposta inflamatória as concentrações de TNF- α aumentam por acção do LPS.^[35] A análise da expressão do *TNFA* nas nossas amostras revela esse aumento de expressão sendo o pico máximo às 4h de incubação com o estímulo inflamatório.

Em condições normais os monócitos não expressam *CHAT* e *CHT1*, expressando os restantes factores colinérgicos testados. De entre estes, os genes *CRAT* e *CHRNA7* não apresentam variação de expressão por estimulação da resposta inflamatória. Por outro lado observa-se um aumento da quantidade de transcrito de *CTLI* e *ACHE*, por acção do LPS.

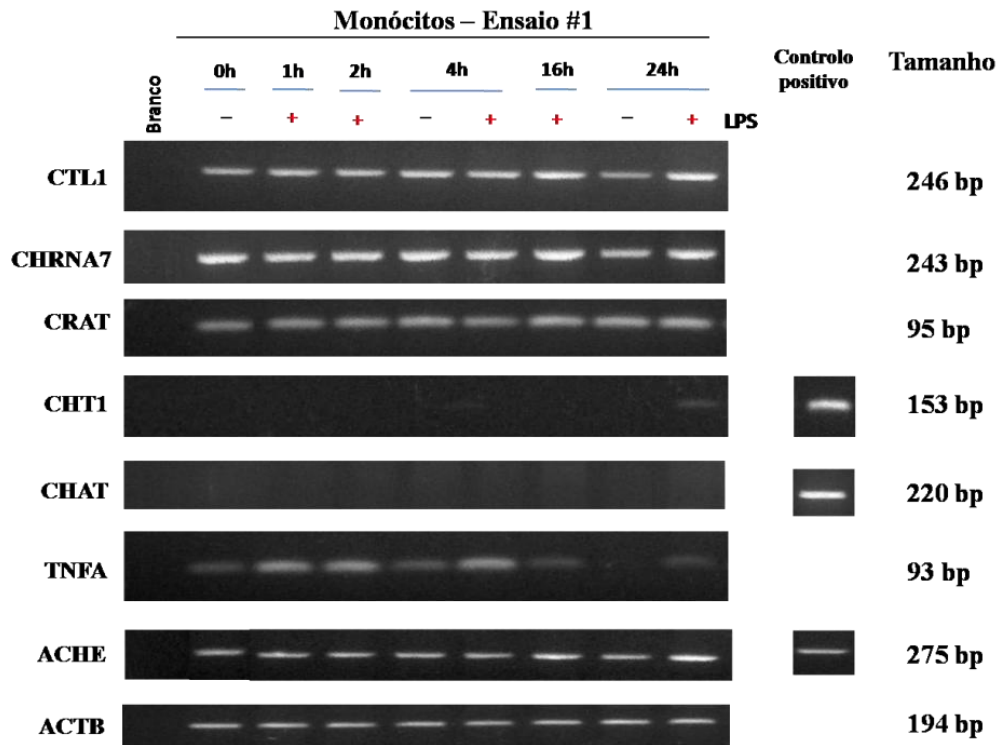


Figura 4.6 - Modulação da expressão de factores colinérgicos por acção do LPS (1µg/mL) em monócitos, observado por RT-PCR. Células HeLa, CEM e K562 usadas como controlo positivo da expressão dos genes *CHT1*, *CHAT* e *ACHE*, respectivamente e o branco usado como controlo negativo. O *ACTB* foi usado como controlo interno.

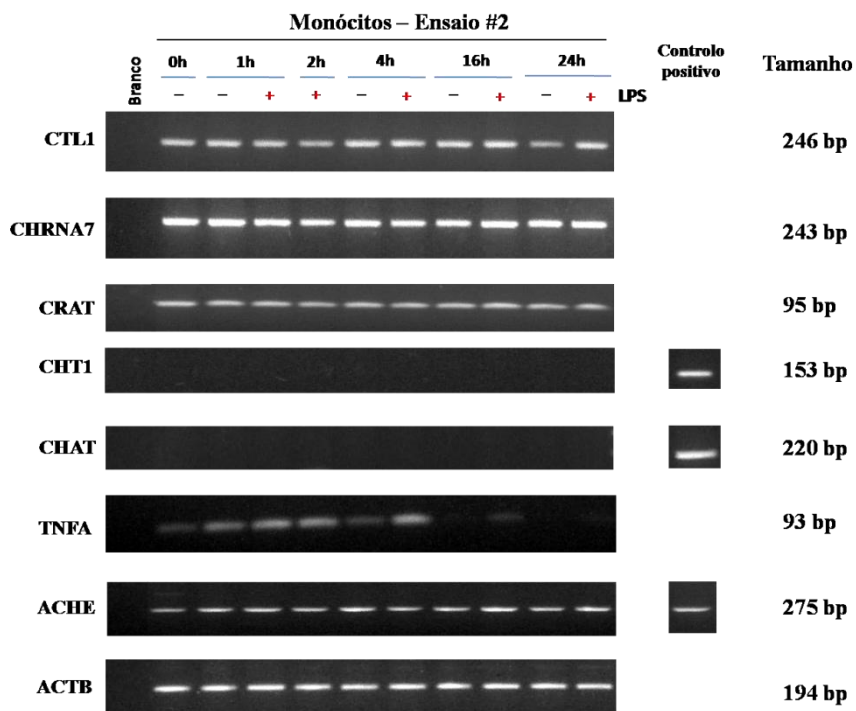


Figura 4.7 - Modulação da expressão de factores colinérgicos por acção do LPS (1µg/mL) em monócitos, observado por RT-PCR. Células HeLa, CEM e K562 usadas como controlo positivo da expressão dos genes *CHT1*, *CHAT* e *ACHE*, respectivamente e o branco usado como controlo negativo. O *ACTB* foi usado como controlo interno.

4.2.4 - Estudo da expressão proteica da AChE

Para duas culturas de monócitos (isolados a partir de *buffy-coats* distintos dos usados em 4.2.2 e 4.2.3) incubadas ou não na presença de LPS foram colhidas células para posterior análise por *Western blotting* (Figura 4.8). Para as duas culturas de monócitos testadas, observam-se padrões diferentes de expressão da proteína AChE. Assim e logo após o seu isolamento, observamos uma única banda com peso molecular aproximadamente de 68kDa que corresponde à proteína *full-length*. Após um dia de cultura uma segunda banda de peso molecular inferior torna-se evidente, correspondendo a uma isoforma da AChE de menor peso molecular. Porém é de salientar que para as diferentes culturas de monócitos observam-se diferentes níveis de expressão desta nova isoforma. De facto e em relação à banda de menor peso molecular observamos uma maior quantidade de proteína no ensaio #2 do que no ensaio #1. Por acção do LPS, verifica-se para as duas culturas um padrão diferencial de expressão. Assim, enquanto para o ensaio #2 observamos um decréscimo significativo da quantidade da nova isoforma da AChE após 24h de cultura face à situação controlo, no ensaio #1 verifica-se um ligeiro aumento de expressão das duas isoformas após 24h de cultura face à situação controlo.

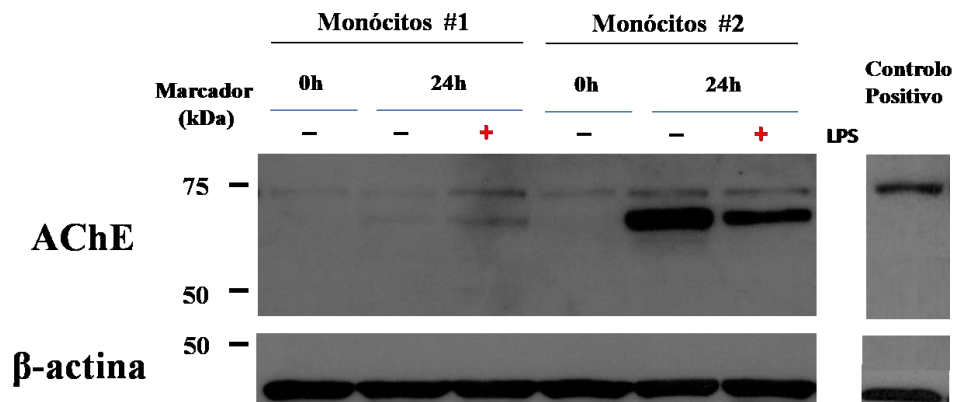


Figura 4.8 - Extractos proteicos de monócitos analisados por *Western blotting* para a proteína da AChE. As células K562 foram utilizadas como controlo positivo da expressão proteica do produto *full-length* do gene da *ACHE*. A β -actina foi usada como controlo de carregamento.

4.2.5 - Estudo da expressão molecular de componentes colinérgicos após estimulação com agonistas nicotínicos

Nesta fase do estudo pretendeu-se analisar o efeito da estimulação colinérgica na expressão molecular dos factores colinérgicos durante a resposta inflamatória induzida pelo LPS. Para tal, as culturas de monócitos foram previamente tratadas ou não com um agonista nicotínico, a nicotina, de forma a activar os receptores nicotínicos, nomeadamente o nAChR α 7. Posteriormente, estas culturas foram incubadas com LPS de modo a desencadear-se uma

resposta inflamatória. De forma a avaliar a resposta inflamatória obtida nas diferentes culturas de monócitos, efectuou-se de seguida a determinação das concentrações de TNF- α , por ELISA, em sobrenadantes das culturas nas diferentes condições experimentais.

No total foram realizados dois ensaios distintos (Figura 4.9 a) e b)). Tal como anteriormente, também nestes ensaios se verifica que o LPS induz uma massiva libertação de TNF- α para o meio extracelular quando comparado com situações controlo. Por outro lado, verificamos que a incubação das culturas com nicotina não induz qualquer variação das concentrações de TNF- α nos sobrenadantes das culturas controlo. Por último, observa-se que a estimulação colinérgica com nicotina não afectou a estimulação da resposta inflamatória por acção do LPS, uma vez que as concentrações de TNF- α não variam significativamente na presença de nicotina. Este facto está em desacordo com dados publicados, pelos quais se esperaria uma redução drástica das concentrações de TNF- α por acção da nicotina. [31,35,36]

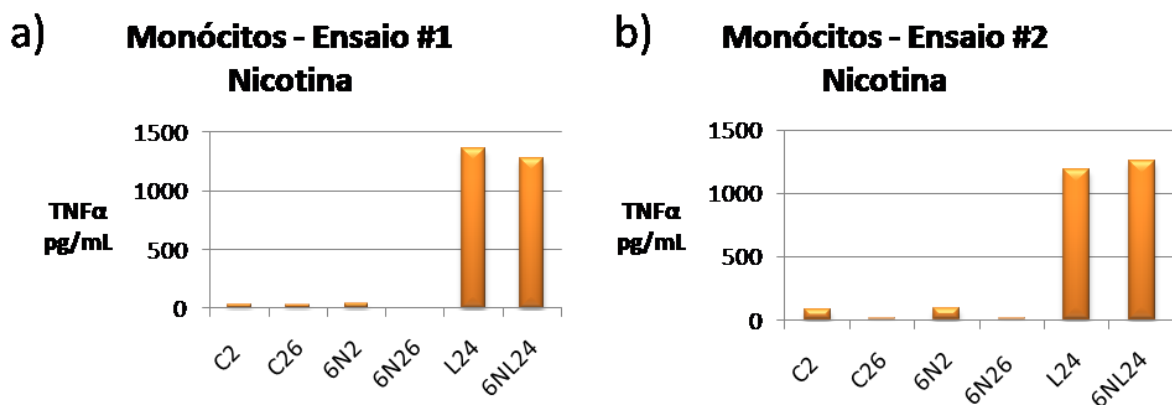


Figura 4.9 a) e b) – Doseamento TNF- α em sobrenadantes de culturas de monócitos quando tratadas ou não com nicotina (10^{-6} M) e LPS ($1\mu\text{g/mL}$). C2 – cultura não tratada com nicotina nem LPS e recolhida às 2h de incubação, C26 – cultura não tratada com nicotina nem LPS e recolhida às 24h de incubação, 6N2 – cultura tratada com nicotina (10^{-6} M) e recolhida às 2h de incubação, 6N26 – cultura tratada com nicotina (10^{-6} M) e recolhida às 24h de incubação, L24 – cultura tratada com LPS e recolhida às 24h de incubação, 6NL24 – cultura tratada com nicotina (10^{-6} M) durante 2h e posteriormente incubada por 24h com LPS/nicotina.

4.3 - Estudo da expressão de componentes colinérgicos em macrófagos na resposta inflamatória

Na última fase deste trabalho utilizaram-se macrófagos diferenciados a partir de culturas primárias de monócitos (Figura 4.10). Numa reacção inflamatória os monócitos são recrutados para o local da inflamação diferenciando-se aí em macrófagos, sendo estas as células efectoras da resposta inflamatória. As culturas de macrófagos foram incubadas na presença ou ausência do estímulo inflamatório LPS ($1\mu\text{g/mL}$), realizando-se recolhas a diferentes tempos de incubação durante 24h.

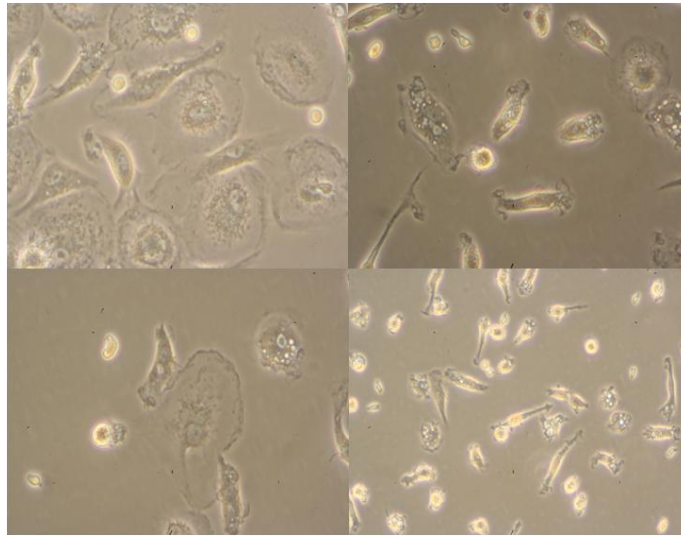


Figura 4.10 - Macrófagos diferenciados a partir de culturas primárias de monócitos.

4.3.1 - Determinação da concentração de TNF- α

De forma semelhante ao efectuado para os outros tipos celulares estudados, também para os macrófagos a indução da resposta inflamatória por acção do LPS foi controlada pela determinação das concentrações de TNF- α em sobrenadantes de cultura (Figura 4.11). Neste caso e tal como esperado, nas situações controlo (ausência de LPS) as concentrações de TNF- α são baixas, aumentando consideravelmente por estimulação com o LPS.

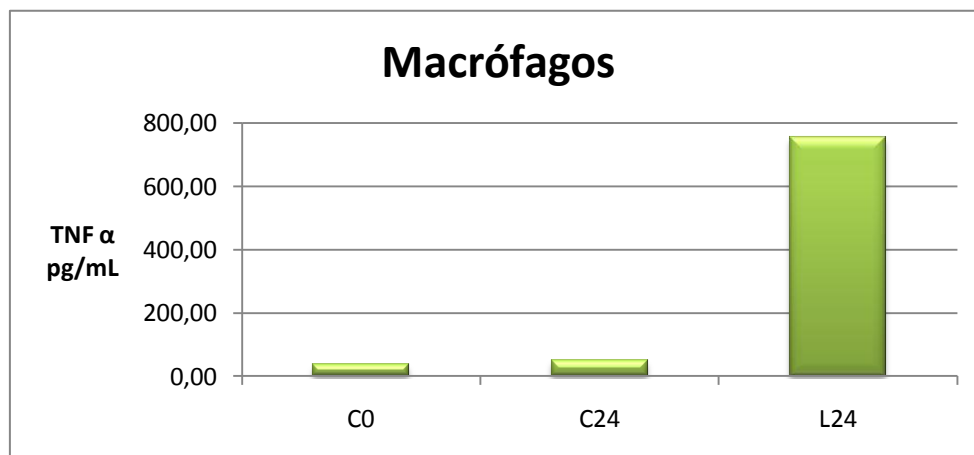


Figura 7.11 - Doseamento de TNF- α em sobrenadantes de culturas de macrófagos incubada na presença ou ausência de LPS. Cx – cultura não tratada com LPS e recolhida a x horas de incubação, Lx – cultura tratada com LPS e recolhida a x horas de incubação.

4.3.2 - Estudo da expressão molecular dos componentes colinérgicos a nível de mRNA

Após controlo da indução da resposta inflamatória procedeu-se ao estudo de expressão molecular dos componentes colinérgicos em macrófagos derivados de monócitos, sendo as

células tratadas e incubadas como referido anteriormente (Figuras 4.12 e 4.13). Inicialmente foi estudada a expressão do gene *ACTB*. Sendo este um gene *house-keeping* a sua expressão na célula não deverá variar dentro das condições estudadas, tal como os nossos resultados comprovam. Ao efectuar-se uma análise comparativa entre monócitos e respectivos macrófagos obtidos por diferenciação verifica-se que em condições normais (controlo) ambos expressam *CTLI*, *CRAT* e *CHRNA7*, não havendo diferenças de expressão entre os tipos celulares. No entanto, não há expressão de *CHAT* e *CHT1* nos dois tipos de células (Figura 4.12). Contudo, no ensaio da Figura 4.13 o gene *CHT1* é expresso em condições normais, o que revela um comportamento diferencial de expressão de acordo com a preparação de macrófagos. É de salientar um completo silenciamento de expressão da *ACHE* em macrófagos a nível do mRNA (Figura 4.12 e 4.13).

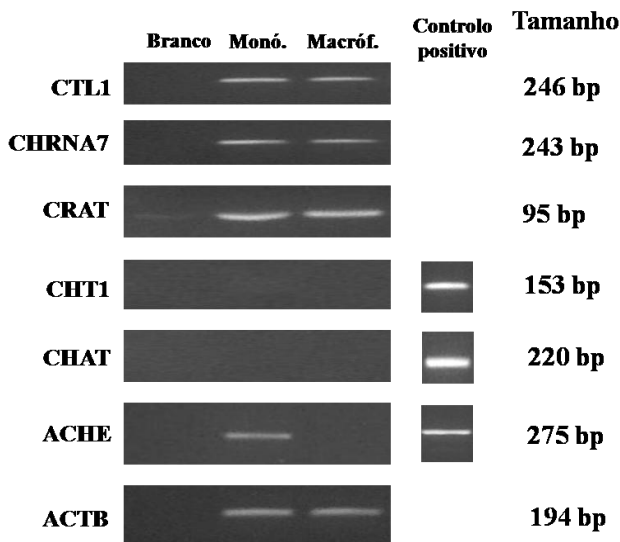


Figura 4.12 - Modulação da expressão de factores colinérgicos por acção do LPS (1µg/mL) em monócitos e macrófagos, por RT-PCR. Células HeLa, CEM e K562 usadas como controlo positivo da expressão dos genes *CHT1*, *CHAT* e *ACHE*, respectivamente. O branco foi usado como controlo negativo. O *ACTB* foi usado como controlo interno.

Após um dia de cultura todos os factores colinérgicos são expressos em condições normais de cultura. Por acção do LPS, verificamos que tanto a expressão do *CHT-1* como da *CHAT* são silenciadas. No entanto, *CTLI*, *CRAT* e *CHRNA7* não parecem revelar alterações muito significativas de expressão. É de realçar o aumento substancial de expressão do gene da *ACHE* face à situação controlo (Figura 4.13).

Expressão de Factores Colinérgicos em Monócitos/Macrófagos na Inflamação

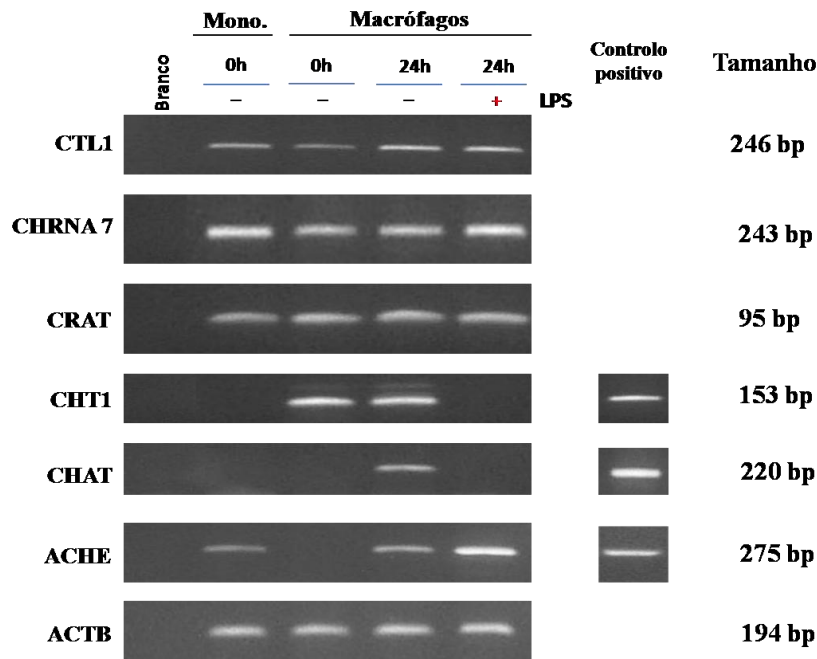


Figura 4.13 - Modulação da expressão de factores colinérgicos por acção do LPS (1µg/ml) em monócitos e macrófagos, por RT-PCR. Células HeLa, CEM e K562 usadas como controlo positivo da expressão dos genes *CHT1*, *CHAT* e *ACHE*, respectivamente. O branco foi usado como controlo negativo. O *ACTB* foi usado como controlo interno.

4.3.3 - Estudo da expressão proteica da AChE

A partir de culturas de macrófagos incubadas nas condições mencionadas anteriormente foram colhidas células para análise por *Western blotting* (Figura 4.14). Para este ensaio utilizaram-se isolamentos distintos dos usados em 4.3.2. Por *Western blotting* observa-se em condições normais a expressão de uma única isoforma, com cerca de 68 kDa, correspondente ao produto *full-length*, tanto em monócitos como em macrófagos. No entanto essa banda parece mais intensa em macrófagos. Após um dia de cultura, em condições normais, é ainda notório um ligeiro aumento de expressão da AChE em macrófagos. Já por acção do LPS a expressão da AChE é ligeiramente reduzida para níveis equivalentes aos iniciais.

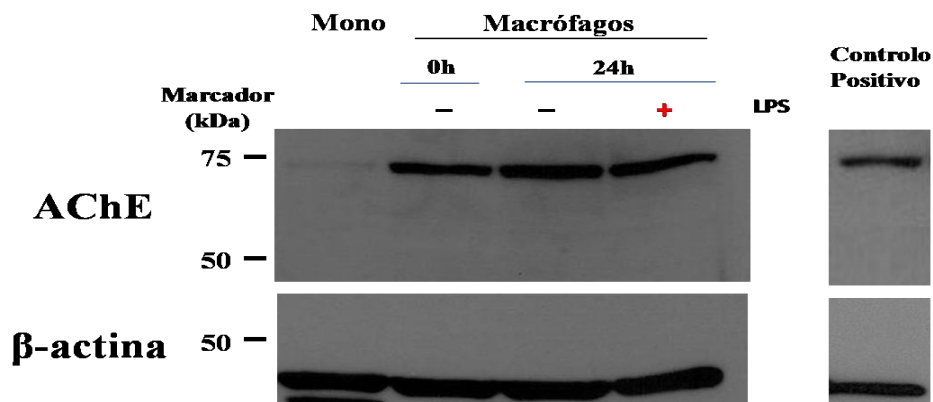


Figura 4.14 - Extractos proteicos de macrófagos analisados por *Western blotting*, para a proteína da AChE. As células K562 foram utilizadas como controlo positivo da expressão proteica do produto *full-length* do gene da *ACHE*. A β-actina foi usada como controlo de carregamento.

5 - Discussão

De acordo com os objectivos deste estudo foram caracterizadas as expressões moleculares de vários componentes colinérgicos em culturas de THP-1, monócitos e macrófagos, e analisadas as variações de expressão quer na resposta inflamatória induzida por acção do LPS, quer na resposta anti-inflamatória mediada por agonistas nicotínicos.

Um estímulo inflamatório induz o aumento de produção e libertação de citocinas pró-inflamatórias para o meio extracelular. Assim e de forma a controlar a indução da resposta inflamatória por acção do LPS, determinaram-se de início as concentrações de TNF- α em sobrenadantes de cultura para os diferentes tipos celulares testados. Como esperado, observou-se sempre um aumento drástico das concentrações desta citocina na presença de LPS quando comparados com as baixas concentrações detectadas em condições normais de cultura. Por outro lado, analisou-se ainda a indução de expressão de TNF- α a nível do mRNA para culturas de THP-1 e monócitos. De acordo com dados publicados [35], observou-se um aumento de expressão nos dois casos. Porém e enquanto que para THP-1 o aumento de expressão mantém-se durante todo o tempo de incubação, para monócitos há um aumento de expressão às 4h de incubação com decréscimo para tempos posteriores de incubação.

Os doseamentos das concentrações de TNF- α permitiram igualmente controlar a acção anti-inflamatória da nicotina nos estudos com monócitos. Em contraste com os dados publicados [31,36,37], a presença de nicotina não afectou a resposta inflamatória induzida pelo LPS. Embora tenham sido testadas diferentes formulações de nicotina em diferentes concentrações (10^{-4} , 10^{-6} e 10^{-8} M) durante diferentes tempos de incubação e com diferentes concentrações de LPS (10, 100 e 1000 ng/ μ L) (dados não apresentados), em nenhum dos ensaios se verificou a diminuição da resposta inflamatória por acção do agonista nicotínico.

O estudo da expressão molecular dos componentes colinérgicos a nível de mRNA revelou a ausência de expressão dos genes *CHTI* e *CHAT* em células THP-1 e monócitos, tanto em condições controlo como pela acção do LPS, sugerindo que estes tipos celulares podem não ser capazes de sintetizar ACh. Porém, ambos expressam os genes *CTLI*, que codifica para outro transportador de colina e *CRAT* que codifica para a carnitina acetiltransferase, a qual foi sugerida poder sintetizar ACh. Desta forma, estes genes poderão constituir uma nova alternativa para a síntese de ACh nestes tipos celulares. Contudo não foi efectuada análise da expressão proteica de *CTLI* e *CRAT* e mais importante não foi avaliada directamente a

capacidade destas células em expressar ACh. Por outro lado, tanto para o gene *CTLI* como para o *CRAT* não se verificaram alterações significativas de expressão por indução com LPS.

Em macrófagos obtiveram-se resultados distintos dos anteriores. Neste caso e no final do processo de diferenciação, o gene *CHTI* apresentou um padrão de expressão diferente nos dois ensaios de diferenciação realizados em que num ensaio se observou expressão de mRNA de *CHTI* e no outro não. Estes resultados sugerem que este gene possa apresentar uma expressão diferencial em função do dador de sangue. No entanto, após 24h em condições normais de cultura observou-se expressão de *CHTI*, assim como de *CHAT* o que indica que a remoção do estímulo de diferenciação, MCSF, pode promover ou manter a expressão desses genes. Estes resultados sugerem que macrófagos derivados de monócitos humanos podem ter a capacidade de expressar ACh, o que está de acordo com dados publicados em macrófagos alveolares de rato.^[21] É de salientar que para ambos os genes, a sua expressão é silenciada com a adição do estímulo inflamatório LPS, indicando que durante a resposta inflamatória o macrófago possa perder a capacidade de síntese de ACh, de forma a evitar a acção anti-inflamatória da ACh produzida pela própria célula. Mais uma vez poderá ser importante considerar a contribuição dos genes *CTLI* e *CRAT*, também expressos por macrófagos. Para estes genes não se registaram variações de expressão dentro das condições experimentais utilizadas. Porém, mais uma vez não foi efectuada análise da expressão proteica de *CTLI* e *CRAT* nem avaliada a capacidade de expressão de ACh por estas células. Em trabalhos futuros será importante avaliar a expressão proteica destes quatro factores assim como a capacidade de monócitos e macrófagos de sintetizar ACh.

Estudos anteriores reportaram a expressão do gene *CHRNA7* em monócitos e macrófagos humanos.^[21,24] No presente trabalho foi demonstrada a expressão desse gene em monócitos e macrófagos a nível do mRNA. No entanto não se observou qualquer variação de expressão por acção do LPS em todos os tipos celulares estudados, indicando desta forma que a resposta inflamatória não modula a expressão de nAChR α 7 pelo menos a nível de mRNA.

Estudos realizados demonstraram que no promotor do gene da *ACHE* existem possíveis locais de ligação do factor de transcrição NF- κ B. Assim, seria de esperar que na resposta inflamatória se verificasse um aumento da expressão deste factor colinérgico que poderia desempenhar uma função pró-inflamatória por via da hidrólise de ACh.^[38] De acordo com esta hipótese de trabalho, verificou-se um aumento de expressão de *ACHE* a nível de mRNA em todos os tipos celulares estudados. Contudo a nível de expressão proteica, os dados

obtidos para estas diferentes células são discrepantes entre si. De facto e para THP-1, a adição do estímulo inflamatório resultou no aumento de expressão das duas isoformas de AChE detectadas em condições normais de cultura e ainda no aparecimento de uma outra isoforma de peso molecular intermédio. De salientar que o aumento de expressão com o LPS foi mais acentuado às 12h de incubação, observando-se um ligeiro decréscimo de expressão às 24h de incubação. Tendo em conta que o nível de transcrito de AChE se mantém elevado até pelo menos 24h de incubação, estes dados permitem sugerir a existência de mecanismos de silenciamento parcial da tradução desta proteína em THP-1.

Em monócitos, o estudo de expressão molecular da AChE revelou igualmente um aumento do nível de transcrito por acção do LPS, embora este aumento não seja tão acentuado como em THP-1. A nível proteico, identificaram-se diferentes padrões de expressão entre dois ensaios realizados. Imediatamente após o isolamento, observou-se unicamente uma baixa expressão da isoforma *full length* para ambos os ensaios. Após um dia em cultura, verificou-se a expressão de uma nova isoforma de menor peso molecular em ambos os ensaios, mas muito mais acentuada no ensaio #2 (Figura 4.8). Com estimulação com LPS, o comportamento das duas culturas de monócitos foi igualmente diferencial. No ensaio #1 observou-se um ténue aumento de expressão das duas isoformas, consistente com o observado a nível de mRNA. Porém, no ensaio #2 observou-se uma nítida diminuição da expressão da isoforma de menor peso molecular sugerindo um silenciamento da expressão proteica da AChE em condições inflamatórias. A discrepância entre ensaios proteicos pode ser justificada pela heterogeneidade relativa aos diferentes dadores. De futuro, a análise de mais amostras de monócitos provenientes de diferentes dadores poderá clarificar estes resultados. Por outro lado e de forma a obter uma melhor correlação dos dados de expressão a nível de RNA e proteína, será necessário no futuro usar as mesmas preparações de monócitos para ambas as análises.

Por último, efectuou-se neste estudo uma análise de expressão de AChE em macrófagos. É importante salientar que em ambos os ensaios realizados foi evidente o silenciamento da expressão de AChE a nível do mRNA no final do processo de diferenciação. No entanto e em relação à proteína demonstrou-se paradoxalmente um aumento de expressão bastante significativo em macrófagos. Para uma melhor compreensão destes resultados seria importante efectuarem-se recolhas de células em tempos intermédios de diferenciação e assim avaliar a evolução da expressão de AChE durante este processo celular. É de salientar que apenas foi efectuado um ensaio de análise proteica para macrófagos. De futuro, outros ensaios

serão realizados de forma a confirmar este padrão de expressão de AChE e mais uma vez será importante utilizarem-se as mesmas culturas de macrófagos para análise de expressão de mRNA e de proteína. Em condições normais de cultura, verificou-se ainda uma alteração significativa de expressão de AChE em macrófagos. De facto e um dia após remoção do estímulo de diferenciação, observou-se a activação da expressão de AChE a nível de mRNA, e consistentemente, um ligeiro aumento da expressão proteica. É importante salientar que em contraste com os tipos celulares anteriormente estudados, os macrófagos apenas expressam a isoforma de maior peso molecular correspondente à proteína *full-length*. Este facto sugere a existência de distintos mecanismos de regulação de expressão da AChE em monócitos e macrófagos. Como referido anteriormente por acção do LPS, observou-se um aumento qualitativamente substancial de AChE a nível de mRNA. Já a nível proteico verificou-se um ligeiro decréscimo da expressão em relação a macrófagos em condições normais de cultura. Neste caso, estes resultados poderão sugerir a existência de um mecanismo anti-inflamatório baseado na diminuição da expressão de AChE que consequentemente poderá favorecer o aumento da expressão de ACh e a sua actividade anti-inflamatória.

No geral, descrevem-se neste trabalho diferentes padrões de expressão de AChE em monócitos e macrófagos. Embora seja necessária a análise de mais amostras, os resultados poderão sugerir a existência de diferentes mecanismos de regulação da expressão desta proteína nestes dois tipos celulares. Este facto poderá mesmo estar associado às diferentes funções desempenhadas por monócitos e macrófagos na resposta inflamatória.

6 – Conclusão e Perspectivas Futuras

Neste estudo demonstrou-se a variação de expressão de factores colinérgicos específicos, por acção do LPS em monócitos e macrófagos humanos. Sugerindo desta forma o envolvimento de mecanismos “colinérgicos” na resposta inflamatória.

De futuro pretende-se realizar mais ensaios de modo a complementar os resultados existentes e a preencher lacunas em aberto. Assim, ambiciona-se obter uma melhor compreensão da acção destes factores colinérgicos na inflamação tal como o estudo de mecanismos a ela subjacentes. Para tal poder-se-á recorrer a uma análise quantitativa por *real-time* PCR de forma a melhor caracterizar as variações de expressão dos factores colinérgicos.

7 - Bibliografia

- [1] Pavlov V.A., Tracey K.J. (2006) Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Biochemical Society Transactions*, **34**:1037-1040.
- [2] Pavlov V.A., Wang H., Czura C.J., Friedman S.G., Tracey K.J. (2003) The Cholinergic Anti-inflammatory Pathway: A Missing Link in Neuroimmunomodulation. *Molecular Medicine*, **9**:125-134.
- [3] Arosa F.A., Cardoso E.M., Pacheco F.C. (2007) Fundamentos de Imunologia. By Lidel – Edições Técnicas, lda
- [4] Danese S., Dejana E., Fiocchi C. (2007) Immune Regulation by Microvascular Endothelial Cells: Directing Innate and Adaptive Immunity, Coagulation, and Inflammation, *The Journal of Immunology*, **178**:6017-6022.
- [5] Medzhitov R. (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response, *Nature*, **449**:819-826.
- [6] Miyake K. (2004) Endotoxin recognition molecules, Toll-like receptor 4-MD-2. *Seminars in Immunology*, **16**:11-16.
- [7] Palsson-Nedermott E., O'Neill L. (2004) Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4, *Immunology*, **113**:153-162.
- [8] Raetz C., Whitfiel C. (2002) Lipopolysaccharide Endotoxins, *Annu Rev Biochem*, **71**: 635–700.
- [9] Petri B., Phillipson M., Kubes P. (2008) The Physiology of Leukocyte Recruitment: An In Vivo Perspective, *The Journal of Immunology*, **180**:6439-6446.
- [10] Cotran R.S., Kumar V., Collins T. (1999) Acute and chronic inflammation. In: Robbins Pathologic basis of disease. 6th Edition by W.B. Saunders Company, Pennsylvania, USA. 50-88.
- [11] Serhan C., Savill J. (2005) Resolution of inflammation: the beginning programs the end, *Nature Immunology*, **12**:1191-1197.
- [12] Lawrence T., Gilroy D. (2007) Chronic inflammation: a failure of resolution? *International Journal of Experimental Pathology*, **88**:85-94.
- [13] Tracey K.J. (2005) Fat meets the cholinergic anti-inflammatory pathway. *JEM* **202**:1017-1021.
- [14] Pavlov V.A., Tracey K.J. (2005) The cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain, Behavior and Immunity*, **19**:493-499.
- [15] Gallowitsch-Puerta M., Pavlov V.A. (2007) Neuro-immune interactions via the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Life Sciences*, **80**:2325-2329.
- [16] Tracey K.J. (2007) Physiology and immunology of the cholinergic anti-inflammatory pathway. *The Journal of Clinical Investigation*, **117**:289-296.
- [17] Kawashima K., Fujii T. (2003) The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sciences*, **74**:675-696.

- [18] Soreq H., Seidman S. (2001) Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Nature Reviews – neuroscience*, **2**:294-302.
- [19] Prado M.A.M., Reis R.A.M., Prado V.F., Mello M.C., Gomez M.V., Mello F.G. (2002) Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochemistry International*, **41**:291-299.
- [20] Jonge W.J., Ulloa L. (2007) The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *British Journal of Pharmacology*, **151**:915-929.
- [21] Gwilt C.R., Donnelly L.E., Rogers D.F. (2007) The non-neuronal cholinergic system in the airways: An unappreciated regulatory role in pulmonary inflammation? *Pharmacology & Therapeutics*, 1-15.
- [22] Kirkpatrick C., Bittinger F., Nozadze K., Wessler I. (2003) Expression and function of the non-neuronal cholinergic system in endothelial cells, *Life Sciences*, **72**:2111-2116.
- [23] Wessler I., Kirkpatrick C. (2001) The Non-neuronal Cholinergic System: an Emerging Drug Target in the Airways, *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, **14**:423-434.
- [24] Wessler I., Kirkpatrick C. (2008) Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans, *British Journal of Pharmacology*, **154**:1558-1571.
- [25] Wessler I., Kilbinger H., Bittinger F., Kirkpatrick C. (2001) The Non-neuronal Cholinergic System – The Biological Role of Non-neuronal Acetylcholine in Plants and Humans, *Jpn. J. Pharmacol.*, **85**:2-10.
- [26] Pick M., Flores-Flores C., Grisaru D., Shochat S., Deutsch V., Soreq H., (2004) Blood-cell-specific acetylcholinesterase splice variations under changing stimuli, *Int. J. Devl Neuroscience*, **22**:523-531.
- [27] Racké K., Juergens U., Matthiesen S. (2006) Control by cholinergic mechanisms, *European Journal of Pharmacology*, **533**:57-68.
- [28] Heeschen C., Jang J.J., Weis M., Pathak A., Kaji S., Hu R.S., Tsao P.S., Johnson F.L. Cooke J.P. (2001) Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nature Medicine*, **7**:833-839.
- [29] Song P., Sekhon H.S., Proskocil B., Blusztajn J.K., Mark G.P., Spindel E.R. (2003) Synthesis of acetylcholine by lung cancer. *Life Sciences*, **72**:2159–2168.
- [30] Wessler I., Kilbinger H., Bittinger F., Unger R., Kirkpatrick C.J. (2003) The non-neuronal cholinergic system in humans: Expression, function and pathophysiology. *Life Sciences*, **72**:2055-2061.
- [31] Tracey K. (2009) Reflex control of immunity, *Nature*, **9**:418-428.
- [32] Rosas-Bllina M., Ochani M., Parrish W., Ochani K., Harris Y., Huston J., Chavan S., Tracey K. (2008) Splenic nerve is required for cholinergic anti-inflammatory pathway control of TNF in endotoxemia, *PNAS*, **31**:11008-11013.
- [33] Parrish W., Rosas-Ballina M., *et al* (2008) Modulation of TNF Release by Choline Requires $\alpha 7$ subunit Nicotinic Acetylcholine Receptor-Mediated Signaling, *Mol Med*, **14**: 567-574.

- [34] Jonge W., Zanden E., *et al* (2005) Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jack2-STAT3 signaling pathway, *Nature Immunology*, **8**:844-851.
- [35] Chen Y., Huang Y., *et al*, (2006) Differential regulation of ARE-mediated TNF α and IL-1 β mRNA stability by lipopolysaccharide in RAW264.7 cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **346**:160–168.
- [36] Sykes A., Brampton C., *et al*, (2000) An investigation into the effect and mechanisms of action of nicotine in inflammatory bowel disease, *Inflammation Research*, **49**:311-319.
- [37] Yoshikawa H., Kurokawa M., *et al* (2006) Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I- κ B phosphorylation and nuclear factor- κ B transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor α 7, *Clinical and Experimental Immunology*, **146**:116-123.
- [38] Shapira M., Tur-Kaspa I., *et al*, (2000) A transcription-activating polymorphism in the *ACHE* promoter associated with acute sensitivity to anti-acetylcholinesterases, *Human Molecular Genetics*, **9**:1273-1281.

Anexo I

Isolamento de leucócitos mononucleados a partir de buffy-coat: O buffy-coat foi retirado de forma estéril do respectivo saco, diluído 1:2 com PBS 1x pH7,4. A solução de Ficoll-Paque foi colocada à temperatura ambiente e homogeneizada antes de ser utilizada. O sangue diluído (16 mL) foi depositado em camada sobre a solução de Ficoll-Paque (8mL). Por centrifugação a 1390 rpm durante 40 minutos a 20°C, obtém-se a separação de quatro camadas contendo diferentes tipos de células indicados na Figura 1.

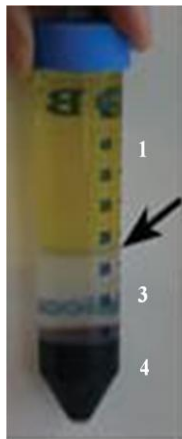


Figura 8 - Separação de células do sangue com Ficoll-Paque. 1 – Plasma, 2 - Anel de leucócitos mononucleados (seta), 3 – ficoll-Paque, 4 – eritrócitos e granulócitos.

Após remoção do plasma recolheu-se o anel de leucócitos mononucleados e as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x pH7,4 por centrifugação a 720 rpm durante 10 minutos a 20°C. Por fim, o pellet de células foi ressuscendido em PBS 1x pH7,4 e procedeu-se à contagem de células pelo aparelho Cell Dyn 1600 (Abbott).

Isolamento de monócitos usando o *Monocyte Isolation Kit II*: Para o isolamento de monócitos humanos foi utilizado o *Monocyte Isolation Kit II* (Miltenyi Biotec) e seguiu-se o protocolo recomendado pelo produtor. Usando este *kit* os monócitos são isolados por selecção negativa. As células presentes na amostra que não sejam monócitos, são inicialmente marcados com um *cocktail* Biotina-Anticorpo. Este *cocktail* contém anticorpos monoclonais conjugados com biotina e dirigidos contra os seguintes marcadores humanos: CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 e glicoforina A. Em seguida e após marcação com *Microbeads* magnéticas acopladas a anticorpos anti-biotina, as células marcadas ficam retidas em colunas MACS LS (capacidade de 1×10^8 células) por acção do campo magnético do *MACS Separator*. Os monócitos, não marcados, passam através da coluna sendo então recolhidos. Por fim, o número de células obtido foi determinado no aparelho *Cell Dyn 1600* (Abbott).

Anexo II

Isolamento de RNA total: Centrifugaram-se as células a 1200 rpm, 5 minutos à temperatura ambiente. Estas foram lavadas por centrifugação com PBS 1x pH 7,4 formando-se um pellet de células. Este foi bem ressuscitado com reagente TRizol (Invitrogen) (1 mL por 5×10^6 células) e incubado 5 minutos à temperatura ambiente. Foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio agitando-se vigorosamente os tubos durante 15 segundos. As amostras foram incubadas 3 minutos à temperatura ambiente e em seguida centrifugadas a 12000 xg, 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a mistura separou-se em três fases: uma fase inferior de clorofórmio de coloração vermelha, a interfase e uma fase superior incolor, que contém o RNA. A fase superior foi transferida para um novo tubo e precipitou-se o RNA com 0,5 mL de álcool isopropílico. Em seguida, as amostras foram incubadas 10 minutos à temperatura ambiente e posteriormente centrifugou-se a 12000 xg, 10 minutos a 4°C. O pellet de RNA apresentou-se sob uma forma gelatinosa formando-se geralmente no fundo do tubo ou nas paredes laterais. O sobrenadante foi removido e o pellet lavado com 1 mL de etanol a 75%, centrifugando-se a 7500 xg, 5 minutos a 4°C. Em seguida, o pellet foi seco no *Speed-vac* 2 minutos, ressuscitado em 15 μ L de H₂O e incubado 10 minutos a 60°C. Por fim, quantificaram-se as amostras no aparelho *Nanodrop* a 260 nm (NanoDrop 2000c).

Tratamento com DNase: Para 5 μ g de RNA adicionou-se: 2,5 μ L de tampão turbo DNase 5x, 0,25 μ L de turbo DNase e água até perfazer um volume final de reacção de 25 μ L, misturou-se gentilmente e incubou-se a 37°C durante 30 minutos. Adicionou-se novamente 0,25 μ L de turbo DNase e voltou-se a incubar nas condições anteriores. Em seguida, adicionou-se 2,5 μ L de reagente de inactivação e incubou-se 2 minutos à temperatura ambiente, ressuscitando-se ocasionalmente. Centrifugou-se a 10000 rpm 2 minutos, possibilitando que o reagente de inactivação sedimentasse, e transferiu-se o RNA (parte superior) para um novo tubo. Por fim, as amostras foram quantificadas no aparelho *Nanodrop* a 260 nm (NanoDrop 2000c).

Síntese de cDNA: Para 1 μ g de RNA tratado com DNase adicionou-se: 1 μ L de *random primers* (Roche) (300ng/ μ L), 1 μ L de dNTP (10mM) e água até perfazer um volume final de reacção de 12 μ L. A mistura foi incubada a 65°C durante 5 minutos e depois colocada em gelo 2 minutos. Em seguida, adicionou-se: 4 μ L de tampão 5x, 2 μ L de DTT 0,1 M e 1 μ L de *RNase OUT* (40 u/ μ L), misturando-se gentilmente e incubando-se a 25°C durante 2 minutos. Posteriormente, adicionou-se 1 μ L da enzima transcriptase reversa *Superscript II* (200 u) misturando-se gentilmente. As amostras foram novamente incubadas a 25°C durante 10 minutos e em seguida a 42°C durante 50 minutos. Por fim, ocorreu uma incubação a 70°C durante 15 minutos onde a enzima sofre inactivação. Todas as amostras foram armazenadas a -20°C.

Anexo III

Tabela 1 – Primers, temperatura de *annealing*, concentração de MgCl₂, número de ciclos de amplificação e tamanhos dos produtos esperados para cada um dos genes estudados.

Gene	Primers 5' → 3'	Nº ciclos	T. <i>annealing</i>	Tamanho amplificado (pb)
β-actina	For: TCCCTGGAGAAGAGCTACGA Rev: AGCACTGTGTTGGCGTACAG	25	57	194
GAPDH	For: CAATGACCCCTTCATTGACC Rev: TGGGATTTCCATTGATGACA	25	53	122
CrAT	For: TCAGGCCTCAGGAGGTGTAG Rev: TCTTGAGCCACCACTCAGAC	35	60	95
CTL1	For: TCAACAGCACCAACTTCTGC Rev: ACAGGAAGCAATGAGCGACT	30	60	246
ChAT	For: CCACTCCATTCCCCTGACT Rev: GAGACGGCGGAAATTAATGA	40	60	220
ChT1	For: GTGGAACCTTGCCACCTAAA Rev: AGCTGAGGGTCATGCTCTGT	40	60	153
TNF-α	For: CTGCTGCACTTTGGAGTGAT Rev: AGATGATCTGACTGCCTGGG	25	60	93
nAChR α7	For: CCCAAGTGGACCAGAGTCAT Rev: GCCACACACTACCCAGAGT	30	55	243
AChE	For: CGGGTCTACGCCTACGTCTTTGAACACCGTGCTTC Rev: AGGTCCAGACTAACGTACTGC	40	58	275