

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISIOLOGIA

Michele Aramburu Serafini

**VIA COLINÉRGICA ANTI-INFLAMATÓRIA E PARTÍCULAS DE MEMBRANA DE  
CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS: NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS  
PARA O TRATAMENTO DAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS**

Porto Alegre  
2022

Michele Aramburu Serafini

**VIA COLINÉRGICA ANTI-INFLAMATÓRIA E PARTÍCULAS DE MEMBRANA DE  
CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS: NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS  
PARA O TRATAMENTO DAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Helena Paz

Porto Alegre

2022

### CIP - Catalogação na Publicação

Serafini, Michele

VIA COLINÉRGICA ANTI-INFLAMATÓRIA E PARTÍCULAS DE MEMBRANA DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS: NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS / Michele Serafini.

-- 2022.

94 f.

Orientador: Ana Helena Paz.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, , Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. terapia celular. 2. doenças inflamatórias intestinais. 3. via colinérgica anti-inflamatória. 4. partículas de membrana. 5. células estromais mesenquimais. I. Paz, Ana Helena, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Aos meus pais, Amelia e Robson, por todo o apoio incondicional, essencial no meu caminho até aqui, e também por terem sido grandes exemplos de persistência, garra e dedicação. E a todos os estudantes e professores que fazem pesquisa nas universidades públicas e que lutam por uma educação gratuita e de qualidade.

## **AGRADECIMENTOS**

Os meus mais sinceros agradecimentos:

À professora Dra. Ana Helena da Rosa Paz, por ter me guiado desde o final da graduação até este instante, em que estamos entregando esta tese e encerrando mais um ciclo. Agradeço enormemente por ter acreditado no meu potencial quando eu ainda era uma jovem quase-bióloga e aspirante a cientista. Muito obrigada por toda a tua dedicação, paciência, confiança, carinho e ensinamentos ao longo destes mais de 6 anos de orientação. Tenho muito orgulho de todo o trabalho que conseguimos produzir juntas e sou imensamente grata por ter tido a oportunidade de trabalhar e aprender contigo!

Aos membros da banca, agradeço pela disposição em avaliar este trabalho, contribuindo com seus conhecimentos, sugestões e experiência para enriquecer nosso trabalho e minha formação como pesquisadora. MUITÍSSIMO obrigada pela atenção e dedicação dispensadas a este trabalho!

Aos meus colegas de laboratório, especialmente às minhas "irmãs mais velhas" Dra. Fabiany Gonçalves e Dra. Natália Schneider, que estavam presentes desde o início da minha trajetória no mundo da cultura de células e dos modelos animais. Muito obrigada por todo o aprendizado e também pela amizade! Agradeço especialmente também aos meus colegas Ana Beatriz Tittoni, Ana Carolina Henzel, André Henningen, Dienifer Sirena, Larissa Santos, Mariana Aubin e Monique Franco, por todo o companheirismo, dedicação e amizade. Foram muitos dias de trabalho em todos os horários possíveis, de noite, finais de semana, e teria sido muito mais difícil sem vocês. MUITÍSSIMO obrigada por toda a parceria! A todos os demais colegas do laboratório Células, Tecidos e Genes, agradeço também por poder contar com vocês sempre que precisei e também pela agradável convivência!

À minha família, em especial aos meus pais Amelia e Robson, por me ensinarem desde cedo a importância de estudar e terem me apoiado nesta jornada, que começou aos meus 6 anos e está se encerrando somente agora, aos 30. Muito obrigada por todo o incentivo, apoio incondicional, paciência e carinho. Vocês me ensinaram a ser persistente, resiliente e a trabalhar duro, e por tudo isso sou extremamente grata! Esta conquista também é de vocês, pois só cheguei até aqui porque tive o apoio de vocês!

Ao meu amor e companheiro de vida, Guilherme Schu, por todo o carinho, cuidado e encorajamento. Teu apoio e otimismo nos momentos em que fiquei nervosa (que não foram poucos!) foram essenciais para que eu conseguisse me manter calma e continuar focada no meu trabalho, sem medo, mesmo quando as coisas pareciam muito difíceis. Não tenho palavras para agradecer por todo o teu incentivo, teu companheirismo e bom humor. Tu torna a minha vida mais leve e eu sou muito sortuda por tu estares nela!

Aos meus amigos, por terem sempre me apoiado e escutado quando compartilhei minhas vitórias e também os momentos mais difíceis da minha trajetória acadêmica. Muito obrigada por sempre me acolherem e também por todos os conselhos! Vocês são pessoas incríveis e muito queridos para mim, e fizeram parte da minha história e do meu crescimento pessoal. Vou levar sempre o carinho de vocês comigo!

Aos pesquisadores e demais funcionários da Unidade de Pesquisa Laboratorial do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial dra. Marina Siebert, dra. Clevia Rosset, dr. Hugo Bock, Everaldo Batista e Flávia Giusti por toda a disposição em ajudar sempre que precisei, e também pelo bom humor e paciência.

Às políticas públicas e aos órgãos de fomento à pesquisa, CNPq e CAPES, que possibilitaram que uma estudante de escola pública de baixa renda como eu entrasse na universidade, se formasse e seguisse na pós-graduação como bolsista, podendo se dedicar de forma exclusiva aos estudos (e que agora está prestes a se formar Doutora em Ciências Biológicas: Fisiologia!).

A todos que contribuíram de alguma forma para a minha formação, o meu mais sincero muito obrigada!

## APRESENTAÇÃO

Esta tese está estruturada da seguinte maneira: Introdução, Objetivos, Capítulo I, Capítulo II, Discussão Integrada, Conclusões e Perspectivas, e Referências.

Na **Introdução**, são abordadas as bases teóricas que foram utilizadas para a construção do presente trabalho. Na seção **Objetivos**, são apresentados os objetivos geral e específicos. Nos **Capítulos I e II** são apresentados os dois artigos científicos produzidos e concluídos durante o período de doutorado.

A seguir, é apresentada uma **Discussão** englobando ambos os artigos já concluídos. Na seção **Conclusões**, estão representadas as conclusões gerais baseadas nesta tese. Por fim, as **Referências** contêm a literatura utilizada na Introdução e na Discussão da tese, sendo que cada artigo científico possui sua própria lista enumerada de referências bibliográficas.

Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha 7$ nAChR - receptor nicotínico de acetilcolina  $\alpha 7$

AB - alcian blue

ACh - acetilcolina

CAIP - via colinérgica anti-inflamatória (do inglês "cholinergic anti-inflammatory pathway")

CD - cluster de diferenciação

CM – meio condicionado de células estromais mesenquimais

CTL - linfócito T citotóxico

DC – doença de Crohn

DII – doenças inflamatórias intestinais

DMEM – *Dulbecco's modified eagle medium*

DSS - dextran sulfato de sódio

EV - vesículas extracelulares

ENV - estimulação do nervo vago

FBS – soro fetal bovino

FOXP3 - fator transcricional fork head box p3

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HLA - antígeno leucocitário humano (do inglês "human leucocyte antigen")

HUVEC - células endoteliais de veia umbilical humana

IAD - índice de atividade da doença

ICAM-1 - intercelular adhesion molecule-1

IDO - indoleamina-2,3-dioxigenase

IECs - células epiteliais intestinais

IFN $\gamma$  - Interferon  $\gamma$

IL - interleucina

M1 - macrófago pró-inflamatório (via clássica)

M2 - macrófago anti-inflamatório (via alternativa)



mAChRs - receptores muscarínicos de acetilcolina

MCP-1 - proteína quimioatratora de monócitos 1

MP – partículas de membrana de células estromais mesenquimais

MSC – célula estromal mesenquimal

nAChRs - receptores nicotínicos de acetilcolina

NK - célula natural killer

NO - óxido nítrico

PGE2 - prostaglandina E2

RNA - ácido ribonucleico

TFG $\beta$ 1 - fator de transformação de crescimento beta 1

TGI - trato gastrointestinal

Th - linfócito T-helper

TLRs - receptores Toll-like

TNBS - solução de ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico

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

Treg - célula T regulatória

UC – colite ulcerativa

VCAM-1 - vascular cell adhesion molecule-1

VEGF - fator de crescimento do endotélio vascular

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Barreira epitelial intestinal no cólon na homeostase e na inflamação.....	6
<b>Figura 2.</b> Representação da via anti-inflamatória colinérgica (CAIP).....	10
<b>Figura 3.</b> Efeito modulador das MSCs nas células imunes.....	13

## RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças crônicas caracterizadas por respostas imunes exacerbadas à microbiota do trato gastrointestinal. A incidência e progressão destas doenças estão associadas a um desequilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias, levando a uma resposta imune aumentada na mucosa do trato gastrointestinal (TGI). Os tratamentos atualmente disponíveis visam diminuir a resposta imune no TGI, entretanto, estes podem causar efeitos adversos e não são capazes de promover a remissão sustentada da doença. Assim, alternativas terapêuticas estão sendo estudadas para o tratamento das DII. Em estudos pré-clínicos, o efeito anti-inflamatório da ativação da via colinérgica tem sido reportado. Nesta via, o receptor nicotínico de acetilcolina  $\alpha$ -7 está envolvido na inibição de processos inflamatórios, modulando a produção de citocinas e diminuindo a atividade de macrófagos, células dendríticas e linfócitos T. De outro lado, as células estromais mesenquimais (MSCs) são células que possuem um grande potencial terapêutico devido a suas propriedades imunomodulatórias. Entretanto, a administração das MSCs como terapia apresenta alguns riscos, sendo o principal o aprisionamento destas células nos microcapilares pulmonares após transplante. Assim, alternativas que utilizem os benefícios da terapia celular, porém minimizem os riscos desta, estão sendo estudadas. O meio condicionado de MSC (CM) consiste no meio de cultura de MSCs contendo fatores solúveis secretados por estas células, e seu efeito imunomodulador já foi demonstrado tanto *in vitro* quanto em modelos animais. As partículas de membrana de MSC (MP) são pedaços de membrana contendo proteínas e enzimas, que podem ser geradas a partir da lise de MSCs, cujo efeito imunomodulador já foi observado *in vitro*. A presente tese inclui um artigo de revisão explorando a via colinérgica nas DII e um manuscrito original, no qual investigamos os efeitos da terapia com MP e com CM no modelo de colite ulcerativa. Entre os dias 0 e 7 do protocolo, os animais receberam 2% de dextran sulfato de sódio (DSS) e, nos dias 2 e 5, receberam os tratamentos com MP, CM, MSC ou veículo (grupo DSS). No dia 8, os animais foram eutanasiados e amostras biológicas foram coletadas. Neste trabalho, observamos que as MP conservam algumas das propriedades terapêuticas de imunomodulação das MSCs íntegras, sendo capazes de reduzir os sinais clínicos da doença, bem como a perda de peso corporal e a inflamação em nível tecidual na análise histológica. As MP, o CM e as MSCs foram eficazes em reduzir a perda de mucinas associada às células caliciformes da mucosa, assim como o número de células apoptóticas no cólon e o número de células CD3+ no tecido, sugerindo que as MP e o CM são alternativas tão eficazes quanto as MSCs para reduzir a infiltração de linfócitos T e a morte de células do cólon neste modelo. Da mesma forma, todos os tratamentos foram capazes de diminuir os níveis de IL6 em comparação ao grupo não tratado. As MP, juntamente com as MSCs, foram eficazes em diminuir os níveis de TNF $\alpha$  em comparação aos animais não tratados. Contudo, apenas o tratamento com MSCs teve efeito nos níveis de IL5, IL12p70 e IFN $\gamma$  no cólon, sugerindo que poderia ser necessário tanto o contato célula-célula quanto a ação parácrina para a modulação destas citocinas no tecido. Por fim, apenas os tratamentos com MSC e CM foram capazes de reduzir os níveis de IL4, indicando que os fatores solúveis (ausentes no tratamento com as MP) podem ser necessários para modular os níveis desta citocina. Do nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que avalia o efeito imunomodulador das MP *in vivo*. Assim, mais estudos são necessários para entender mais profundamente os mecanismos de ação terapêutica das MP em modelos de doenças inflamatórias.

## ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic diseases characterized by exacerbated immune responses to the normal gastrointestinal (GI) tract microbiota. The incidence and progression of IBD are associated with an imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines, leading to an increased immune response in the GI mucosa. Currently available treatments aim to decrease the immune response in the GI tract, however, they are not capable of promoting sustained remission of the disease, besides causing several adverse effects. Thus, therapeutic alternatives are being explored for IBD treatment. In preclinical studies, effects of activating the cholinergic anti-inflammatory pathway (CAIP) have been reported. In this pathway,  $\alpha$ -7 nicotinic acetylcholine receptor is involved in the inhibition of inflammatory processes, modulating the production of cytokines and decreasing macrophages, dendritic cells and T lymphocytes activation. Furthermore, mesenchymal stromal cells (MSC) have great therapeutic potential due to their immunomodulatory properties. However, MSC administration as therapy presents some risks, such as the entrapment of these cells in lung microcapillaries after transplantation. Thus, alternatives which use the benefits of cell therapy, but minimize its risks, are being investigated. MSC conditioned medium (CM) consists of MSC culture medium containing soluble factors secreted by these cells, and its immunomodulatory effect has been demonstrated both *in vitro* and in animal models. MSC membrane particles (MP) are pieces of membrane containing proteins and enzymes, which can be generated from MSC lysis, whose immunomodulatory effect has already been observed *in vitro*. The present thesis includes a review article exploring the cholinergic anti-inflammatory pathway in IBD and an original manuscript, in which we investigated the effects of MP and CM therapy in a ulcerative colitis model. Between protocol days 0 and 7, mice received 2% sodium dextran sulfate (DSS) and, on days 2 and 5, animals received treatments with MP, CM, MSC or vehicle (DSS group). On day 8, mice were euthanized and biological samples were collected. In the present work, we observed that MP treatment retain most of the immunomodulatory therapeutic properties of living MSC, being able to reduce the clinical signs of the disease, as well as body weight loss and tissue inflammation in the histological analysis. MP, CM and MSCs were effective in reducing mucin loss associated with mucosal goblet cells, as well as the number of apoptotic cells in the colon and the number of CD3+ cells in the tissue, suggesting that MP and CM are effective alternatives to MSCs to reduce T lymphocyte infiltration and colon apoptosis on this model. MP, along with MSCs, were effective in decreasing TNF $\alpha$  levels compared to untreated animals. Similarly, all treatments were able to lower IL6 levels compared to the untreated group. However, only MSC treatment demonstrated an effect on IL5, IL12p70 and IFN $\gamma$  levels in the colon, suggesting that both cell-cell contact and paracrine factors could be necessary for modulating these cytokines in the colon. Finally, only MSC and CM treatments were able to reduce IL4 levels, indicating that soluble factors (absent in MP treatment) may be necessary to modulate this cytokine. To our knowledge, this is the first work to evaluate MP immunomodulatory effect *in vivo*. Thus, further studies are necessary to understand more deeply MP mechanisms of therapeutic action in inflammatory disease models.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Doenças Inflamatórias Intestinais.....	1
1.1.1. Colite ulcerativa.....	2
1.1.2. Doença de Crohn.....	5
1.2. Sinalização colinérgica nas doenças inflamatórias intestinais.....	8
1.3. Células estromais mesenquimais e terapia celular.....	11
1.4. Terapias derivadas de células estromais mesenquimais: alternativas livres de células.....	14
2. HIPÓTESE.....	15
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. Objetivo geral.....	16
3.2. Objetivos específicos.....	16
4. CAPÍTULO I: Cholinergic immunomodulation in inflammatory bowel diseases (artigo de revisão).....	17
5. CAPÍTULO II: Mesenchymal stromal cell membrane particles: a novel cell-free therapy for inflammatory bowel diseases (artigo original) .....	28
6. DISCUSSÃO.....	59
7. CONCLUSÕES.....	62
8. PERSPECTIVAS.....	64
9. REFERÊNCIAS.....	65
10. ANEXO.....	81

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Doenças inflamatórias intestinais**

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças crônicas, caracterizadas por uma resposta imune aumentada à microbiota normal do trato gastrointestinal (TGI) em indivíduos geneticamente suscetíveis, levando a um desequilíbrio na produção e secreção de citocinas e à lesão tecidual (1). Estas doenças apresentam um padrão de crise e remissão, e são representadas pela colite ulcerativa (UC) e doença de Crohn (DC).

Tanto a incidência quanto a prevalência das DII aumentaram nos últimos anos, especialmente em países industrializados (2). É importante ressaltar que diferenças nos recursos destinados à saúde e no acesso ao atendimento médico afetam o diagnóstico destas doenças, o que pode explicar porquê países de baixa renda relatam menores taxas de incidência de DII. Estudos epidemiológicos no Brasil relataram que o estado mais desenvolvido e com maior atividade econômica também apresenta a maior taxa de incidência de DII, comparável a países europeus como Portugal e Irlanda (3,4). No entanto, a incidência de DII também está aumentando em vários países de baixa renda na América Latina e no Caribe (5).

Embora a etiologia das DII ainda seja desconhecida, estudos recentes indicam o papel de fatores genéticos, da microbiota intestinal e do desequilíbrio do sistema imune no estabelecimento destas doenças (6,7). A combinação de fatores genéticos e ambientais, bem como a alimentação e a interação com a microbiota, parece ser importante para desencadear as DII (8). A alimentação, por ser capaz de influenciar na composição da microbiota do TGI, pode influenciar na resposta imune intestinal, podendo desempenhar um importante papel na patogênese das DII. Por exemplo, dietas como a dieta ocidental, contendo altos índices de alimentos ultraprocessados, açúcares refinados e gorduras, e baixas quantidades de fibras, têm sido apontadas como potenciais fatores de risco para as DII (9). Já foi observado também que a dieta ocidental está associada a maiores níveis de interleucina (IL) 6, proteína C reativa e TNF- $\alpha$  (10), marcadores pró-inflamatórios que contribuiriam para um desequilíbrio no sistema imune e o desencadeamento de DII.

Os tratamentos atualmente existentes para as DII visam principalmente diminuir a resposta imune através do uso de esteróides, tiopurinas, drogas biológicas e moléculas que bloqueiam o recrutamento de células imunes no intestino inflamado (11,12). No entanto, esses tratamentos podem

causar efeitos adversos, além de não serem capazes de promover a remissão sustentada da doença, tornando necessária até mesmo a remoção cirúrgica de partes do intestino em diversos casos. Além disso, vários pacientes não respondem aos tratamentos existentes, tornando imperativo o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (13).

### **1.1.1. Colite ulcerativa**

A colite ulcerativa (UC) é caracterizada por uma inflamação crônica na porção final do intestino grosso (cólon e reto) e a condição pode se apresentar em todas as idades (14). Diversos fatores, como predisposição genética, fatores ambientais e desregulação imunológica da mucosa, parecem estar envolvidos na patogênese da UC (15).

Em indivíduos saudáveis, o sistema imunológico da mucosa do intestino apresenta tolerância a bactérias simbióticas e defende contra a invasão de patógenos, iniciando respostas imunes contra antígenos exógenos. As células do sistema imune inato residentes no intestino são representadas pelos macrófagos e pelas células dendríticas, que exercem efeitos imunomoduladores durante as respostas inflamatórias, e também pelas células epiteliais intestinais (IECs) que expressam receptores Toll-like (TLRs), que reconhecem antígenos microbianos de forma não-específica (16). Na UC, um desequilíbrio na resposta imune no intestino pode afetar a barreira epitelial e aumentar a permeabilidade do tecido, contribuindo para o estabelecimento de uma inflamação crônica (17). Diversas células imunes estão envolvidas neste processo, como macrófagos, neutrófilos e células T do *cluster* de diferenciação (CD)4+. Por exemplo, a migração de neutrófilos para a mucosa do cólon é um importante marcador de inflamação, sendo a extensão da infiltração de neutrófilos correlacionada com a gravidade da doença (18).

Os macrófagos são células muito importantes no sistema imune inato, sendo responsáveis por manter a homeostase do tecido, regular a apoptose e a produção de fatores de crescimento. Estas células apresentam plasticidade e diversidade funcional, sendo capazes de diferenciar em subtipos M1 (via clássica, pró-inflamatória) ou M2 (via alternativa, anti-inflamatória). Quando ocorre uma infecção ou lesão tecidual, como ocorre na UC e na DC, os monócitos circulantes são recrutados para os locais inflamados e se diferenciam em macrófagos M1. Se esses macrófagos não puderem ser controlados de forma eficaz, eles agravam a progressão da doença, promovendo a secreção de citocinas pró-

inflamatórias como TNF $\alpha$  e IL6, que contribuem para o recrutamento de outras células imunes como neutrófilos e linfócitos. Já os macrófagos M2 exercem funções anti-inflamatórias, desempenhando um papel na cicatrização de feridas e processos fibróticos (16), e estão associados à resolução de uma inflamação.

Além do sistema imune inato, o sistema imune adaptativo também está envolvido na patogênese da UC – mais especificamente, as células T-helper (Th)2 CD4+. As células Th2 desempenham um papel essencial na defesa contra parasitas e na modulação de reações alérgicas através da secreção das citocinas IL4, IL5 e IL13 (19). A proteína de ligação do fator de transcrição GATA 3 é o regulador mais importante na diferenciação de células Th2 (20), e sua expressão é observada em níveis mais elevados no tecido do cólon de pacientes com UC em comparação com pacientes com doença de Crohn ou indivíduos saudáveis. Este fator de transcrição também se encontra aumentado no tecido do cólon de pacientes com UC com doença ativa em comparação com pacientes com UC com doença inativa (21). Na UC, estudos de coorte revelaram que os níveis de mRNA de IL5 e IL13 são particularmente aumentados no tecido inflamado em comparação com o tecido não inflamado (22,23). Além disso, foi demonstrado que a IL13 pode desregular as junções epiteliais, aumentando o fluxo de antígenos através destas, contribuindo para a apoptose neste tecido (24,25). Assim, a produção excessiva de IL13 na UC pode levar a um efeito tóxico nas células epiteliais do cólon e na barreira epitelial, aumentando a atividade da doença.

O desequilíbrio entre as células T regulatórias (Treg) e Th17 está envolvido na progressão de ambas as doenças, UC e doença de Crohn. Tregs são células T CD4+ que expressam a cadeia  $\alpha$  do receptor de IL2 de alta afinidade (CD25) e o fator de transcrição Forkhead box P-3 (Foxp3), possuindo um papel anti-inflamatório e imunomodulatório essencial nas DII (26). Já as células Th17 são células T pró-inflamatórias CD4+ que desempenham um papel inflamatório tanto na UC quanto na DC, sendo capazes de produzir múltiplas citocinas, incluindo IL17, IL21 e IL22. O aumento da prevalência de células Th17 tem sido relatado no cólon de pacientes com DII quando comparado a indivíduos saudáveis, bem como níveis aumentados de IL17A no soro e na mucosa (27). Além disso, os modelos animais de colite com sulfato de *dextran* de sódio (DSS) e ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico (TNBS) mostraram níveis aumentados de IL21 e efeito protetor contra colite em camundongos IL21 $^{-/-}$  (28), sugerindo que esta citocina desempenha um papel importante no estágio inicial da doença.



Além do sistema imune, a barreira epitelial intestinal também exerce um papel essencial na homeostase do intestino. A camada de muco secretada pelas células epiteliais intestinais funciona como uma barreira física que separa a microbiota do intestino, possuindo diversas funções, entre elas a proteção contra danos físicos e químicos e a comunicação com a microbiota (29–33). O principal componente da barreira de muco são as mucinas, que são glicoproteínas de alto peso molecular (34). A composição desta barreira varia conforme o local do intestino, sendo no cólon composta de duas camadas: uma externa, mais porosa, que permite a passagem de bactérias comensais, e uma camada interna, com poros menores que, em indivíduos saudáveis, é impenetrável para a microbiota (30,33,35).

Quando ocorre uma modificação da composição da camada de muco, pode ocorrer o aumento da permeabilidade e diminuição da espessura da mesma, o que contribui para o início do desenvolvimento da inflamação intestinal (36,37). O papel da manutenção da camada de muco (e, por sua vez, na progressão da colite) já foi elucidado por diversos autores, entre eles Cornick e colaboradores (38). Nesse estudo, os pesquisadores trabalharam com camundongos modificados, cujas células caliciformes não secretavam muco, e observaram uma mortalidade de 100% nos animais que receberam DSS, enquanto que nos animais com células caliciformes normais a mortalidade foi de 20% ao final do protocolo. No modelo de colite ulcerativa induzida por DSS, a camada interna de muco torna-se mais porosa, permitindo a passagem de bactérias, contribuindo para a lesão do tecido e estabelecimento de uma resposta inflamatória (39). Assim, a quantificação de mucinas relacionadas às células caliciformes no cólon pode ser utilizada para elucidar a progressão ou recuperação da colite no epitélio intestinal.

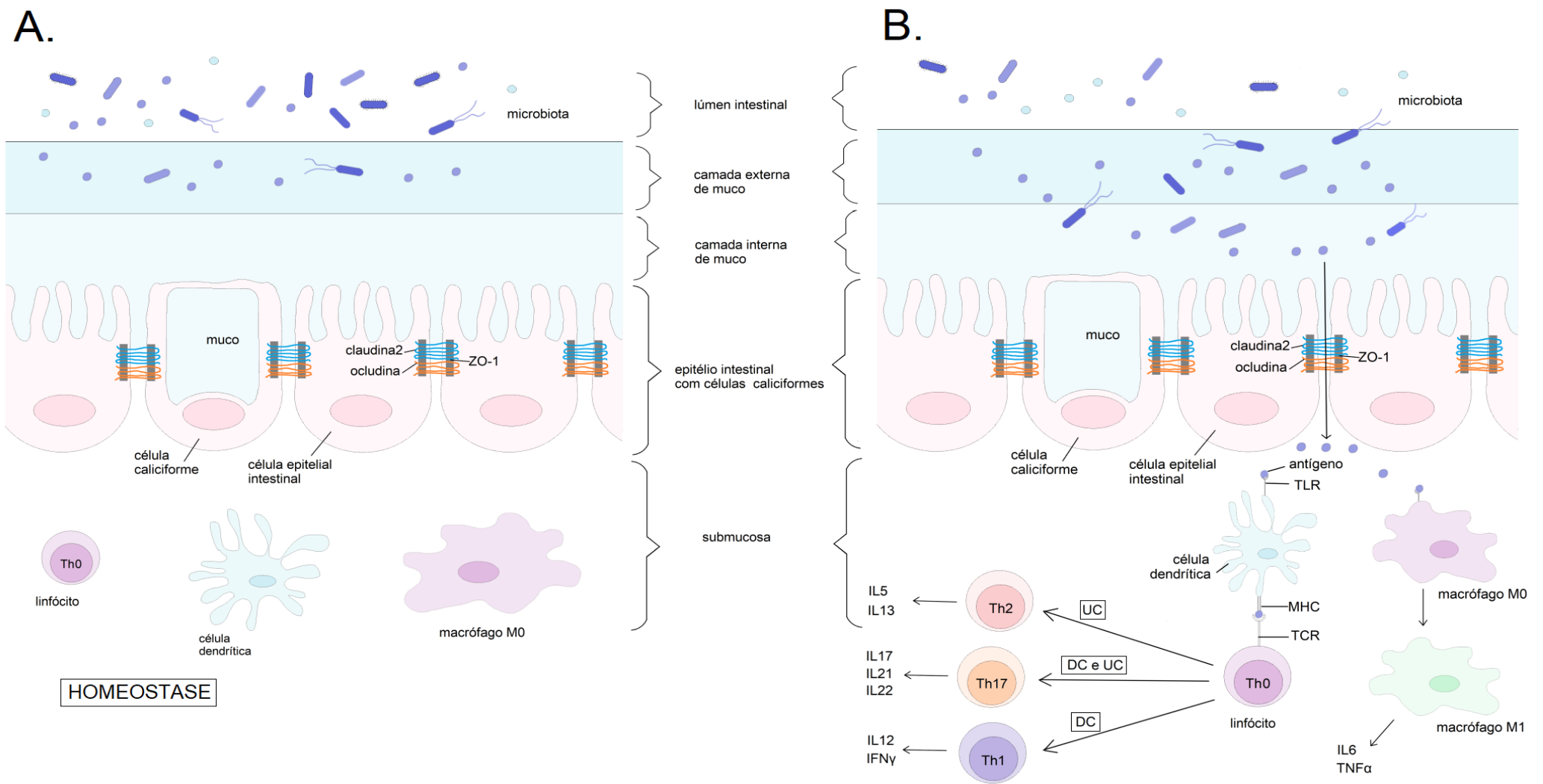
Quando o epitélio está intacto, a função da barreira intestinal é definida pela camada de muco e também pelas junções oclusivas entre as células epiteliais, que constituem um componente importante na manutenção desta barreira (40). As junções oclusivas são junções intercelulares que incluem proteínas transmembrana como as ocludinas, claudinas e zônula ocludens-1 (ZO-1), que ancoram o citoesqueleto de duas células vizinhas através dos filamentos de actina (25). A integridade destas junções é de extrema importância para determinar a permeabilidade paracelular, sendo que a diminuição da expressão de claudinas e ocludinas foi observada em modelos de DII induzida por DSS e por TNBS (41–43). Em ambas as DII, o rompimento da barreira epitelial intestinal é seguido pela translocação de antígenos de bactérias da microbiota do lúmen intestinal para a lâmina própria,

desencadeando um processo inflamatório característico destas doenças (31). O rompimento da barreira epitelial intestinal e a invasão por bactérias levam à morte das células epiteliais e destruição das criptas da mucosa intestinal, contribuindo para a perda de função do tecido do cólon (44).

### **1.1.2. Doença de Crohn**

A doença de Crohn (DC) é uma doença inflamatória crônica, caracterizada por lesões transmuralis e progressivas, que podem se apresentar em qualquer parte do TGI, da boca ao ânus. Entretanto, estas lesões são mais comuns no íleo terminal, na região ileocecal, no cólon e na região perianal (45). A gravidade e a localização da doença influenciam nos sintomas associados, o que gera um amplo espectro de apresentações clínicas. Geralmente, a DC manifesta-se como dor abdominal intermitente, diarreia, sangramento retal, febre e perda de peso. Para os pacientes com DC, o risco de cirurgia ao longo da vida é de cerca de 80%, mesmo quando utilizadas as terapias imunossupressoras disponíveis (46). No exame anatomopatológico, podem ser identificados granulomas, com distribuição descontínua ao longo do eixo longitudinal do tecido do TGI. Este processo inflamatório geralmente leva a danos teciduais irreversíveis na forma de estenose, fístulas intestinais ou abscessos intra-abdominais.

Além das semelhanças fisiopatológicas com a UC detalhados anteriormente, como o papel dos macrófagos, células Th17 e Treg na inflamação tecidual, na mucosa dos pacientes com DC observamos um desequilíbrio de alguns outros componentes do sistema imune. A alteração mais importante parece ser o aumento da atividade das células T do tipo Th1, com produção excessiva das citocinas IL12 e IFN $\gamma$ . Um estudo que analisou os subconjuntos de células T na DC revelou a presença de células Th1 e Th17, e as citocinas que aparentam ser mais importantes na patologia desta doença são o TNF $\alpha$ , a IL12 e a IL23. Assim, é possível que a DC se manifeste em consequência de um desequilíbrio imune em relação às células Th1 ou Th17 *versus* células Treg, resultando em níveis aumentados das citocinas pró-inflamatórias IL17, TNF $\alpha$ , IL12 e IFN $\gamma$ , após um gatilho ambiental em um paciente geneticamente predisposto (47) (Figura 1).



**Figura 1.** Barreira epitelial intestinal no cólon na homeostase e na inflamação. **A.** Cólon em homeostase. Quando a barreira epitelial está intacta, as células epiteliais intestinais e as células caliciformes estão unidas entre si pelas junções de oclusão, compostas pelas proteínas transmembrana claudina 2, ocludina e zônula *occludens* 1 (ZO-1). A microbiota se encontra restrita ao lúmen intestinal e à camada externa de muco. Na submucosa, estão presentes as células dendríticas, bem como macrófagos e linfócitos não-ativados *T-helper*0 (Th0). **B.** Cólon inflamado. Quando há alguma alteração na composição das camadas de muco ou dano à barreira epitelial, ocorre a translocação de antígenos da microbiota intestinal para a submucosa. A ligação destes antígenos aos receptores *Toll-like* (TLR) das células dendríticas e dos macrófagos desencadeia uma resposta imune no tecido. As células dendríticas apresentam os antígenos aos linfócitos, que podem se diferenciar em linfócitos Th1, Th2 ou Th17, que produzem citocinas para recrutar outras células imunes. Os macrófagos são ativados e se diferenciam em macrófagos M1, produtores de TNF $\alpha$  e IL6, contribuindo para o recrutamento de outras células imunes como neutrófilos e monócitos. **Legenda:** DC: doença de Crohn; UC: colite ulcerativa; TLR: Toll-like Receptors (receptor do tipo Toll); TCR: T Cell Receptor (receptor de célula T); ZO-1: zônula *occludens* 1. **Fonte:** o autor.

## 1.2. Sinalização colinérgica nas Doenças Inflamatórias Intestinais

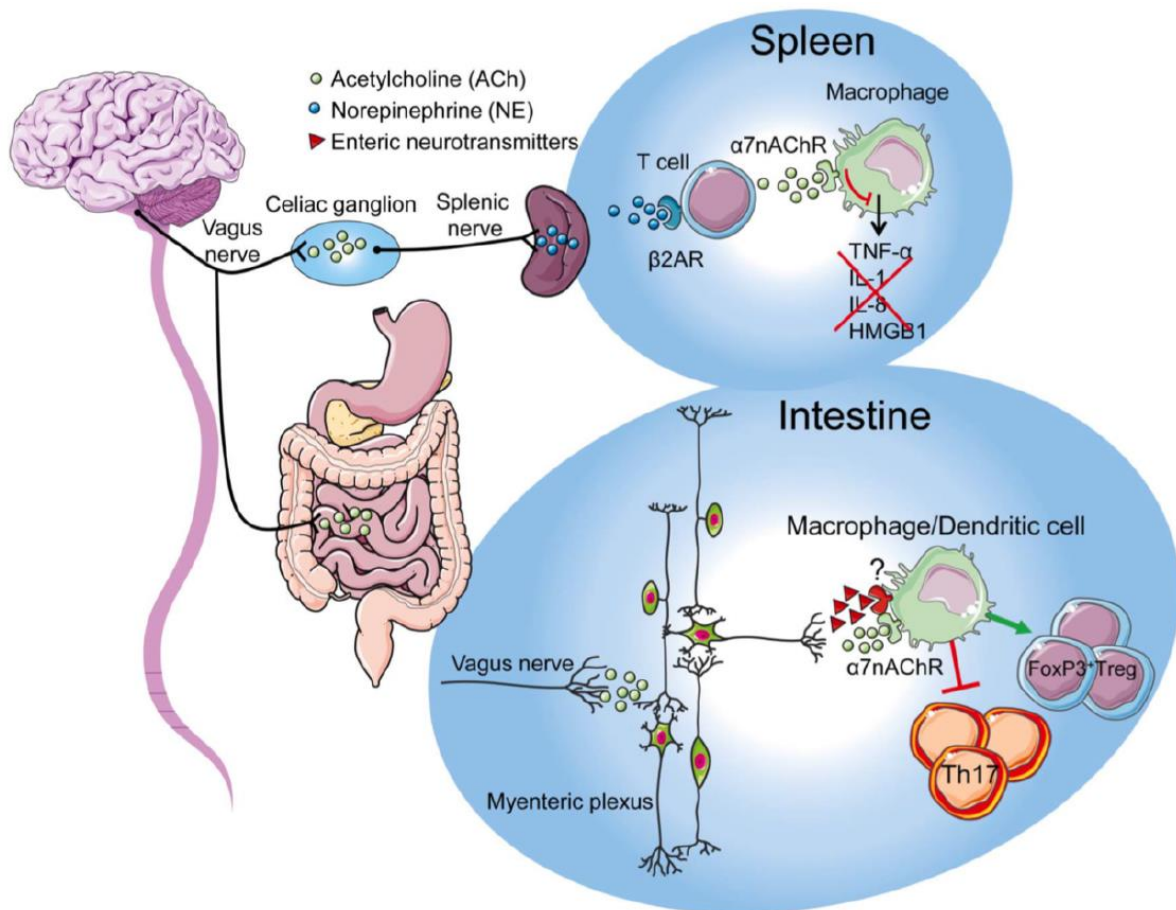
O nervo vago é o nervo craniano mais longo do sistema nervoso parassimpático e é um dos principais nervos que ligam o sistema nervoso central (SNC) ao restante do corpo. Este nervo é responsável pela manutenção de diversas funções fisiológicas, tais como a digestão, respostas imunes, secreção de hormônios e funções respiratórias (48,49). Seu potencial imunomodulador tem sido demonstrado através da estimulação do nervo vago (ENV) em modelos de inflamação. A ENV ativa uma via conhecida como via colinérgica anti-inflamatória (CAIP, do inglês *cholinergic anti-inflammatory pathway*). Alguns estudos demonstraram que a ativação da CAIP é capaz de diminuir significativamente a inflamação em diversas doenças, como a artrite reumatóide (50), lesão isquêmica renal (51) e DII (52). A ENV inibe a síntese de TNF $\alpha$  no fígado, no baço e no coração, sendo também capaz de diminuir a concentração desta citocina pró-inflamatória no soro em modelos de inflamação com LPS (53). No modelo animal de choque séptico, também foi observado que a ativação da CAIP diminuiu significativamente a produção de TNF $\alpha$  em macrófagos do baço, bem como a mortalidade do modelo (54).

Entretanto, os mecanismos pelos quais a CAIP modula a inflamação ainda são pouco conhecidos. Em modelos de inflamação *in vitro*, foi observado que macrófagos tratados com acetilcolina (ACh) produzem quantidades menores de citocinas pró-inflamatórias como TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 e IL18 (54,55). Os efeitos da ACh são mediados por dois tipos de receptores: os receptores nicotínicos (nAChRs) e os receptores muscarínicos (mAChRs). Os mAChRs são compostos por uma família de receptores acoplados à proteína G e são expressos por células imunes, nas quais sua ativação seletiva modula a produção de citocinas (56,57). Já os nAChRs são receptores ionotrópicos clássicos cujas subunidades são expressas de forma diferenciada nas células imunes, podendo corresponder ao seu estado de diferenciação celular (58). O receptor do sistema imune melhor caracterizado até o presente é o  $\alpha$ 7nAChR, expresso por macrófagos, e sua ativação está relacionada à diminuição da inflamação, através do estímulo à produção de citocinas anti-inflamatórias, à diminuição da atividade das células dendríticas e dos macrófagos e à inibição da diferenciação de células T (59). Em um modelo de endotoxemia com macrófagos deficientes para o receptor  $\alpha$ 7nAChR, a ENV foi ineficaz em diminuir os níveis de TNF $\alpha$ , indicando que este receptor é essencial para a diminuição da secreção desta citocina através da CAIP (60). Assim, a ACh pode inibir a ativação de

macrófagos no baço, diminuindo a inflamação de forma sistêmica. Da mesma forma, a remoção cirúrgica do baço (esplenectomia) inibe os benefícios terapêuticos da ENV em modelos de endotoxemia (61), lesão de isquemia e reperfusão renal (51), nefropatia (62) e colite (52), demonstrando a importância deste órgão na CAIP.

Contudo, a fonte de ACh para a inibição da ativação de macrófagos no baço possivelmente não seja apenas o nervo vago, tendo em vista que células imunes também são capazes de produzir e secretar ACh. Os linfócitos T CD4+ presentes no baço possuem a enzima colina acetil transferase (ChAT), sendo capazes de produzir e secretar ACh (63). Além disso, o nervo vago interage diretamente com neurônios simpáticos que inervam o baço no gânglio celíaco (64), logo, a ENV levaria a uma ativação da inervação simpática e consequente liberação de norepinefrina (NE) no baço. Os linfócitos T CD4+ ChAT+ possuem receptores do tipo  $\beta_2$  adrenérgicos, que são ativados pela NE e estimulam a produção e secreção de ACh por estas células. A ACh liberada pelos linfócitos T CD4+ ChAT+ se liga ao receptor  $\alpha_7$ nAChR dos macrófagos, inibindo a ativação destas células e inibindo a produção de TNF $\alpha$  (50,65) (Figura 2).

No cólon, a imunidade intestinal pode ser controlada tanto por inervação extrínseca (do SNC e sistema nervoso periférico, através de vias aferentes do nervo vago e de outros neurônios periféricos), quando intrínseca, através dos neurônios do sistema nervoso entérico (SNE), localizados dentro do tecido intestinal. Os neurônios do SNE, principalmente os do plexo mioentérico, são 70% colinérgicos e foram recentemente identificados como importantes guardiões da homeostase imunológica no TGI (66). Em modelos de inflamação e íleo pós-operatório (que consiste em uma disfunção da motilidade intestinal após uma cirurgia), a interação entre os neurônios do SNE e os macrófagos da camada muscular é aparentemente essencial para os efeitos terapêuticos da ENV – quando ativados, estes neurônios liberam ACh, que inibe a ativação dos macrófagos, levando a uma diminuição da liberação de TNF $\alpha$  e IL6 (67) (Figura 2).



**Figura 2.** Representação da via anti-inflamatória colinérgica (CAIP). A estimulação do nervo vago ativa a CAIP, que estimula a secreção de acetilcolina (ACh) no baço e no intestino. Nestes órgãos, a ACh se liga aos macrófagos que possuem o receptor  $\alpha 7nAChR$ , inibindo sua ativação e secreção de citocinas pró-inflamatórias. **Fonte:** Matteoli e colaboradores (2013) (68).

Além da ENV, também estão sendo estudados os efeitos terapêuticos da estimulação dos nervos sacrais (ENS), que controlam a motilidade intestinal, dentre outras funções. A ENS já é usada atualmente para tratar constipação e incontinência fecal (69), entretanto, estudos recentes reportaram que esta estimulação pode apresentar efeitos anti-inflamatórios similares à ENV. Em um modelo de colite por TNBS, a ENS foi capaz de diminuir a inflamação no cólon, diminuindo o índice de atividade da doença (IAD), a perda de peso, o escore histológico, a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e os níveis das citocinas inflamatórias TNF $\alpha$  e IL6. Além disso, a ENS também aumentou os níveis de ACh no cólon, sugerindo que estes efeitos se devem também à ativação da CAIP (70).

Outro estudo comparou a ENS e a ENV no modelo de colite por TNBS e demonstrou que ambos os tratamentos foram capazes de diminuir a inflamação, diminuindo o IAD, os escores

macroscópicos, a atividade da enzima MPO e a concentração das citocinas IL6, IL17A e TNF $\alpha$  (71). A ENS também apresentou efeito terapêutico em modelos de colite por DSS, diminuindo o IAD, a atividade da enzima MPO, os níveis de TNF $\alpha$  no cólon e o escore histológico, além de aumentar os níveis de ACh no cólon (71,72). A administração de GTS-21, um agonista do receptor  $\alpha 7nAChR$ , também foi efetiva na diminuição da inflamação na colite induzida por DSS, diminuindo o IAD, o escore histológico e a ativação da via inflamatória do NF $\kappa$ B no cólon (73). Desta forma, a via anti-inflamatória colinérgica (CAIP) se apresenta como uma alternativa terapêutica em potencial para o tratamento das DII, a ser mais amplamente explorada.

### **1.3. Células estromais mesenquimais e terapia celular**

As células estromais mesenquimais (MSC) são células multipotentes, capazes de se diferenciar em células de diversos tecidos (74). Na cultura celular, se assemelham a fibroblastos e crescem aderidas à superfície plástica. As MSCs podem ser originadas de diversos tecidos, sendo os mais comuns o tecido adiposo, a medula óssea e o cordão umbilical. Experimentalmente, após a extração dos tecidos de origem, estas células devem ser caracterizadas por meio da diferenciação *in vitro* em adipócitos, condrócitos e osteócitos, e por meio da verificação de marcadores de superfície na citometria de fluxo (75). Para serem consideradas MSCs, as células necessitam apresentar os marcadores de superfície CD73, CD90 e CD105, e serem negativas para CD14, CD34, CD45 e sistema de antígeno leucocitário humano (HLA – do inglês “human leucocyte antigen”) (76).

As MSCs têm sido amplamente estudadas devido a suas propriedades imunomoduladoras. Estas células são capazes de migrar para tecidos inflamados após infusão *in vivo* (processo conhecido como *homing*), onde atuam modulando a inflamação e a produção de citocinas (77). As MSCs apresentam alta capacidade imunossupressora e interagem com células do sistema imune inato e adaptativo, levando à modulação de diversas funções efetoras (78). Além disto, devido ao fato de apresentarem baixíssimos níveis de expressão de HLA, as MSCs possuem baixa imunogenicidade, favorecendo o transplante alogênico (a partir de um doador, ao invés de utilizar células do próprio paciente) destas células como forma de terapia para doenças inflamatórias, com baixo risco de rejeição imunológica.

O efeito terapêutico das MSCs tem sido observado em diversos modelos de doenças, como doença do enxerto *versus* hospedeiro (79), lesão isquêmica renal (80), artrite reumatoide (81), lúpus eritematoso (82), além de doenças neurodegenerativas (83) e respiratórias (84). As MSCs também podem promover a regeneração do fígado, através da diminuição da infiltração de células imunes no órgão (85). Em modelos de colite ulcerativa, diversos autores demonstraram que o tratamento com as MSCs resultou em uma melhora clínica e histopatológica da colite após a infusão das MSC, como diminuição da inflamação e aumento da sobrevida (86–93).

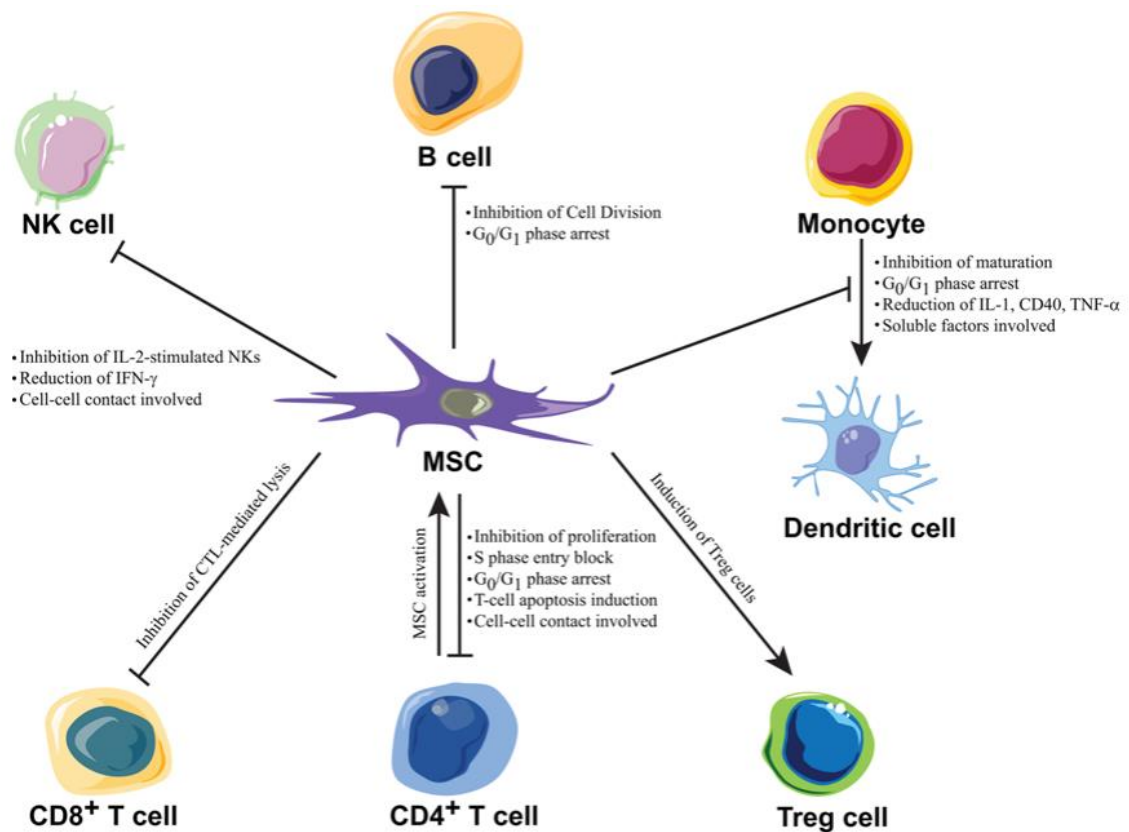
Quando administradas por via intravenosa, após migrarem para o local de inflamação, as MSCs irão interagir com as células imunes do organismo. As MSCs são capazes de interagir com diversas células imunes, incluindo linfócitos T e B, células natural killer (NK), células dendríticas e macrófagos, portanto, podem modular tanto a imunidade inata quanto a adaptativa (Figura 3). Esta interação pode ocorrer por meio da secreção de fatores solúveis (que atuam de forma parácrina) ou por meio da comunicação célula-célula, através de proteínas de superfície da membrana celular (87,94,95). Estudos de biodistribuição de células mostraram que após 24h nenhuma MSC pode ser detectada *in vivo*, o que sugere que as MSCs provavelmente transmitem suas propriedades imunomoduladoras para as células residentes (77,96).

Através do contato célula-célula, as MSCs podem ser fagocitadas por monócitos e macrófagos, influenciando no fenótipo destas células. Já foi demonstrado que a fagocitose de MSCs mortas induz uma diminuição do marcador de superfície CD86 e um aumento de CD206 em macrófagos *in vitro*, o que poderia indicar uma mudança fenotípica dos macrófagos para um perfil regulatório (ao invés do perfil clássico, pró-inflamatório) (97). No pulmão, as MSCs induzem um perfil regulatório em monócitos, após serem fagocitadas por estas células (98).

O contato célula-célula parece ser crucial para a imunomodulação de linfócitos pelas MSCs. Em um estudo *in vitro*, MSCs tratadas com IFN $\gamma$  apresentaram um aumento de expressão das proteínas de adesão ICAM-1 (*intercelular adhesion molecule-1*) e VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), o que as tornou mais aderentes aos linfócitos T, inibindo sua proliferação. Esta inibição no crescimento de linfócitos não foi observada no co-cultivo destas células com MSCs deficientes de ICAM-1 (ICAM-1  $-/-$  MSC), indicando a importância destas moléculas de adesão na imunomodulação dos linfócitos T (99). O co-cultivo de MSCs com células T induz a diferenciação destas células em um



perfil regulatório FOXP3+ através da via Notch1, que é ativada através de contato célula-célula das MSCs com os linfócitos. A inibição desta via reduziu a proporção de células T regulatórias *in vitro* (100). Em outro estudo, a depleção de galectina-1, uma proteína expressa na superfície celular das MSCs, resultou em uma diminuição significativa das propriedades imunomodulatórias destas células, refletida na proliferação de linfócitos T CD4+ e CD8+ (101).



**Figura 3.** Efeito modulador das MSCs nas células imunes. Os efeitos imunomoduladores das MSCs incluem a inibição da proliferação de linfócitos B, T CD4+ e T CD8+, a indução de linfócitos T regulatórios, inibição da maturação de monócitos e a inibição da função das células NK. **Legenda:** CTL: linfócito T citotóxico (CD8+). IFN $\gamma$ : interferon  $\gamma$ . MSC: célula estromal mesenquimal. NK: célula natural killer. TNF $\alpha$ : fator de necrose tumoral  $\alpha$ . Treg: linfócito T regulatório. **Fonte:** Yi e colaboradores, 2012 (102)

As MSCs também podem exercer efeito imunomodulador através da secreção de diversos fatores solúveis, como o fator de transformação de crescimento  $\beta$  1 (TGF $\beta$ 1), a citocina IL6, a prostaglandina E2 (PGE2) e a enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), dentre outros (103). O co-cultivo de MSCs com macrófagos é capaz de induzir a polarização destas células para o fenótipo M2,

e tal processo parece ser mediado pela secreção de TGF- $\beta$  pelas MSCs, dentre outros fatores (80,104,105). A secreção de PGE2 e de IL6 pelas MSCs pode inibir a maturação das células dendríticas a partir de monócitos *in vitro* (106). A PGE2, juntamente com a enzimaIDO, induz a polarização de macrófagos a partir de um fenótipo inflamatório M1 para um fenótipo anti-inflamatório M2, aumentando a produção da citocina anti-inflamatória IL10 por estas células (107,108). PGE2 e IDO também foram capazes de inibir a ativação de células NK *in vitro*, diminuindo sua proliferação e sua secreção de INF $\gamma$  (109). Por fim, o co-cultivo de MSCs e linfócitos B através do ensaio de *transwell* (no qual as células ficam fisicamente separadas, sem contato de membrana), demonstrou que fatores solúveis secretados pelas MSCs são capazes de inibir a proliferação dos linfócitos B (110).

#### **1.4. Terapias derivadas de células estromais mesenquimais: alternativas livres de células**

Apesar de os efeitos terapêuticos do transplante das MSCs íntegras nas doenças inflamatórias terem sido amplamente demonstrados, também foi observado que a maior parte das MSCs administradas ficam presas nos capilares pulmonares, devido a seu grande tamanho celular (77). Além disso, a administração destas células íntegras pode apresentar riscos, sendo o principal embolia pulmonar que pode ser seguida de morte (111). Desta forma, alternativas que utilizem os benefícios terapêuticos das MSCs e minimizem estes riscos associados estão sendo estudadas.

Como alternativa à terapia celular utilizando a MSC íntegra, é possível realizar o transplante do meio condicionado das MSC (CM), contendo os fatores solúveis secretados por estas células, ou das partículas de membrana de MSC (MP), contendo as proteínas e enzimas de membrana. O meio condicionado de MSC (CM) consiste no meio de cultivo destas células contendo os fatores solúveis responsáveis pela ação parácrina das MSC em células imunes no organismo. Já as partículas de membrana de MSC (MP) são pedaços de membrana celular das MP contendo proteínas e enzimas de membrana, gerados a partir da lise das MSC. Estas partículas de membrana são bastante pequenas, medindo cerca de 200nm (112), portanto, possuem dimensão otimizada para transplante pela via intravenosa. Considerando que os capilares pulmonares medem cerca de 8000nm (113), a utilização das MP possibilitaria uma melhor biodistribuição desta terapia após o transplante.

Diversos estudos têm reportado o efeito terapêutico dos fatores solúveis secretados pelas MSCs contidos no CM (conforme descrito no tópico anterior). Quanto às MP, foi demonstrado que estas partículas de membrana possuem efeitos imunomoduladores apenas *in vitro*. As MP induzem a apoptose de monócitos pró-inflamatórios, bem como a expressão de genes anti-inflamatórios por estas células (112). As MP também são internalizadas por células endoteliais da linhagem HUVEC (do inglês *human umbilical vein endothelial cells*) e contribuem para diminuir a permeabilidade endotelial, desta forma, diminuindo a migração transendotelial de monócitos no ensaio *in vitro* (114,115). Do nosso conhecimento, o presente trabalho é o primeiro a avaliar o efeito das MP em modelos de inflamação *in vivo*.

## **2. HIPÓTESE**

A ativação da via colinérgica anti-inflamatória, assim como o transplante intravenoso das partículas de membrana e do meio condicionado de células estromais mesenquimais são capazes de melhorar os sinais clínicos das doenças inflamatórias intestinais.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito imunomodulador da via colinérgica através de revisão da literatura, e das partículas de membrana e do meio condicionado de células estromais mesenquimais em modelos murinos de doenças inflamatórias intestinais.

#### 3.2. Objetivos específicos

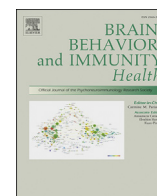
- Investigar o papel da sinalização colinérgica na modulação de doenças inflamatórias intestinais (análise da literatura)
- Induzir a colite ulcerativa e tratamento com CM, MP ou MSCs íntegras (modelo animal)
- Avaliar os níveis das citocinas IL4, IL5, IL6, IL12p70, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  no cólon utilizando kit Luminex
- Avaliar a expressão das proteínas de barreira epitelial intestinal claudina 2 e ocludina no cólon por RT-qPCR
- Avaliar a inflamação em nível tecidual no cólon, utilizando lâminas histológicas de hematoxilina e eosina
- Quantificar o número de linfócitos CD3+ infiltrados no cólon por imuno-histoquímica
- Quantificar o número de células apoptóticas no cólon por imuno-histoquímica
- Quantificar as mucinas associadas às células caliciformes no cólon através de coloração de *alcian blue*

**4. CAPÍTULO I: Cholinergic immunomodulation in inflammatory bowel diseases (artigo de revisão)**

**Artigo completo em inglês**

Submetido ao periódico *Brain, Behaviour and Immunity – Health*

Status: Publicado (2021)



## Cholinergic immunomodulation in inflammatory bowel diseases

Michele A. Serafini<sup>a,c</sup>, Ana H. Paz<sup>b,c</sup>, Natalia S. Nunes<sup>d,\*</sup>



<sup>a</sup> Biological Sciences, Physiology Graduate Program, Federal University of Rio Grande do Sul, 90050170, Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup> Morphological Sciences Department, Basic Health Sciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, 90050170, Porto Alegre, Brazil

<sup>c</sup> Cells, Tissue and Genes Laboratory, Experimental Research Center, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, 90035903, Porto Alegre, Brazil

<sup>d</sup> Experimental Transplantation Immunotherapy Branch, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, 20852, Bethesda, MD, USA

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Cholinergic signaling  
Inflammatory bowel diseases  
Macrophage  
T cell  
Immunomodulation  
Acetylcholine  
Vagus nerve  
Intestinal immunity  
 $\alpha$ -7-Nicotinic-acetylcholine receptor

### ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic intestinal disorders characterized by dysregulated immune responses to resident microbiota in genetically susceptible hosts. The activation of the cholinergic system has been proposed for the treatment of IBD patients according to its potential anti-inflammatory effect in vivo. The  $\alpha$ -7-nicotinic-acetylcholine receptor ( $\alpha$ 7nAChR) is involved in the inhibition of inflammatory processes, modulating the production of cytokines, suppressing dendritic cells and macrophage activity, leading to the suppression of T cells. In this review, we address the most recent studies and clinical trials concerning cholinergic signaling and its therapeutic potential for inflammatory bowel diseases.

### 1. Introduction

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic intestinal disorders of unknown etiology, with rising incidence and prevalence, especially in industrialized countries. Current treatments for IBD fail to promote sustained disease remission, rendering the development of new therapeutic strategies a priority. In this scenario, recent research on the cholinergic signaling in inflammatory diseases has shed light onto new therapeutic possibilities. Vagal nerve stimulation (VNS) has been reported to lower disease activity in diverse inflammatory diseases in vivo. The main mechanism of action is likely the activation of  $\alpha$ -7-nicotinic-acetylcholine receptor ( $\alpha$ 7nAChR) on immune cells by acetylcholine (ACh). Thus, the activation of cholinergic signaling has been proposed for the treatment of IBD.

In the present issue, we address the most recent work concerning cholinergic signaling as a potential therapy for inflammatory diseases, emphasizing intestinal immunity and clinical studies in IBD patients.

### 2. Inflammatory bowel diseases

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic intestinal inflammatory disorders characterized by dysregulated immune responses to enteric resident microbiota in genetically susceptible hosts, and affect

approximately 3 million people in the United States (Dahlhamer et al., 2016; Oka et al., 2020). Inflammation in IBD is presented in a remitting and relapsing pattern, where the major forms are known as ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD).

The incidence and prevalence of IBD have increased in recent years, especially in industrialized countries (Moum et al., 2014). Differences in diagnostic resources and investments into healthcare indubitably affect the diagnosis of IBD, which may explain why low income countries report lower IBD incidence rates. Interestingly, a global study observed an association between increasing latitude and IBD incidence, compatible with the previously reported relationship between increased latitude and decreased levels of serum D vitamin induced by UV radiation (Piovani et al., 2019). Since individuals with low levels of D vitamin show an increased risk of developing IBD, and D vitamin synthesis is consequent to UV-B exposure (which is highly sensitive to the scattering caused by air particulate and pollutants), this might justify the increased risk of IBD in individuals living in urban settings in highly industrialized countries (Ananthakrishnan et al., 2012; Kimlin et al., 2007; MacLaughlin et al., 1982; Ng et al., 2019; Piovani et al., 2019). Accordingly, epidemiologic studies in Brazil reported that the most developed, higher economy activity state also presented the highest IBD incidence rate, comparable to European countries such as Portugal and Ireland (Gasparini et al., 2018; Zaltman et al., 2021). Nevertheless, the incidence of IBD is increasing in

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [serafini.mich@gmail.com](mailto:serafini.mich@gmail.com) (M.A. Serafini), [anahpaz@gmail.com](mailto:anahpaz@gmail.com) (A.H. Paz), [natalia.schneidernunes@nih.gov](mailto:natalia.schneidernunes@nih.gov) (N.S. Nunes).

<https://doi.org/10.1016/j.bbih.2021.100401>

Received 13 August 2021; Received in revised form 29 November 2021; Accepted 4 December 2021

Available online 11 December 2021

2666-3546/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

several low income countries throughout Latin America and the Caribbean (Kotze et al., 2020).

Although the etiology of IBD is largely unknown, recent evidence suggests the role of genetic factors, gut microbiome and immune dysregulation in triggering and sustaining the chronic inflammatory response in these diseases (Ghouri et al., 2020; Longo et al., 2020). The combination of genetic and environmental factors in the context of host-microbe interactions appears to trigger IBD-initiating events (Amoroso et al., 2020). Diet alters the microbiome and modifies intestinal immune response, thus, it could play a role in the pathogenesis of IBD. The adoption of a western diet, namely increased intake of ultra-processed food, refined sugars and dietary fats and decreased intake of fibers, have been suggested as potential risk factors for IBD (Narula et al., 2021). Accordingly, the adherence to this diet is associated to higher levels of interleukin (IL) 6, C-reactive protein and TNF- $\alpha$  (Bujtor et al., 2021). Food allergies may also contribute to the development of bowel disorders. An abnormal immune response to food allergens may promote the activation of the gastrointestinal mucosal immune system, leading to increased intestinal permeability and several disorders, such as irritable bowel syndrome and eosinophilic colitis (Bobrus-Chociej et al., 2018; Kuźmiński et al., 2020; Park et al., 2006). Current treatments for IBD mainly aim to suppress the enhanced immune response by the use of steroids, thiopurines, biologic drugs and molecules blocking the homing of immune cells in the inflamed gut (Argollo et al., 2017; Lim et al., 2018). Nevertheless, these treatments may cause adverse effects, besides not being able to promote sustained disease remission. Additionally, several patients do not respond to the existing treatments, making it imperative to develop new therapeutic strategies (Peyrin-Biroulet et al., 2015).

### 2.1. Ulcerative colitis

Ulcerative colitis (UC) is a lifelong disease arising from an interaction between genetic and environmental factors. The initial presentation of UC is characterized by an inflamed rectum and the condition may be presented at any time and at all ages (Rubin et al., 2019). Multiple factors, such as genetic background, environmental and luminal factors, and mucosal immune dysregulation, have been suggested to contribute to UC pathogenesis (Kobayashi et al., 2020).

The mucosal immune system in the gut is tolerant towards symbiotic bacteria and defends against pathogen invasion by initiating immune responses against exogenous antigens. The innate immune system in the gut includes the intestinal epithelial cells (IECs) that express Toll-like receptors (TLRs) with dual-immune functions, macrophages, and dendritic cells (DCs) in the intestinal lamina propria, exerting immunomodulatory effects during inflammatory responses (Zhang et al., 2020). In UC, aberrant immunological responses in the gut can affect the epithelial barrier and increase intestinal tissue permeability for novel antigens, further, leading to chronic inflammation (Wéra et al., 2016). Both innate and adaptive immunity have been suggested in maintaining intestinal homeostasis and various inflammatory immune cells are involved in this process, such as neutrophils, cluster of differentiation (CD)4+ T cells, and macrophages. For instance, neutrophil migration into the colonic mucosa is a hallmark of inflammation, being the extent of neutrophil infiltration correlated with disease severity (Bressenot et al., 2015).

Macrophages are an important component of the innate immune systems, maintaining tissue homeostasis by regulating apoptosis and the production of growth factors. These cells exhibit plasticity and functional diversity; being able to differentiate into M1 or M2 subtypes. Under the conditions of infection or tissue damage, including UC, the circulating monocytes are recruited into the inflamed sites and differentiate into macrophages. If these classical activated macrophages (M1 subtype) cannot be controlled effectively, they aggravate the disease progression promoting inflammation and anti-microbial activity. Differently, M2 macrophages exert anti-inflammatory activities and play a role in wound

healing and fibrosis. Several signaling pathways are involved in regulating the secretion of inflammatory cytokines and inflammatory mediators by macrophages, interacting amongst themselves to regulate inflammatory microenvironments (Zhang et al., 2020).

Adaptive immune cells are also involved in UC disease pathophysiology, specifically T-helper (Th)2 CD4<sup>+</sup> cells. Th2 cells are immune effectors that play a crucial role in the defense against parasites and in modulating allergic reactions through the secretion of IL4, IL5, and IL13 (Giuffrida et al., 2018). The transcription factor GATA binding protein 3 (GATA-3) is the most dominant regulator of Th2 cell differentiation (Zheng et al., 1997), and its expression is seen in higher levels in colonic tissue from UC patients compared to ileal CD patients or healthy individuals, as well as in colonic tissue from UC patients with active disease compared to UC patients with inactive disease (Popp et al., 2017). In UC, large cohort studies revealed that mRNA levels of IL5 and IL13 are particularly increased in macroscopically inflamed tissue compared to uninfamed tissue (Nemeth et al., 2017; Rosen et al., 2017). Additionally, IL13 has been reported to deregulate epithelial tight junctions and possibly to promote apoptosis (Heller et al., 2005). Excessive production of IL13 in UC could lead to a toxic effect on colonic epithelial cells and the epithelial barrier, increasing disease activity.

Furthermore, imbalance between Treg and Th17 cells are implicated in both CD and UC disease progressions. Tregs are CD4<sup>+</sup> T cells that express the high-affinity IL2 receptor  $\alpha$ -chain (CD25) and transcription factor Forkhead box P-3 (Foxp3), presenting a crucial anti-inflammatory and immunoregulatory role in IBD (Clough et al., 2020). On the other hand, Th17 cells are CD4<sup>+</sup> pro-inflammatory T cells that play a pathogenic role in both UC and CD, being able to produce multiple cytokines, including IL17, IL21, and IL22. The increased prevalence of Th17 cells has been reported in the colon of IBD patients, when compared to healthy individuals, as well as increased IL17A levels in serum and mucosa (Fujino et al., 2003). In addition, dextran sodium sulphate (DSS) and 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) animal models of colitis have shown elevation of IL 21 production and protection from colitis in IL21<sup>-/-</sup> mice (De Souza et al., 2016), suggesting Th17 cells play an important role in the disease onset.

### 2.2. Crohn's disease

Crohn's disease (CD) is a chronic, progressive, and transmural granulomatous inflammatory disorder that can involve any part of the gastrointestinal tract from mouth to anus, predominantly the terminal ileum, ileocecal region, colon, and perianal region (Farraye et al., 2017). Patients with CD experience periods of flare and remission during their disease course. Disease severity and location dictate the associated symptoms, leading to a wide spectrum of clinical presentations. Usually, it is manifested as intermittent abdominal pain, diarrhea, hematochezia, fever, and weight loss. In CD patients, the lifetime risk of surgery still approaches 80% in spite of the increasing use of anti-TNF and immunosuppressive therapies (Wolford et al., 2020). On pathology examination, granulomas may be identified on biopsies, with a discontinuous distribution along the longitudinal axis. This inflammatory process often leads to irreversible tissue damage in the form of intestinal stenosis or fistulas, inflammatory masses, or intra-abdominal abscesses.

Apart from pathophysiological similarities to UC disease, such as the role of macrophages, Th17 and Treg cells in tissue inflammation, a dysregulation of various components of the immune system can be observed in CD patients' mucosa. The most pronounced alteration appears to be the hyperactivity of T cells with excessive production of cytokines IL12 and IFN $\gamma$ , promoting a Th1 lymphocytic phenotype. Further analysis of T cell subsets has revealed the presence of Th1 and Th17 cells in CD, whereas the cytokines considered more involved are TNF, IL12, and IL23. Accordingly, CD is thought to be a consequence of an immune imbalance towards Th1 or Th17 versus and Treg cells, resulting in increased levels of pro-inflammatory cytokines IL17, TNF $\alpha$ , and IFN $\gamma$  due an environmental trigger in a genetically predisposed patient (Gomes et al., 2018).



### 3. Vagus nerve and cholinergic immunomodulation

The vagus nerve (VN) is the longest cranial nerve in the parasympathetic nervous system and links the central nervous system (CNS) to the body. Through innervation of major visceral organs, the VN maintains several physiological mechanisms, including digestion, immune responses, hormone secretion, and respiratory function (Bonaz et al., 2017; Murray et al., 2018). The importance of the VN in regulating anti-inflammatory responses has been experimentally demonstrated utilizing vagotomy and vagal nerve stimulation (VNS) techniques during acute inflammation. Research on the cholinergic anti-inflammatory pathway (CAIP) has shown macrophages are effectively deactivated when exposed to acetylcholine (ACh) through significant reduction of cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF), IL1 $\beta$ , IL6, and IL18 in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human macrophage in vitro (Borovikova et al., 2000; Tracey, 2002). Borovikova and collaborators (2000) also demonstrated that VNS significantly reduced TNF $\alpha$  production by splenic macrophages and diminished mortality in a mouse model of septic shock.

The effects of ACh are mediated by two pharmacologically distinct families of receptors: nicotinic and muscarinic ACh receptors (nAChRs and mAChRs). The mAChRs comprise a family of five related G protein-coupled receptors expressed by immune cells, in which selective activation modulates the production of pro-inflammatory cytokines (Fujii et al., 2003; Kruse et al., 2014). In contrast, nAChRs are classical ionotropic receptors which subunits are differently expressed in the immune cells; in some cases, correlating to their differentiation state (Gatta et al., 2020). The  $\alpha$ 7nAChR is the best characterized nicotinic receptor subtype in the immune system and is mainly involved in the inhibition of inflammation, modulating the production of anti-inflammatory cytokines, suppressing dendritic cells and macrophage activity and T cell differentiation (Kawashima et al., 2015).

Furthermore, CAIP experimental activation by direct electrical stimulation of the efferent VN inhibits TNF synthesis in liver, spleen, and heart, attenuating TNF serum concentrations during endotoxemia by LPS, whereas surgical or chemical vagotomy rendered animals sensitive to TNF release and shock (Bernik et al., 2002). Additionally, VNS has been demonstrated to significantly reduce inflammation in a series of conditions, including rheumatoid arthritis (Koopman et al., 2016), ischemia reperfusion injury (Inoue et al., 2016) and IBD (Ji et al., 2014).

Despite these advances, the precise neural circuitry and mechanisms of action responsible for immune inhibition remain contested. Macrophages presenting with  $\alpha$ 7nAChR deficiency have rendered VN ineffective as a physiological pathway to inhibit TNF $\alpha$  release, indicating that  $\alpha$ 7nAChR is essential for VN regulation of acute TNF $\alpha$  release during systemic inflammatory response to endotoxemia (Wang et al., 2003). Thus, ACh released from VN endings, or perhaps from other sources, can specifically inhibit macrophage activation.

Although VNS can modulate the peripheral inflammation, it may control ACh production directly by the immune cells in the spleen or in other lymphoid organs through adrenergic stimulation (Carnevale et al., 2016; Rosas-Ballina et al., 2011). Additionally, considering that ACh has an extremely short half-life in vivo as a consequence of the ubiquitous distribution of its hydrolytic enzymes (Soreq, 2001), it is plausible to conclude that the cholinergic source of ACh must be very close to the site of action (paracrine function).

It has been demonstrated that immune cells are able to produce ACh and respond to cholinergic stimuli. In 1982, Tucek (Tucek, 1982) reported that ACh is synthesized by choline acetyltransferase (ChAT) in the peripheral tissues of the rat. The expression of ChAT mRNA was detected only in T cell lines, and the ACh content correlated well with ChAT activity, suggesting ChAT is responsible for ACh synthesis in lymphocytes (Kawashima et al., 2015). Moreover, experiments have suggested that VN directly interacts with the sympathetic neurons innervating the spleen in prevertebral ganglia, including the celiac ganglia (Berthoud et al., 1996). VN fibers terminate in the celiac ganglia, where neural cell bodies project

axons to the splenic nerve. Therefore, activation of vagal efferent signaling by VNS results in activation of the sympathetic innervation and release of norepinephrine (NE) in the spleen. Accordingly, splenectomy reverses VNS protective effects in models of endotoxemia (Huston et al., 2006), nephropathy (Uni et al., 2020), kidney ischemia-reperfusion injury (Inoue et al., 2016) and colitis (Ji et al., 2014) (Fig. 1a).

Protection afforded during septic shock by VNS requires activation of a specialized subset of splenic CD4<sup>+</sup> T-cells that express ChAT (ChAT + T cells), synthesize ACh, and serve as a non-neuronal source of ACh in the spleen (Rosas-Ballina et al., 2011). The release of ACh from ChAT + T-cells is a critical step in regulating inflammation and occurs following the activation of  $\beta$ 2 adrenergic receptors on ChAT + CD4<sup>+</sup> T-cells by NE. ACh released from these T-cells binds to  $\alpha$ 7nAChR expressed on macrophages, resulting in inhibition of activation and TNF $\alpha$  production (Koopman et al., 2016) (Fig. 1b).

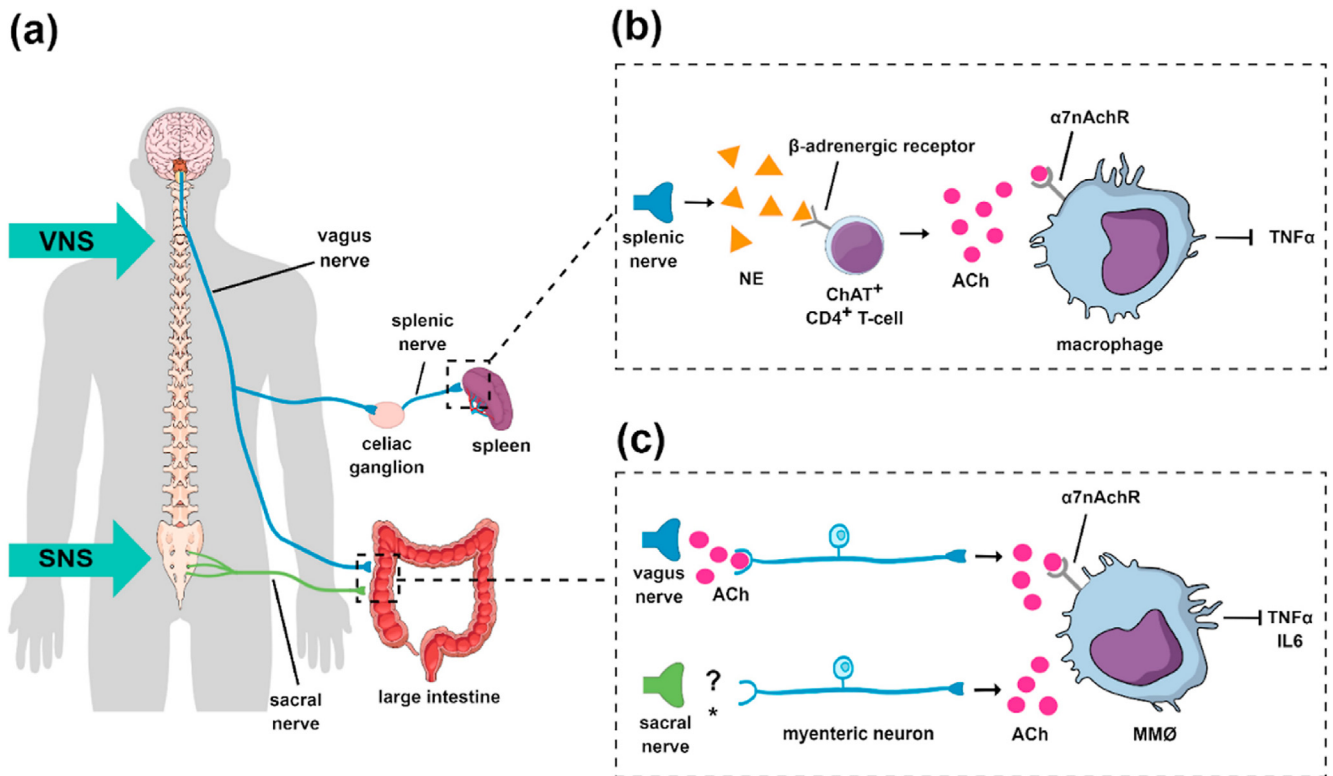
### 4. Cholinergic signaling and intestinal immunity

Gastrointestinal major functions, such as motility, secretion, and vasoregulation, are controlled both by the CNS through vagal afferent and efferent neurons, and by diverse peripheral nervous system (PNS) neurons located either outside of the gut or within the gut tissue, where they form the enteric nervous system (ENS) (Kulkarni et al., 2021). The ENS consists of small aggregations of nerve cells (enteric ganglia) that innervate effector tissues, such as the intestinal muscular layer, blood vessels, and endocrine cells (Brinkman et al., 2019).

Neuromodulation of intestinal immunity is regulated both by intrinsic (ENS) and extrinsic (CNS and PNS) innervation. Although the ENS receives ample input by the CNS by means of sympathetic and parasympathetic innervation, it can operate autonomously. Enteric neurons, in particular those residing in the myenteric plexus (MP), are 70% cholinergic and have recently been identified as important gatekeepers of immune homeostasis in the GI tract (Verheijden et al., 2018). The ENS seems to rely on resident immune cells, mostly muscularis macrophages (MM $\phi$ s), to efficiently execute its function, via a reciprocal interaction. Under physiological conditions, myenteric neurons provide colony-stimulating factor-1 (CSF-1) to support maintenance of MM $\phi$ s, which in return produce bone-morphogenic protein 2 (BMP2), involved in fine-tuning peristalsis, supposedly by modulating enteric neuron activity (Muller et al., 2014). Furthermore, under inflammatory conditions in mouse models of inflammation and postoperative ileus, this interaction seems to be crucial for VNS therapeutic effects. When activated through VNS, these neurons release ACh, dampening inflammatory activation of MM $\phi$ s and leading to a reduced secretion of TNF $\alpha$  and IL6 (de Jonge et al., 2005) (Fig. 1c).

Although intrinsic enteric neural networks allow a substantial degree of autonomy over GI functions, extrinsic neural inputs provided by both sympathetic and parasympathetic nervous fibers are essential to integrate, regulate, and modulate these functions. Noteworthy, VNS most likely dampens the activation of MM $\phi$ s by an indirect mechanism, since vagal efferent nerves present in the MP do not interact directly with resident macrophages in the gut or spleen. Instead, the VN interacts with cholinergic myenteric neurons with nerve endings in close proximity of resident MM $\phi$ s, suggesting that intestinal MM $\phi$ s expressing  $\alpha$ 7nAChR are most likely the ultimate target of the gastrointestinal CAIP (Cailotto et al., 2014).

Sacral nerve stimulation (SNS) is currently used to treat constipation and fecal incontinence, among other disorders (Carrington et al., 2014). Recent studies suggest that SNS presents similar anti-inflammatory effects to VNS, by inhibiting proinflammatory and increasing anti-inflammatory cytokines via the autonomic pathway. In a 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)-induced colitis model, SNS significantly reduced colon inflammation, demonstrated by measure of disease activity index (DAI), weight loss, histological score, myeloperoxidase (MPO) activity and TNF $\alpha$  and IL6 levels. SNS also increased ACh in colon tissue, suggesting SNS therapeutic effects are due to CAIP activation (Tu



**Fig. 1.** Vagus nerve stimulation and sacral nerve stimulation suppress inflammation in the spleen and in the colon via the cholinergic anti-inflammatory pathway. (a) Splenic and intestinal innervation by splenic nerve, vagus nerve and sacral nerve. (b) In the spleen, norepinephrine released by sympathetic splenic nerves binds to  $\beta_2$  adrenergic receptors on choline acetyltransferase (ChAT)<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-cells, which then synthesize and release acetylcholine (ACh). Thereafter, ACh binds to  $\alpha_7$ nAChR in splenic macrophages, inhibiting its activation and TNF $\alpha$  production. (c) In the large intestine, SNS and VNS activate myenteric neurons, which release ACh. In turn, ACh binds to  $\alpha_7$ nAChR in muscularis macrophages, inhibiting its activation and TNF $\alpha$  and interleukin (IL)-6 production. \*The mechanisms of SNS circuit are still not clear; however, it has been observed that SNS does increase ACh tissue levels in the colon (Pasricha et al., 2020; Tu et al., 2020a). Figure Abbreviations:  $\alpha_7$ nAChR:  $\alpha_7$ -nicotinic-acetylcholine-receptor. ACh: acetylcholine. MM $\emptyset$ : muscularis macrophage. NE: norepinephrine. SNS: sacral nerve stimulation. TNF $\alpha$ : Tumor necrosis factor  $\alpha$ . VNS: vagal nerve stimulation.

et al., 2020b). A recent study compared SNS and VNS effects on a TNBS-colitis model and reported both treatments significantly increased vagal activity and decreased sympathetic activity, as well as DAI, macroscopic scores, MPO activity, and IL6, IL17A, and TNF $\alpha$ . Similar SNS effects were noted in dextran sodium sulphate (DSS)-induced colitis (Guo et al., 2019). Additionally, it has been demonstrated that SNS decreases DAI, MPO activity, colonic TNF $\alpha$  and histological scores in a 5% DSS-colitis model, while increasing colonic ACh levels and vagal activity. Moreover, tissue ACh levels were positively correlated to vagal activity, indicating the increase in ACh was induced by SNS (Pasricha et al., 2020). These results suggest SNS, similar to VNS, may also exert a therapeutic potential for IBD (Fig. 1a,c).

Several intestinal immune cells express nicotinic receptors to respond to CAIP; nevertheless, macrophages and dendritic cells are described as the main effectors (Goverse et al., 2016). In a DSS colitis model, vagotomy significantly worsened colitis, as evidenced by increased DAI, greater loss of colonic architecture and increased colonic inflammation (Ghia et al., 2006). Furthermore, the same group reported vagotomy had no effect in macrophage-deficient mice, indicating a critical role of macrophages in regulating inflammation. Remarkably, mice treated with nicotine did not develop exacerbated colitis after vagotomy, suggesting VN affects intestinal macrophage activation by cholinergic modulation.

Central CAIP activation by VNS reduces mucosal inflammation both in DSS and in 2,4-dinitrobenzenesulfonic acid (DNBS)-induced colitis as a direct consequence of reduced pro-inflammatory cytokine secretion and maturation of splenic dendritic cells in an  $\alpha_7$ nAChR-dependent fashion (Ji et al., 2014; Munyaka et al., 2014). However, this effect was abolished in mice with vagotomy, splenic neurectomy or splenectomy, indicating

that central cholinergic activation of a vagus nerve-to-spleen circuit controls intestinal inflammation. This regulation can be explored for the development of therapeutic strategies for IBD.

Rather interestingly, nicotine absorption via cigarette smoking affects both UC and CD but with opposite effects, ameliorating UC and worsening CD. Although the exact mechanisms are not known yet, Galitovskiy and collaborators (Galitovskiy et al., 2011) examined the different effects of nicotine in two different colitis models, mimicking a Th1 or Th2 type of inflammation. Within the Th2 model, the expression of  $\alpha_7$ nAChR was induced on CD4<sup>+</sup> T cells after nicotine treatment, leading to increased regulatory T cells and reduced inflammation. However, mice with a Th1 inflammation demonstrated no increase in expression of this receptor or diminished inflammation.

Accordingly, since immunologically CD is considered to be a Th1-predominant disease and UC Th2-predominant, VN immunological effects may be exerted via different mechanisms. Subclinical autonomic changes in IBD have been shown to predominantly affect patients with UC rather than CD, yet VNS has shown promising early clinical efficacy in CD. These observations might suggest that increasing the vagal tone in CD may promote a Th2-favorable environment, whilst restoring the sympho-vagal balance may be of greater importance for patients with UC. Further research in this field is required for clearer delineation of these mechanisms (Mogilevski et al., 2019).

As previously mentioned, VNS activates the CAIP, which induces production and release of ACh by splenic ChAT + T cells. Subsequently, ACh binds to  $\alpha_7$ nAChR in splenic macrophages, inhibiting its activation. Remarkably, it is likely that the regulatory effect of ChAT + T cells is not restricted to the spleen, since these cells are found in mice lymph nodes

and Peyer's patches, which are similarly regulated by adrenergic neurons (Rosas-Ballina et al., 2011). Acetylcholine released by these ChAT + T cells acts on circulating and tissue cells that possess the  $\alpha 7nAChR$ , thus completing CAIP efferent arm (Mogilevski et al., 2019). Accordingly, in a DSS-colitis model, VNS increased both ACh colon levels and colonic M2 macrophage population, suggesting an anti-inflammatory polarization of lamina propria macrophages in response to VNS (Pasricha et al., 2020).

In addition to macrophages, dendritic cells and ChAT + T cells, other cell types also present an important role in intestinal immunity and can be influenced by cholinergic signaling. When activated by an inflammatory environment, mast cells release mediators, such as tryptase and prostaglandins E2 (PGE2), which increase the colonic mucosal layer permeability and allow further access of pathogens to the mucosa, provoking further inflammatory response. In a TNBS-colitis model, tryptase and PGE2 expression were increased when compared to healthy animals, which was normalized by SNS, suggesting cholinergic signaling could prevent mast cell activation (Tu et al., 2020a). Tuft cells are chemosensory epithelial cells present in most of the GI tract. It has been suggested that these cells participate in the induction of protective reflexes and inflammatory events by cholinergic signaling (Schütz et al., 2015). They express choline acetyltransferase (ChAT) (Schneider et al., 2019), which is necessary for ACh synthesis, suggesting these cells can be a non-neuronal source of ACh in the intestine.

Finally, there is evidence to suggest that up-regulation of ACh signaling through VNS/SNS and the neuronal amplification of this signal in the enteric nervous system acts directly on dendritic cells, muscularis macrophages and intestinal mast cells. Modulation of parasympathetic tone via the up-regulation of acetylcholine signaling at a local intestinal level represents, therefore, a novel and potentially important therapeutic target in downregulating intestinal inflammation (Mogilevski et al., 2019).

## 5. Cholinergic signaling in IBD: patient studies and clinical trials

During the last decade, CAIP activation has been proposed for the treatment of IBD patients according to its potential anti-inflammatory effect on immune cells in animal models (Ghia et al., 2006). Furlan and collaborators (Furlan et al., 2006) examined 23 active UC patients and 20 healthy individuals to investigate whether an exaggerated sympathetic activity characterizes active UC, and observed a higher heart rate in subjects with UC. Subsequently, 16 from these original 23 active UC patients were randomly assigned to a protocol of transdermal clonidine or placebo, to investigate whether a reduction of sympathetic activity by clonidine would be associated with clinical changes of UC. Clonidine, an adrenergic receptor agonist, reduced systemic neural sympathetic activity and increased vagal cardiac modulation, which was associated to decreased DAI, indicated by amelioration of clinical symptoms and colon endoscopic pattern. However, these results should be interpreted with caution, since important factors, such as smoking status, previous UC therapy, and gender, were registered but not separately analyzed, possibly due to the small sample size. Furthermore, the researchers do not specify whether a post-hoc test was performed in the statistical analysis, which is an important analysis factor to be considered.

Pellissier and collaborators (Pellissier et al., 2014) first investigated the association between vagal tone and inflammation markers in patients with CD ( $n = 21$ ) compared to healthy subjects ( $n = 26$ ). No difference was observed in heart rate between CD patients and healthy individuals. However, when CD patients were separated between high and low vagal tone, an inverse association ( $r = 20.48$ ;  $p < 0.05$ ) was observed between the vagal tone and TNF $\alpha$  level in CD patients, suggesting that the CAIP may be blunted in CD patients with low vagal tone. Patients inclusion criteria were specific regarding disease treatment, rendering study population nearly homogeneous; nevertheless, the study analyzed only CD patients in disease remission. Further investigation on vagal tone and inflammation markers in active CD patients is warranted.

Subsequently, a pilot study (Bonaz et al., 2016) aimed to evaluate VNS as a therapy in CD patients. In seven active CD patients, VNS was performed by an implanted device (Model 302, Cyberonics, Houston, TX, USA) wrapped around the left VN in the neck, continuously for over 6 months. No major side-effects were observed. All patients reported a decreased digestive pain after VNS treatment. However, two patients, both untreated prior to the experiment, were removed from the study at 3 months due to clinical worsening after experimental treatment. The five remaining patients evolved towards clinical and endoscopic remission with a restored vagal tone, measured via heart rate variability (HRV). These findings suggest VNS is feasible and safe, and its efficacy may be explored in future studies with larger groups of patients. After this pilot study, Sinniger and collaborators (Sinniger et al., 2020) investigated VNS in nine Crohn's disease patients through an implanted device (an electrode Model 302; Cyberonics wrapped around the left cervical VN) continuously for 12 months. After the intervention, five of nine patients were in clinical remission (DAI < 150) and two patients had only slight disease activity (DAI = 171 and 180, respectively). Two patients were removed from the study after a 3-month follow-up, due to clinical worsening. Among the remaining seven patients, median DAI went from 264 (range: 175–358) to 88 (range: 0–180). After 12 months of VNS, endoscopic index of severity scores were reduced by 60–100% in 5 out of 7 patients, and the median digestive pain score reduced from 4 to 1. Further, serum IL6, IL12, TNF $\alpha$ , IL23, and IFN $\gamma$  were also decreased when compared to before intervention. However, these results only suggest VNS efficacy on moderate CD therapy, since no statistical analysis was possible due to study population size. Moreover, DAI range of variation was somewhat large, suggesting a variability in immunomodulation in response to VNS treatment among patients, which should be considered with caution.

Controversially, a larger case-control study (Shao et al., 2020) investigated whether serum cholinesterase (ChE) levels were associated to IBD. A total of 60 CD and 142 UC patients were included retrospectively in the study and compared to 264 healthy individuals. CD patients displayed significantly lower serum ChE levels than patients with UC (5181U/L versus 6376U/L,  $p < 0.01$ ), and both CD and UC patients presented substantially lower serum ChE levels when compared to healthy controls (8418U/L,  $p < 0.001$ ). A negative association between serum ChE levels and the Crohn's Disease Activity Index (CDAI) score of patients with CD ( $p = 0.011$ ) and the Simple Clinical Colitis Activity Index score of patients with UC ( $p = 0.018$ ) was also observed. Together, these findings suggest serum ChE levels have important clinical significance in the diagnosis and assessment of clinical activity in patients with IBD. It is already known that ChE degrades ACh, thus, lower serum ChE levels suggest higher serum ACh levels and, according to the CAIP mechanism, lower inflammation markers levels. However, the study didn't investigate ACh levels nor inflammatory markers. Therefore, the conclusion that the reduction in ChE levels in IBD patients reflects a reduced sympathetic activity should be taken with caution. The authors state that ChE is a common serum marker that reflects the nutritional status of patients, and also that CD is frequently associated with malabsorption and malnutrition. This is more likely to be the cause of the difference in ChE levels observed in the study. Additional studies would provide further insight into the role of CAIP in IBD.

Although several pre-clinical (Hayashi et al., 2014; Pellissier-Rota et al., 2015; Yoshikawa et al., 2006) and clinical studies (McGilligan et al., 2007; Pullan et al., 1994) reported a protective role of nicotine in UC via  $\alpha 7nAChR$  modulation, these results are conflicted by side effects caused by the high systemic nicotine concentration needed for UC therapy (Cosnes, 2004). Furthermore, patients are encouraged to quit smoking to reduce the risk of cardiopulmonary diseases. Nevertheless, pilot clinical studies performed in the 90s demonstrated interesting results. Treatment with 6 mg nicotine/100 mL enema every night for 4 weeks, concomitantly to conventional treatment (either with mesalazine, prednisolone, cyclosporin, or azathioprine), improved UC symptoms in twelve of the seventeen patients within the study, with full remission in

**Table 1**  
Published studies on cholinergic immunomodulation in inflammatory bowel diseases patients.

Author, Year	Number of Patients	Intervention	Major Findings
Pullan, (1994)	77 UC patients	Transdermal nicotine patches (35 nicotine + 37 placebo)	Complete symptomatic relief and global clinical grade of 0 in 17/35 patients in nicotine group and only 9/37 in placebo group; no stool mucus in 20/35 patients in nicotine group and 8/37 in placebo group; 3 patients withdrew because of side effects (nausea, lightheadedness, headache, sleep disturbance, dizziness, tremor)
Green, (1997)	17 UC patients, non-smokers	Nicotine enema	12 patients reduced urgency and stool frequency; 3 patients had a full remission after 4 weeks and another 2 after 8 weeks; enema was well-tolerated; still, 1 patient was withdrawn due to side effects (a 22-year-old who experienced vasovagal symptoms shortly after enema)
Sandborn, (1997)	10 UC patients, non-smokers	Nicotine enema	Clinical improvement in 5 of 7 patients; 3 patients discontinued therapy within 7 days due to inability to retain the liquid enemas; mild adverse events occurred in 4/10 patients
Furlan, (2006)	23 UC patients 20 healthy controls	Clonidine	Treatment with clonidine increased vagal cardiac modulation, which was associated to reduced disease activity
Pellissier, (2014)	21 CD patients 26 healthy controls	None (observational case-control)	TNF $\alpha$ plasma levels in CD patients is negatively correlated to vagal tone
Bonaz, (2016)	7 CD patients	VNS (implanted device Model 302, Cyberonics)	Five patients evolved towards clinical and endoscopic remission with a restored vagal tone; all patients reported a decreased digestive pain after VNS treatment; no major side-effects were observed and the device was well-tolerated in all patients
Shao, (2020)	141 UC patients 60 CD patients 264 healthy controls	None (retrospective case-control)	CD and UC patients both presented substantially lower serum ChE levels when compared to healthy controls (8418 U/L, $p < 0.001$ ); a negative association between serum ChE levels and both CD and UC patients' disease activity index
Sinniger, (2020)	9 CD patients	VNS (implanted device Model 302; Cyberonics)	Five patients were in clinical remission and two patients had only slight disease activity; median disease activity went from 264 to 88; median digestive pain went from 4 to 1; IL6, IL12, TNF $\alpha$ , IL23, and IFN $\gamma$ serum levels were decreased

five patients and only few side effects (Green et al., 1997). Similarly, treatment with 3 mg/day for 1 week and then 6 mg/day for 3 weeks nicotine enemas reported clinical and sigmoidoscopic improvement in five of seven patients. Three patients discontinued therapy within 7 days due to inability to retain the liquid enemas. Only mild adverse events occurred in 4/10 patients (nausea, lightheadedness, tremor, or sleep disturbance) (Sandborn et al., 1997). However, controlled randomized studies are still needed to further investigate these therapeutic effects. There are no current clinical trials on nicotine immunomodulation in IBD.

Published studies regarding cholinergic immunomodulation in IBD patients are summarized in Table 1.

Although early studies on cholinergic modulation for the treatment of IBD present encouraging results, further investigation is necessary to obtain a deeper understanding of the therapeutic mechanisms. Thereby, six different research groups are presently conducting clinical studies with VNS for cholinergic immunomodulation signaling in IBD (<https://clinicaltrials.gov/>: NCT03953768, NCT03863704, NCT02311660, NCT02951650, NCT03908073, and NCT00734331; accessed on: Feb 4, 2021) (Table 2).

VNS is a highly invasive neurosurgical procedure that requires extreme caution due to VN proximity to the jugular vein and external carotid artery. Therefore, the development of non-invasive VNS techniques is warranted. Responses to transcutaneous vagal nerve stimulation (tVNS) have been studied in healthy human volunteers. Clancy and collaborators (Clancy et al., 2014) investigated tVNS via electrical stimulation of the auricular branch of VN distributed throughout the skin of the ear. Active tVNS significantly increased HRV in healthy participants, indicating a shift in cardiac autonomic function towards parasympathetic predominance. Accordingly, tVNS can reduce sympathetic nerve outflow, providing a simple and inexpensive alternative to invasive VNS. However, these patients received a single dose of tVNS, and a longer tVNS treatment protocol may be further investigated. Similarly, tVNS applied for 2 min to the right antero-lateral surface of the neck in thirteen healthy individuals significantly activated primary vagal projections including the nucleus of the solitary tract (primary central relay of vagal afferents), the parabrachial area, the primary sensory cortex, and the

insula (Frangos et al., 2017). Such effects indicate that cervical vagal afferents can be accessed non-invasively via transcutaneous electrical stimulation of the antero-lateral surface of the neck, which overlies the course of the nerve, suggesting an alternative and feasible method of VNS. Additionally, these data suggest that the levels of VN activation achieved via transcutaneous stimulation are similar to those achieved by implantable VNS devices. Although these results are encouraging, further studies are necessary to evaluate long-term non-invasive VNS techniques in patients under inflammatory conditions.

Nunes and collaborators (Nunes et al., 2019) proposed the use of therapeutic ultrasound (TUS) in order to activate CAIP in a DSS-colitis model. TUS, applied to the left side of mice abdomen, aiming at the spleen, attenuated DAI by reducing clinical scores, colon shortening and histological damage, besides inducing proteomic tolerogenic responses in the gut during the injury phase and early recovery of experimental colitis. Noteworthy, TUS did not improve clinical and pathological outcomes in splenectomized mice, while  $\alpha 7nAChR$  knockout animals presented disease worsening, suggesting that the therapeutic use of ultrasound acts through the splenic nerve and possibly the VN, with CAIP activation in the DSS-induced colitis model. Accordingly, Benjamin Sahn ([clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov/): NCT03863704) and Qasim Qziz ([clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov/): NCT03908073) groups are both evaluating the use of non-invasive VNS via a transcutaneous device as a potential therapy in IBD.

## 6. Pre-clinical studies: promising therapies under investigation

In addition to the above-mentioned drugs and interventions for IBD, novel therapeutics exploring CAIP are being investigated in pre-clinical studies, in particular, selective  $\alpha 7nAChRs$  agonists and acetylcholinesterase inhibitors.

Administration of tropisetron, a partial agonist of  $\alpha 7nAChRs$  reported to have anti-inflammatory effects, ameliorated the development of DSS-induced colitis in a dose-dependent manner (Tasaka et al., 2015). Additionally, stimulation of  $\alpha 7nAChRs$  by PNU282987, a selective  $\alpha 7nAChRs$  agonist, decreased macrophage infiltration into the colonic mucosa caused by DSS administration. These findings suggest tropisetron could be a candidate therapeutic agent for UC. Treatment with

**Table 2**  
Clinical trials in cholinergic modulation for inflammatory bowel diseases.

ClinicalTrials.gov Identifier, Principal Investigator	Official Title	Intervention	Study Status
NCT03953768 Ian S Mutchnick	"VNS Prospective Neuromodulation of Autonomic, Immune and Gastrointestinal Systems (VNSAIG)"	Device: Vagal nerve stimulation (VNS)	Recruiting
NCT03863704 Benjamin Sahn	"Transcutaneous VNS to Treat Pediatric IBD (STIMIBD)"	Device: Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (tENS)	Recruiting
NCT02311660 Geert D'Haens	"Vagus Nerve Stimulation in Crohn's Disease"	Device: Vagus Nerve Stimulation Device	Unknown. Recruitment status was: Active, not recruiting
NCT02951650 Geert D'Haens	"Long Term Observational Study of a Vagal Nerve Stimulation Device in Crohn's Disease"	Device: Cyberonics VNS	Unknown. Recruitment status was: Active, not recruiting
NCT03908073 Qasim Qziz Tamara Mogilevski	"Electrical Vagal Nerve Stimulation in Ulcerative Colitis (EVASION-UC)"	Device: Transcutaneous vagal nerve stimulation	Unknown. Recruitment status was: Recruiting
NCT00734331 Michal Roll	"Micro Ribonucleic Acid (RNA) as Cholinergic Tone and Inflammatory Regulator in Inflammatory Bowel Disease"	None (Observational)	Completed (no results posted)

PNU282987 ameliorates DSS-induced colitis, reflected by decreased weight loss, histological score and IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$ , IL12, and IL23 colonic concentration, including a significant increase in IL10 (Xiao et al., 2020). However, further investigation is needed to demonstrate tropisetron's potential as a therapy for IBD, prior to evaluating this molecule's effect in clinical studies. Moreover, pyridostigmine bromide, an acetylcholinesterase inhibitor, attenuated DSS-induced colitis, by increasing Ach tissue levels, reducing colon eosinophilic infiltration and Th2 pro-inflammatory factors and promoting MUC2 synthesis, a mucin that plays a critical role in gut homeostasis (Singh et al., 2020). Nevertheless, the study did not evaluate whether said increase in ACh tissue levels was followed by a decrease in macrophage activation and subsequent decreased secretion of TNF- $\alpha$ . Additionally, prokinetic 5-hydroxytryptamine 4 receptor (5-HT4R) agonists are potential therapeutic agents for directly ameliorating motility disorders associated with postoperative ileus (POI). Stimulating the 5-HT4R accelerates ACh release from cholinergic myenteric neurons, which subsequently binds to  $\alpha$ 7nAChR on activated monocytes or macrophages to inhibit their inflammatory reactions in the muscle layer (Tsuchida et al., 2011). In a POI model, 5-HT4R agonists mosapride citrate (MOS) and CJ-033466 attenuated intestinal motility dysfunction and leucocyte infiltration, besides reducing the expression of inflammatory mediators IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$  and inducible nitric oxide synthase. In addition, the autonomic ganglionic blocker hexamethonium and the  $\alpha$ 7nAChR antagonist methyl lycaconitine citrate blocked MOS-mediated ameliorative actions, suggesting that MOS anti-inflammatory mechanism is  $\alpha$ 7nAChR dependent.

Finally, treatment with encenicline, a partial agonist specific for  $\alpha$ 7nAChR, attenuated DAI in both DSS and TNBS induced models, as indicated by significantly reduced macroscopic parameters and MPO activity (Salaga et al., 2015). In the TNBS model, encenicline reduced

macrophages, neutrophils and B cells infiltration in the colon, whereas in the DSS model it increased the frequency of FoxP3+ T cells and reduced IL17A + T cells. These results suggest stimulation of  $\alpha$ 7nAChR with partial agonist encenicline alleviates colitis via immunomodulation in the gut, emphasizing a potential role of  $\alpha$ 7nAChRs as a target for anti-colitis drugs.

## 7. Conclusions

The cholinergic anti-inflammatory pathway (CAIP) seems to be activated both by VNS and SNS, and is reported to have a pronounced effect in decreasing disease activity in diverse inflammatory conditions in vivo. The main mechanism of action appears to be the activation of  $\alpha$ -7-nicotinic-acetylcholine receptor ( $\alpha$ 7nAChR) on immune cells by acetylcholine (ACh). In the present issue, we addressed the most recent work concerning cholinergic signaling as a potential therapy for inflammatory diseases.

Cholinergic immunomodulation in IBD seems to occur globally, via VNS and ChAT + T cells through Ach production in the spleen, which inhibits macrophage activation. Locally, VNS or SNS may directly stimulate enteric neurons, which in turn secrete Ach and also inhibit MM $\emptyset$  activation in the gut. Preliminary clinical studies with VNS reported lower IBD disease indexes and reduced inflammatory cytokine mediators in patients' serum and colonic tissue. However, both VNS and SNS are invasive procedures and reaffirm the need for non-invasive VNS techniques. In spite of promising preclinical and clinical studies, further research in the field is warranted aiming an alternative or combined therapy for future clinical practice in IBD.

## Funding

This work was supported by CNPq (National Council for Scientific and Technological Development). The funding source had no role in the writing of the manuscript or the decision to submit it for publication.

## Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Amoroso, C., Perillo, F., Strati, F., Fantini, M., Caprioli, F., Facciotti, F., 2020. The role of gut microbiota biomodulators on mucosal immunity and intestinal inflammation. *Cells* 9 (5), 1–24. <https://doi.org/10.3390/cells9051234>.
- Ananthkrishnan, A.N., Khalili, H., Higuchi, L.M., Bao, Y., Korzenik, J.R., Giovannucci, E.L., Richter, J.M., Fuchs, C.S., Chan, A.T., 2012. Higher predicted vitamin D status is associated with reduced risk of crohn's disease. *Gastroenterology* 142 (3), 482–489. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.11.040>.
- Argollo, M., Fiorino, G., Hindryckx, P., Peyrin-Biroulet, L., Danese, S., 2017. Novel therapeutic targets for inflammatory bowel disease. In: *Journal of Autoimmunity*, vol. 85. Academic Press, pp. 103–116. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.07.004>.
- Bernik, T.R., Friedman, S.G., Ochani, M., Diraimo, R., Ulloa, L., Yang, H., Sudan, S., Czura, C.J., Ivanova, S.M., Tracey, K.J., 2002. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *Issue 6*. In: *J. Exp. Med.*, vol. 195. Rockefeller University Press. Retrieved from: <http://www.jem.org/cgi/content/full/195/6/781>.
- Berthoud, H.R., Powley, T.L., 1996. Interaction between parasympathetic and sympathetic nerves in prevertebral ganglia: morphological evidence for vagal efferent innervation of ganglion cells in the rat. *Microsc. Res. Tech.* 35 (1), 80–86. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19960901\)35:1<80::AID-JEMT7>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19960901)35:1<80::AID-JEMT7>3.0.CO;2-W).
- Bobrus-Chociej, A., Daniluk, U., Alifier, M., Stasiak-Barmuta, A., Kaczmarski, M.G., 2018. Alterations of lymphocyte subpopulations and TGF- $\beta$  in children with transient or persistent cow's milk allergy. *Food Agric. Immunol.* 29 (1), 400–411. <https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1387234>.
- Bonaz, B., Sinniger, V., Hoffmann, D., Clarençon, D., Mathieu, N., Dantzer, C., Vercueil, L., Picq, C., Trocmé, C., Faure, P., Cracowski, J.L., Pellissier, S., 2016. Chronic vagus nerve stimulation in Crohn's disease: a 6-month follow-up pilot study. *Neuro Gastroenterol. Motil.* 28 (6), 948–953. <https://doi.org/10.1111/nmo.12792>.
- Bonaz, B., Sinniger, V., Pellissier, S., 2017. Vagus nerve stimulation: a new promising

- therapeutic tool in inflammatory bowel disease. *J. Intern. Med.* 282 (1), 46–63. <https://doi.org/10.1111/joim.12611>.
- Borovikova, L.V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W., Tracey, K.J., 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. Retrieved from [www.nature.com](http://www.nature.com).
- Bressenot, A., Salleron, J., Bastien, C., Danese, S., Boulagnon-Rombi, C., Peyrin-Biroulet, L., 2015. Comparing histological activity indexes in UC. *Gut* 64 (9), 1412–1418. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307477>.
- Brinkman, D.J., ten Hove, A.S., Vervoordeldonk, M.J., Luyer, M.D., de Jonge, W.J., 2019. Neuroimmune interactions in the gut and their significance for intestinal immunity. *Cells* 8 (7), 670. <https://doi.org/10.3390/cells8070670>.
- Bujtor, M., Turner, A.I., Torres, S.J., Esteban-Gonzalo, L., Pariante, C.M., Borsini, A., 2021. Associations of dietary intake on biological markers of inflammation in children and adolescents: a systematic review. *Nutrients* 13 (2), 1–29. <https://doi.org/10.3390/nu13020356>.
- Cailotto, C., Gomez-Pinilla, P.J., Costes, L.M., Van Der Vliet, J., Di Giovangiulio, M., Némethova, A., Matteoli, G., Boeckxstaens, G.E., 2014. Neuro-anatomical evidence indicating indirect modulation of macrophages by vagal efferents in the intestine but not in the spleen. *PLoS One* 9 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087785>.
- Carnevale, D., Perrotta, M., Pallante, F., Fardella, V., Iacobucci, R., Fardella, S., Carnevale, L., Carnevale, R., De Lucia, M., Cifelli, G., Lembo, G., 2016. A cholinergic-sympathetic pathway primes immunity in hypertension and mediates brain-to-spleen communication. *Nat. Commun.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms13035>.
- Carrington, E.V., Evers, J., Grossi, U., Dinning, P.G., Scott, S.M., O'Connell, P.R., Jones, J.F.X., Knowles, C.H., 2014. A systematic review of sacral nerve stimulation mechanisms in the treatment of fecal incontinence and constipation. *Neuro Gastroenterol. Motil.* 26 (9), 1222–1237. <https://doi.org/10.1111/nmo.12388>.
- Clancy, J.A., Mary, D.A., Witte, K.K., Greenwood, J.P., Deuchars, S.A., Deuchars, J., 2014. Non-invasive Vagus nerve stimulation in healthy humans reduces sympathetic nerve activity. *Brain Stimulation* 7 (6), 871–877. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2014.07.031>.
- Clough, J.N., Omer, O.S., Tasker, S., Lord, G.M., Irving, P.M., 2020. Regulatory T-cell therapy in Crohn's disease: challenges and advances. *Gut* 69 (5), 942–952. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319850>.
- Cosnes, J., 2004. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18 (3), 481–496. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2003.12.003>.
- Dahlhamer, J.M., Zammitti, E.P., Ward, B.W., Wheaton, A.G., Croft, J.B., 2016. Prevalence of inflammatory bowel disease among adults aged ≥18 Years — United States, 2015. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 65 (42), 1166–1169. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6542a3>.
- de Jonge, W.J., van der Zanden, E.P., The, F.O., Bijlsma, M.F., van Westerloo, D.J., Bennis, R.J., Berthoud, H.R., Uematsu, S., Akira, S., van den Wijngaard, R.M., Boeckxstaens, G.E., 2005. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* 6 (8), 844–851. <https://doi.org/10.1038/ni1229>.
- De Souza, H.S.P., Fiocchi, C., 2016. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13 (1), 13–27. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.186>.
- Farraye, F.A., Melmed, G.Y., Lichtenstein, G.R., Kane, S.V., 2017. ACG clinical guideline: preventive care in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 112 (2), 241–258. <https://doi.org/10.1038/ajg.2016.537>.
- Frangos, E., Komisaruk, B.R., 2017. Access to vaginal projections via cutaneous electrical stimulation of the neck: fMRI evidence in healthy humans. *Brain Stimulation* 10 (1), 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2016.10.008>.
- Fujii, T., Watanabe, Y., Inoue, T., Kawashima, K., 2003. Upregulation of mRNA encoding the M5 muscarinic acetylcholine receptor in human T- and B-lymphocytes during immunological responses. *Neurochem. Res.* 28 (3–4), 423–429. <https://doi.org/10.1023/A:1022840416292>.
- Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T., Fujiyama, Y., 2003. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52 (1), 65–70. <https://doi.org/10.1136/gut.52.1.65>.
- Furlan, R., Ardizzone, S., Palazzolo, L., Rimoldi, A., Perego, F., Barbic, F., Bevilacqua, M., Vago, L., Porro, G.B., Malliani, A., 2006. Sympathetic overactivity in active ulcerative colitis: effects of clonidine. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290 (1), 224–233. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00442.2005>.
- Galitovskiy, V., Qian, J., Chernyavsky, A.I., Marchenko, S., Gindi, V., Edwards, R.A., Grand, S.A., 2011. Cytokine-induced alterations of alpha-7-nicotinic-receptor in colonic Cd4 T cells mediate dichotomous response to nicotine in murine models. *J. Immunol.* 187 (5), 2677–2687. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002711>. CYTOKINE-INDUCED.
- Gasparini, R.G., Sasaki, L.Y., Saad-Hossne, R., 2018. Inflammatory bowel disease epidemiology in São Paulo State, Brazil. *Clin. Exp. Gastroenterol.* 11, 423–429. <https://doi.org/10.2147/CEG.S176583>.
- Gatta, V., Mengod, G., Reale, M., Tata, A.M., 2020. Possible correlation between cholinergic system Alterations and neuro/inflammation in multiple sclerosis. *Biomedicines*. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8060153>.
- Ghia, J.E., Blennerhassett, P., Kumar-Ondiveeran, H., Verdu, E.F., Collins, S.M., 2006. The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology* 131 (4), 1122–1130. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.08.016>.
- Ghouri, Y.A., Tahan, V., Shen, B., 2020. Secondary causes of inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.* 26 (28), 3998–4017. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i28.3998>.
- Giuffrida, P., Corazza, G.R., Di Sabatino, A., 2018. Old and new lymphocyte players in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* 63 (2), 277–288. <https://doi.org/10.1007/s10620-017-4892-4>.
- Gomes, J.P., Watad, A., Shoenfeld, Y., 2018. Nicotine and autoimmunity: the lotus flower in tobacco. *Pharmacol. Res.* 128, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.10.005>.
- Goverse, G., Stakenborg, M., Matteoli, G., 2016. The intestinal cholinergic anti-inflammatory pathway. *J. Physiol.* 594 (20), 5771–5780. <https://doi.org/10.1113/JP271537>.
- Green, J.T., Thomas, G.A.O., Rhodes, J., Williams, G.T., Evans, B.K., Russell, M.A.H., Feyerabend, C., Rhodes, P., Sandborn, W.J., 1997. Nicotine enemas for active ulcerative colitis - a pilot study. *Aliment Pharmacol. Therapeut.* 11 (5), 859–863. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.1997.00220.x>.
- Guo, J., Jin, H., Shi, Z., Yin, J., Pasricha, T., Chen, J.D.Z., 2019. Sacral nerve stimulation improves colonic inflammation mediated by autonomic-inflammatory cytokine mechanism in rats. *Neuro Gastroenterol. Motil.* 31 (10). <https://doi.org/10.1111/nmo.13676>.
- Hayashi, S., Hamada, T., Zaidi, S.F., Oshiro, M., Lee, J., Yamamoto, T., Ishii, Y., Sasahara, M., Kadowaki, M., 2014. Nicotine suppresses acute colitis and colonic tumorigenesis associated with chronic colitis in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 307 (10), G968–G978. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00346.2013>.
- Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A.H., Bürgel, N., Fromm, M., Zeitz, M., Fuss, I., Strober, W., Schulzke, J.D., 2005. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 129 (2), 550–564. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.05.002>.
- Huston, J.M., Ochani, M., Rosas-Ballina, M., Liao, H., Ochani, K., Pavlov, V.A., Gallowitsch-Puerta, M., Ashok, M., Czura, C.J., Foxwell, B., Tracey, K.J., Ulloa, L., 2006. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J. Exp. Med.* 203 (7), 1623–1629. <https://doi.org/10.1084/jem.20052362>.
- Inoue, T., Abe, C., Sung, S., Moscalu, S., Kankowski, J., Huang, L., Ye, H., Guyenet, P., Okuma, M., 2016. Vagus nerve stimulation mediates protection from kidney ischemia-reperfusion injury through  $\alpha 7$ nAChR+ splenocytes. *J. Clin. Invest.* 126 (5), 1939–1952. <https://doi.org/10.1172/JCI83658>.
- Ji, H., Rabbi, M.F., Labis, B., Pavlov, V.A., Tracey, K.J., Ghia, J.E., 2014. Central cholinergic activation of a vagus nerve-to-spleen circuit alleviates experimental colitis. *Mucosal Immunol.* 7 (2), 335–347. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.52>.
- Kawashima, K., Fujii, T., Moriwaki, Y., Misawa, H., Horiguchi, K., 2015. Non-neuronal cholinergic system in regulation of immune function with a focus on  $\alpha 7$ nAChRs. *Int. Immunopharm.* 29 (1), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.04.015>.
- Kimlin, M.G., Olds, W.J., Moore, M.R., 2007. Location and Vitamin D Synthesis: Is the Hypothesis Validated by Geophysical Data? *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Retrieved from <https://sci.hub.st/10.1016/j.jphotobiol.2006.10.004>.
- Kobayashi, T., Siegmund, B., Le Berre, C., Wei, S.C., Ferrante, M., Shen, B., Bernstein, C.N., Danese, S., Peyrin-Biroulet, L., Hibbi, T., 2020. Ulcerative colitis. *Nat. Rev. Dis. Primers* 6 (1), 74. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0205-x>.
- Koopman, F.A., Chavan, S.S., Miljko, S., Grazio, S., Sokolovic, S., Schuurman, P.R., Mehta, A.D., Levine, Y.A., Faltys, M., Zitnik, R., Tracey, K.J., Tak, P.P., 2016. Vagus nerve stimulation inhibits cytokine production and attenuates disease severity in Rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113 (29), 8284–8289. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605635113>.
- Kotze, P.G., Underwood, F.E., Damião, A.O.M.C., Ferraz, J.G.P., Saad-Hossne, R., Toro, M., Iade, B., Bosques-Padilla, F., Teixeira, F.V., Juliao-Banos, F., Simian, D., Ghosh, S., Panaccione, R., Ng, S.C., Kaplan, G.G., 2020. Progression of inflammatory bowel diseases throughout Latin America and the caribbean: a systematic review. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 18 (2), 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2019.06.030>.
- Kruse, A.C., Kobilka, B.K., Gautam, D., Sexton, P.M., Physiology, C., Section, S., Diseases, K., 2014. Muscarinic Acetylcholine Receptors: Novel Opportunities for Drug Development, vol. 13, pp. 549–560. <https://doi.org/10.1038/nrd4295>. Muscarinic, 7.
- Kulkarni, S., Kurapati, S., Bogunovic, M., 2021. Neuro-innate immune interactions in gut mucosal immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 68, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.09.007>.
- Kuzmiński, A., Przybyszewski, M., Graczyk, M., Żbikowska-Gotz, M., Sokolowska-Ukleja, N., Tomaszewska, A., Bartuzi, Z., 2020. Selected allergic diseases of the gastrointestinal tract. *Przeegląd Gastroenterol.* 15 (3), 194–199. <https://doi.org/10.5114/pg.2019.87681>.
- Lim, S.Z., Chua, E.W., 2018. Revisiting the role of thiopurines in inflammatory bowel disease through pharmacogenomics and use of novel methods for therapeutic drug monitoring. *Front. Pharmacol.* 9 (OCT), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01107>.
- Longo, S., Chieppa, M., Cossa, L.G., Spinelli, C.C., Greco, M., Maffia, M., Giudetti, A.M., 2020. New insights into inflammatory bowel diseases from proteomic and lipidomic studies. In: *Proteomes*, vol. 8. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/PROTEOMES8030018>. Issue 3.
- MacLaughlin, J.A., Anderson, R.R., Holick, M.F., 1982. Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of. *Science* 216, 1001–1003. May.
- McGilligan, V.E., Wallace, J.M.W., Heavey, P.M., Ridley, D.L., Rowland, I.R., 2007. Hypothesis about mechanisms through which nicotine might exert its effect on the interdependence of inflammation and gut barrier function in ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 13 (1), 108–115. <https://doi.org/10.1002/ibd.20020>.
- Mogilevski, T., Burgell, R., Aziz, Q., Gibson, P.R., 2019. Review article: the role of the autonomic nervous system in the pathogenesis and therapy of IBD. *Aliment Pharmacol. Therapeut.* 50 (7), 720–737. <https://doi.org/10.1111/apt.15433>.

- Moum, B., Hovde, Ø., Høivik, M.L., 2014. What have we learnt about the role of the environment and natural course of IBD in the new millennium? 20-year follow-up of the IBSEN cohort. *Dig. Dis. Sci.* 32 (s1), 2–9. <https://doi.org/10.1159/000367818>.
- Muller, P.A., Koscsó, B., Rajani, G.M., Stevanovic, K., Berres, M.L., Hashimoto, D., Mortha, A., Leboeuf, M., Li, X.M., Mucida, D., Stanley, E.R., Dahan, S., Margolis, K.G., Gershon, M.D., Merad, M., Bogunovic, M., 2014. Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility. *Cell* 158 (2), 300–313. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.050>.
- Munyaka, P., Rabbi, M.F., Pavlov, V.A., Tracey, K.J., Khafipour, E., Ghia, J.E., 2014. Central muscarinic cholinergic activation alters interaction between splenic dendritic cell and CD4+CD25- T cells in experimental colitis. *PLoS One* 9 (10), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109272>.
- Murray, K., Reardon, C., 2018. The cholinergic anti-inflammatory pathway revisited. *Neuro Gastroenterol. Motil.* 30 (3). <https://doi.org/10.1111/nmo.13288>, 0–3.
- Narula, N., Wong, E.C.L., Dehghan, M., Mente, A., Rangarajan, S., Lanus, F., Lopez-Jaramillo, P., Rohatgi, P., Lakshmi, P.V.M., Varma, R.P., Orlandini, A., Avezum, A., Wielgosz, A., Poirier, P., Almagi, M.A., Altuntas, Y., Ng, K.K., Chifamba, J., Yeates, K., et al., 2021. Association of ultra-processed food intake with risk of inflammatory bowel disease: prospective cohort study. *BMJ* 374. <https://doi.org/10.1136/bmj.n1554>.
- Nemeth, Z.H., Bogdanovski, D.A., Barratt-Stopper, P., Paglinco, S.R., Antonioli, L., Rolandelli, R.H., 2017. Crohn's disease and ulcerative colitis show unique cytokine profiles. *Cureus* 9 (4). <https://doi.org/10.7759/cureus.1177>.
- Ng, S.C., Kaplan, G.G., Tang, W., Banerjee, R., Adigopula, B., Underwood, F.E., Tanyingoh, D., Wei, S.C., Lin, W.C., Lin, H.H., Li, J., Bell, S., Niewiadomska, O., Kamm, M.A., Zeng, Z., Chen, M., Hu, P., Ong, D., Ooi, C.J., et al., 2019. Population density and risk of inflammatory bowel disease: a prospective population-based study in 13 countries or regions in asia-pacific. *Am. J. Gastroenterol.* 114 (1), 107–115. <https://doi.org/10.1038/s41395-018-0233-2>.
- Nunes, N.S., Chandran, P., Sundby, M., Visioli, F., da Costa Gonçalves, F., Burks, S.R., Paz, A.H., Frank, J.A., 2019. Therapeutic ultrasound attenuates DSS-induced colitis through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *EBioMedicine* 45, 495–510. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.06.033>.
- Oka, A., Sartor, R.B., 2020. Microbial-Based and microbial-targeted therapies for inflammatory bowel diseases. *Dig. Dis. Sci.* 65 (3), 757–788. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06090-z.Microbial-Based>.
- Park, M.I., Camilleri, M., 2006. Is there a role of food allergy in irritable bowel syndrome and functional dyspepsia? A systematic review. *Neuro Gastroenterol. Motil.* 18 (8), 595–607. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2005.00745.x>.
- Pasricha, T.S., Zhang, H., Zhang, N., Chen, J.D.Z., 2020. Sacral nerve stimulation prompts vagally-mediated amelioration of rodent colitis. *Physiol. Rep.* 8 (1), 1–7. <https://doi.org/10.14814/phy2.14294>.
- Pellissier-Rota, M.A., Pelosi, L., Meresse, P., Jacquier-Sarlin, M.R., 2015. Nicotine-induced cellular stresses and autophagy in human cancer colon cells: a supportive effect on cell homeostasis via up-regulation of Cox-2 and PGE2 production. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 65, 239–256. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.06.013>.
- Pellissier, S., Dantzer, C., Mondillon, L., Trocme, C., Gauchez, A.S., Ducros, V., Mathieu, N., Toussaint, B., Fournier, A., Canini, F., Bonaz, B., 2014. Relationship between Vagal Tone, Cortisol, TNF-alpha, epinephrine and negative affects in Crohn's disease and irritable bowel syndrome. *PLoS One* 9 (9), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105328>.
- Peyrin-Biroulet, L., Sandborn, W., Sands, B.E., Reinisch, W., Bemelman, W., Bryant, R.V., D'Haens, G., Dotan, I., Dubinsky, M., Feagan, B., Fiorino, G., Geary, R., Krishnareddy, S., Lakatos, P.L., Loftus, E.V., Marteau, P., Munkholm, P., Murdoch, T.B., Ordás, I., et al., 2015. Selecting therapeutic targets in inflammatory bowel disease (STRIDE): determining therapeutic goals for treat-to-target. *Am. J. Gastroenterol.* 110 (9), 1324–1338. <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.233>.
- Piovani, D., Danese, S., Peyrin-Biroulet, L., Nikolopoulos, G.K., Lytras, T., Bonovas, S., 2019. Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: an umbrella review of meta-analyses. *Gastroenterology* 157 (3), 647–659. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.04.016> e4.
- Popp, V., Gerlach, K., Mott, S., Turowska, A., Garn, H., Atreya, R., Lehr, H.A., Ho, I.C., Renz, H., Weigmann, B., Neurath, M.F., 2017. Rectal delivery of a DNzyme that specifically blocks the transcription factor GATA3 and reduces colitis in mice. *Gastroenterology* 152 (1), 176–192. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.09.005> e5.
- Pullan, R., Rhodes, J., Ganesh, S., Mani, V., Morris, J., Williams, G., Sawe, U., 1994. Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.* 330 (12), 811–815. <https://doi.org/10.1056/nejm199403243301202>.
- Rosas-Ballina, M., Olofsson, P.S., Ochani, M., Sergio, I., Valdés-Ferrer, Y.A.L., Reardon, C., Tusche, M.W., Pavlov, V.A., Andersson, U., Chavan, S., Mak, T.W., Tracey, K.J., Kevin, 2011. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science* 334 (6052), 98–101. <https://doi.org/10.1126/science.1209985.Acetylcholine-Synthesizing>.
- Rosen, M.J., Karns, R., Vallance, J.E., Bezold, R., Waddell, A., Collins, M.H., Haberman, Y., Minar, P., Baldassano, R.N., Hyams, J.S., Baker, S.S., Kellermayer, R., Noe, J.D., Griffiths, A.M., Rosh, J.R., Crandall, W.V., Heyman, M.B., Mack, D.R., Kappelman, M.D., et al., 2017. Mucosal expression of type 2 and type 17 immune response genes distinguishes ulcerative colitis from colon-only crohn's disease in treatment-naive pediatric patients. *Gastroenterology* 152 (6), 1345–1357. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.01.016> e7.
- Rubin, D.T., Ananthakrishnan, A.N., Siegel, C.A., Sauer, B.G., Long, M.D., 2019. ACG clinical guideline: ulcerative colitis in adults. *Am. J. Gastroenterol.* 114 (3), 384–413. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000152>.
- Salaga, M., Blomster, L., Piechota-Polańczyk, A., Zielińska, M., Jacenik, D., Cygankiewicz, A., Krajewska, W., Mikkelsen, J., Fichna, J., 2015. Encenicline, an  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, reduces immune cell infiltration in the colon and improves experimental colitis in mice. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 356 (1), 157–169. <https://doi.org/10.1124/jpet.115.228205>.
- Sandborn, W.J., Tremaine, W.J., Leighton, J.A., Lawson, G.M., Zins, B.J., Compton, R.F., Mays, D.C., Lipsky, J.J., Batts, K.P., Offord, K.P., Hurt, R.D., Green, J., 1997. Nicotine tartrate liquid enemas for mildly to moderately active left-sided ulcerative colitis unresponsive to first-line therapy: a pilot study. *Aliment Pharmacol. Therapeut.* 11 (4), 663–671. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.1997.00208.x>.
- Schneider, C., O'Leary, C.E., Locksley, R.M., 2019. Regulation of immune responses by tuft cells. *Nat. Rev. Immunol.* 19 (9), 584–593. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0176-x>.
- Schütz, B., Jurastow, I., Bader, S., Ringer, C., von Engelhardt, J., Chubanov, V., Gudermann, T., Diener, M., Kummer, W., Krasteva-Christ, G., Weihe, E., 2015. Chemical coding and chemosensory properties of cholinergic brush cells in the mouse gastrointestinal and biliary tract. *Front. Physiol.* 6 (MAR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00087>.
- Shao, X., Yang, L., Hu, K., Shen, R., Ye, Q., Yuan, X., Zhao, Q., Shen, J., 2020. Serum Cholinesterases, a Novel Marker of Clinical Activity in Inflammatory Bowel Disease: A Retrospective Case-Control Study. *Mediators of Inflammation*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4694090>.
- Singh, S.P., Chand, H.S., Banerjee, S., Agarwal, H., Raizada, V., Roy, S., Sopori, M., 2020. Acetylcholinesterase inhibitor pyridostigmine bromide attenuates gut pathology and bacterial dysbiosis in a murine model of ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* 65 (1), 141–149. <https://doi.org/10.1007/s10620-019-05838-6>.
- Sinniger, V., Pellissier, S., Fauvel, F., Trocme, C., Hoffmann, D., Vercueil, L., Cracowski, J.L., David, O., Bonaz, B., 2020. A 12-month pilot study outcomes of vagus nerve stimulation in Crohn's disease. *Neuro Gastroenterol. Motil.* 32 (10), 1–16. <https://doi.org/10.1111/nmo.13911>.
- Soreq, H., 2001. Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 2 (4), 294–302. <https://doi.org/10.1038/35067589>.
- Tasaka, Y., Yasunaga, D., Kiyoi, T., Tanaka, M., Tanaka, A., Suemaru, K., Araki, H., 2015. Involvement of stimulation of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors in the suppressive effect of tropisetron on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *J. Pharmacol. Sci.* 127 (3), 275–283. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2014.12.016>.
- Tracey, K.J., 2002. The inflammatory reflex. *Nature*, vol. 420, pp. 853–859. <https://doi.org/10.1038/nature01321>, 6917.
- Tsuchida, Y., Hatao, F., Fujisawa, M., Murata, T., Kaminishi, M., Seto, Y., Hori, M., Ozaki, H., 2011. Neuronal stimulation with 5-hydroxytryptamine 4 receptor induces anti-inflammatory actions via  $\alpha 7$ nACh receptors on muscularis macrophages associated with postoperative ileus. *Gut* 60 (5), 638–647. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.227546>.
- Tu, L., Gharibani, P., Yin, J., Chen, J.D.Z., 2020a. Sacral nerve stimulation ameliorates colonic barrier functions in a rodent model of colitis. *Neuro Gastroenterol. Motil.* 32 (10), 1–13. <https://doi.org/10.1111/nmo.13916>.
- Tu, L., Gharibani, P., Yin, J., Chen, J.D.Z., 2020b. Sacral nerve stimulation ameliorates colonic barrier functions in a rodent model of colitis. *Neuro Gastroenterol. Motil.* 32 (10). <https://doi.org/10.1111/nmo.13916>.
- Tuček, S., 1982. The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. *J. Physiol.* 322 (1), 53–69. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1982.sp014022>.
- Uni, R., Inoue, T., Nakamura, Y., Fukaya, D., Hasegawa, S., Wu, C.H., Fujii, R., Surattichaiyakul, B., Peerapanyasut, W., Ozeki, A., Akimitsu, N., Wada, Y., Nangaku, M., Inagi, R., 2020. Vagus nerve stimulation even after injury ameliorates cisplatin-induced nephropathy via reducing macrophage infiltration. *Sci. Rep.* 10 (1), 9472. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66295-0>.
- Verheijden, S., Boeckxstaens, G.E., 2018. Neuroimmune interaction and the regulation of intestinal immune homeostasis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 314 (1), G75–G80. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00425.2016>.
- Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amelina, C.A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J.H., Wang, H., Yang, N., Ulloa, L., Al-Abed, Y., Czura, C.J., Tracey, K.J., 2003. Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421 (6921), 384–388. <https://doi.org/10.1038/nature01339>.
- Wéra, O., Lancellotti, P., Oury, C., 2016. The dual role of neutrophils in inflammatory bowel diseases. *J. Clin. Med.* 5 (12), 118. <https://doi.org/10.3390/jcm5120118>.
- Wolford, D.D., Fichera, A., 2020. Prophylaxis of Crohn's disease recurrence: a surgeon's perspective. *Annals Gastroenterol. Surgery* 4 (5), 514–520. <https://doi.org/10.1002/ags3.12368>.
- Xiao, J., Zhang, G., Gao, S., Shen, J., Feng, H., He, Z., Xu, C., 2020. Combined administration of SHP2 inhibitor SHP099 and the  $\alpha 7$ nAChR agonist PNU282987 protect mice against DSS-induced colitis. *Mol. Med. Rep.* 22 (3), 2235–2244. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11324>.
- Yoshikawa, H., Kurokawa, M., Ozaki, N., Nara, K., Atou, K., Takada, E., Kamochi, H., Suzuki, N., 2006. Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I- $\kappa$ B phosphorylation and nuclear factor- $\kappa$ B

- transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$ . *Clin. Exp. Immunol.* 146 (1), 116–123. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03169.x>.
- Zaltman, C., Parra, R.S., Sasaki, L.Y., Santana, G.O., de Lourdes Abreu Ferrari, M., Miszputen, S.J., Amarante, H.M.B.S., Kaiser, R.L., Flores, C., Catapani, W.R., Parente, J.M.L., Bafutto, M., Ramos, O., Gonçalves, C.D., Guimaraes, I.M., da Rocha, J.J.R., Feitosa, M.R., Peres, O., Saad-Hossne, R., Chebli, J.M., 2021. Real-world disease activity and sociodemographic, clinical and treatment characteristics of moderate-to-severe inflammatory bowel disease in Brazil. *World J. Gastroenterol.* 27 (2), 208–223. <https://doi.org/10.3748/WJG.V27.I2.208>.
- Zhang, J., Zhao, Y., Hou, T., Zeng, H., Kalambe, D., Wang, B., Shen, X., Huang, Y., 2020. Macrophage-based nanotherapeutic strategies in ulcerative colitis. *J. Contr. Release* 320, 363–380. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.01.047>.
- Zheng, W.-P., Flavell, R.A., 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine GeneExpression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587–596. [https://doi.org/10.1016/S0030-6657\(08\)70226-9](https://doi.org/10.1016/S0030-6657(08)70226-9).



## 6. DISCUSSÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças de etiologia não definida, cuja incidência tem aumentado continuamente, especialmente em países desenvolvidos. Devido ao fato de ainda não existir nenhuma terapia capaz de reverter totalmente o sintomas, somado ao fato de diversos pacientes não responderem ao tratamento ou sofrerem efeitos adversos, o desenvolvimento de novas terapias para estas doenças se faz necessário.

Neste sentido, a ativação da via colinérgica anti-inflamatória (CAIP – do inglês, *cholinergic anti-inflammatory pathway*) tem sido estudada como uma alternativa para o tratamento das DII. Através do estímulo ao nervo vago ou ao nervo sacral, estudos recentes têm reportado que é possível ativar esta via, cujo resultado é a secreção de acetilcolina (ACh) no baço e no intestino (116,117). Nestes órgãos, a ACh se liga ao receptor  $\alpha 7nAChR$  dos macrófagos residentes, cuja a ativação é inibida. Como consequência, ocorre uma diminuição dos níveis sistêmicos das citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$  e IL6 (51,118–120).

Entretanto, a estimulação do nervo vago e do nervo sacral geralmente é realizada de forma invasiva, tornando necessário o desenvolvimento de técnicas não-invasivas para a ativação da CAIP. Neste sentido, algumas estratégias terapêuticas já estão sendo desenvolvidas, tais como a estimulação por ultrassom proposta por Nunes e colaboradores (121). Nesse estudo experimental, os autores reportam que a estimulação do nervo vago realizada através da pele do animal, sobre o abdômen na região próxima ao baço, foi capaz de diminuir a atividade da doença e o escore histológico de inflamação no modelo de colite ulcerativa induzida por DSS. No momento da escrita do artigo de revisão (contido no Capítulo I desta tese), dois estudos clínicos estavam sendo conduzidos para testar a ativação da CAIP através do ultrassom terapêutico em pacientes portadores de DII (clinicaltrials.gov: NCT03863704 e NCT03908073); atualmente, um dos estudos segue recrutando participantes, enquanto o outro infelizmente foi terminado devido à pandemia de Covid-19.

Diversos estudos em animais e alguns estudos clínicos já demonstraram as propriedades imunomodulatórias da terapia celular com células estromais mesenquimais (MSC) em doenças inflamatórias (122,123); entretanto, o mecanismo pelo qual estas células exercem seu efeito terapêutico na colite ulcerativa ainda não está totalmente elucidado. No manuscrito submetido (contido

no Capítulo II desta tese), induzimos a colite ulcerativa por DSS 2% e comparamos o tratamento com a MSC íntegra a dois tratamentos derivados de MSC e livres de células: tratamento com meio condicionado de MSC (CM) ou com partículas de membrana (MP) de MSC. Neste trabalho, buscamos investigar se as MSCs exercem seu efeito imunomodulador pela via parácrina (através de fatores solúveis presentes no CM) ou via contato célula-célula (através das proteínas de membrana contidas nas MP).

Estudos anteriores demonstraram o efeito imunomodulador das MSCs e do CM em diferentes modelos de colite, nos quais estes tratamentos foram efetivos em diminuir a severidade e a atividade da doença (124–130). No presente trabalho, observamos que as MP conservam a maior parte dos benefícios terapêuticos do tratamento com MSC: elas são capazes de reduzir tanto os sinais clínicos (como atividade da doença e perda de peso), quanto os sinais histológicos (escore histológico de inflamação, infiltração por linfócitos na mucosa e apoptose das células do cólon) e moleculares, sendo capazes de diminuir as citocinas pró-inflamatórias IL6 e TNF $\alpha$  no cólon. Estas citocinas são normalmente produzidas por macrófagos na fase inicial da inflamação para promover o recrutamento das demais células imunes, portanto, a diminuição dos níveis destas citocinas resulta em uma menor inflamação e dano ao tecido. Além disso, as MP, por possuírem tamanho de no máximo 200nm, possuem dimensão física otimizada para administração intravenosa, reduzindo os riscos tromboembólicos associados ao transplante de MSC íntegras. Neste sentido, as MP se apresentam como uma alternativa segura e eficaz ao uso das MSCs íntegras.

Animais tratados com CM também apresentaram melhora dos sinais clínicos, histológicos e moleculares, e sua administração também é considerada segura devido a seu conteúdo se tratar de fatores bio-solúveis. Estudos futuros também podem investigar se o tratamento com CM e MP, se administrados de forma combinada (com as MP diluídas em CM ao invés de em veículo), potencializaria o efeito terapêutico destas terapias livres de células.

Tanto o CM quanto as MP podem ser preparados em grandes quantidades meses ou anos previamente à administração nos pacientes, desde que conservados adequadamente a -80°C. Esta é uma grande vantagem sobre as MSCs íntegras, pois estas necessitam ser cultivadas por alguns dias antes de serem transplantadas (para verificar se as células estão viáveis), enquanto que as MP e o CM poderiam ser descongelados e administrados imediatamente por infusão intravenosa em um

paciente. Tal processo tornaria a terapia celular, utilizando MP ou CM, uma alternativa de baixo custo em relação ao uso de MSCs, devido a sua praticidade e devido a estas requererem menores quantidades de recursos materiais e técnicos para preparo dos tratamentos.

Por fim, a ativação da via CAIP por ultrassom terapêutico, assim como o transplante intravenoso de MP ou CM, se provados eficazes em seres humanos, podem vir a ser opções menos invasivas para o tratamento das DII. Estes tratamentos poderiam ser realizados de forma rotineira na atenção básica, na unidade de saúde do bairro de residência do paciente, sem necessidade que o mesmo se dirija à um hospital. Tal facilidade poderia assegurar também uma maior adesão ao tratamento por parte dos pacientes com DII. Entretanto, mais estudos são necessários para investigar a respeito da efetividade destas terapias em seres humanos.

## 7. CONCLUSÕES

A partir de ambos os artigos escritos e concluídos no decorrer deste doutorado (constantes nos Capítulos I e II), é possível concluir que:

- a) A revisão da literatura demonstra que a ativação da via anti-inflamatória (CAIP) em modelos pré-clínicos promove efeitos terapêuticos principalmente através da inibição da ativação dos macrófagos no baço e no intestino. A estimulação da CAIP pelo ultrassom terapêutico se apresenta como uma potencial alternativa não-invasiva para o tratamento das DII, o que contribuiria significativamente para a aderência dos pacientes ao tratamento;
- b) A terapia celular com partículas de membrana de células estromais mesenquimais (MP), bem como seu meio condicionado (CM), conserva a maior parte dos benefícios terapêuticos das células estromais mesenquimais íntegras (MSC) no modelo de colite ulcerativa;
- c) Tanto os tratamentos com MP quanto com CM foram capazes de diminuir o índice de atividade da doença na colite experimental, bem como a perda de peso corporal, assim como o tratamento com as MSCs íntegras;
- d) A análise do escore histológico de inflamação demonstrou que os tratamentos com CM, MP e MSC foram capazes de reduzir a inflamação quando comparados com o grupo não tratado (DSS), sendo que o grupo MP apresentou o menor escore de inflamação;
- e) Na análise de citocinas utilizando homogeneizado de tecido do cólon, o tratamento com MSC foi o único capaz de reduzir os níveis de todos os 6 marcadores pró-inflamatórios analisados (IL4, IL5, IL6, IFN $\gamma$ , IL12p70 e TNF $\alpha$ ). Adicionalmente, o tratamento com CM foi efetivo para diminuir os níveis de IL4 e IL6, enquanto que o tratamento com MP foi efetivo para diminuir os níveis de IL6 e TNF $\alpha$ , indicando que estes tratamentos podem estar atuando em vias diferentes para a redução da inflamação neste modelo de colite;
- f) A análise de RT-qPCR demonstrou que o tratamento com MSCs reduziu a expressão das proteínas de barreira epitelial intestinal claudina 2 e da ocludina, enquanto que a terapia com MP reduziu a expressão da ocludina;
- g) A análise histológica com coloração de *alcian blue* demonstrou que os tratamentos com CM, MP e MSC foram capazes de aumentar a preservação das mucinas associadas às células caliciformes no cólon, sendo que o grupo tratado com CM foi o que demonstrou a maior porcentagem de tecido positivo para as mucinas;

- h) A análise imuno-histoquímica demonstrou que os tratamentos com CM e MP, assim como o tratamento com MSCs íntegras, foram efetivos em reduzir a quantidade de células apoptóticas e de infiltração de linfócitos T CD3+ no cólon, demonstrando que as MP e o CM podem ser alternativas viáveis às MSCs para diminuir estes marcadores de inflamação.
- i) Como conclusão geral, nossos resultados sugerem que as MP conservam a maior parte das propriedades imunomodulatórias da terapia com MSCs íntegras, como demonstrado nos parâmetros de IAD, perda de peso, infiltração de linfócitos e células apoptóticas no cólon, dentre outros marcadores avaliados. Neste sentido, as MP se apresentam como uma potencial alternativa para o tratamento das DII, que poderá ser mais profundamente estudada nos modelos de DII e em outros modelos de doenças inflamatórias.

## **8. PERSPECTIVAS**

Inicialmente temos como perspectivas explorar os efeitos imunomoduladores das partículas de membrana de células estromais mesenquimais no modelo animal de doença de Crohn, com o objetivo de avaliar se o mesmo mecanismo observado no modelo de colite pode ser reproduzido nesta doença que, embora promova inflamação intestinal, apresenta algumas diferenças fisiopatológicas, como o aumento da atividade das células T do tipo Th1, com produção excessiva das citocinas IL12 e IFN $\gamma$ . Além disso, os princípios utilizados neste trabalho poderão ser transpostos para outras doenças inflamatórias, o que possibilitará o desenvolvimento de novos projetos que avaliem o efeito anti-inflamatório das MP.

A partir do desenvolvimento de mais estudos pré-clínicos com comprovada eficácia da metodologia aqui proposta, esperamos que estudos clínicos prospectivos possam ser desenvolvidos buscando efeito na qualidade de vida, sintomas e mortalidade dos pacientes afetados por doenças inflamatórias intestinais.

## 9. REFERÊNCIAS

1. Oka A, Sartor RB. Microbial-Based and Microbial-Targeted Therapies for Inflammatory Bowel Diseases. *Dig Dis Sci* (2020) **65**:757–788. doi:10.1007/s10620-020-06090-z. Microbial-Based
2. Moum B, Hovde Ø, Høivik ML. What have we learnt about the role of the environment and natural course of IBD in the new millennium? 20-year follow-up of the IBSEN cohort. *Dig Dis* (2014) **32**:2–9. doi:10.1159/000367818
3. Gasparini RG, Sasaki LY, Saad-Hossne R. Inflammatory bowel disease epidemiology in São Paulo State, Brazil. *Clin Exp Gastroenterol* (2018) **11**:423–429. doi:10.2147/CEG.S176583
4. Zaltman C, Parra RS, Sasaki LY, Santana GO, de Lourdes Abreu Ferrari M, Miszputen SJ, Amarante HMBS, Kaiser RL, Flores C, Catapani WR, et al. Real-world disease activity and sociodemographic, clinical and treatment characteristics of moderate-to-severe inflammatory bowel disease in Brazil. *World J Gastroenterol* (2021) **27**:208–223. doi:10.3748/WJG.V27.I2.208
5. Kotze P, Steinwurz F, Francisconi C, Zaltman C, Pinheiro M, Salese L, de Leon D. Review of the epidemiology and burden of ulcerative colitis in Latin America. *Therap Adv Gastroenterol* (2020) Available at: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7350039/pdf/10.1177\\_1756284820931739.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7350039/pdf/10.1177_1756284820931739.pdf) [Accessed September 21, 2020]
6. Ghouri YA, Tahan V, Shen B. Secondary causes of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* (2020) **26**:3998–4017. doi:10.3748/wjg.v26.i28.3998
7. Longo S, Chieppa M, Cossa LG, Spinelli CC, Greco M, Maffia M, Giudetti AM. New insights into inflammatory bowel diseases from proteomic and lipidomic studies. *Proteomes* (2020) **8**:1–16. doi:10.3390/PROTEOMES8030018
8. Amoroso C, Perillo F, Strati F, Fantini M, Caprioli F, Facciotti F. The Role of Gut Microbiota Biomodulators on Mucosal Immunity and Intestinal Inflammation. *Cells* (2020) **9**:1–24. doi:10.3390/cells9051234
9. Narula N, Wong ECL, Dehghan M, Mente A, Rangarajan S, Lanan F, Lopez-Jaramillo P,

- Rohatgi P, Lakshmi PVM, Varma RP, et al. Association of ultra-processed food intake with risk of inflammatory bowel disease: Prospective cohort study. *BMJ* (2021) **374**: doi:10.1136/bmj.n1554
10. Bujtor M, Turner AI, Torres SJ, Esteban-Gonzalo L, Pariante CM, Borsini A. Associations of dietary intake on biological markers of inflammation in children and adolescents: A systematic review. *Nutrients* (2021) **13**:1–29. doi:10.3390/nu13020356
  11. Argollo M, Fiorino G, Hindryckx P, Peyrin-Biroulet L, Danese S. Novel therapeutic targets for inflammatory bowel disease. *J Autoimmun* (2017) **85**:103–116. doi:10.1016/j.jaut.2017.07.004
  12. Antonioli L, Catalan-Serra I, Castele N Vande, Lim SZ, Wee Chua E. Revisiting the Role of Thiopurines in Inflammatory Bowel Disease Through Pharmacogenomics and Use of Novel Methods for Therapeutic Drug Monitoring. (2018) doi:10.3389/fphar.2018.01107
  13. Peyrin-Biroulet L, Sandborn W, Sands BE, Reinisch W, Bemelman W, Bryant R V., D'Haens G, Dotan I, Dubinsky M, Feagan B, et al. Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target. *Am J Gastroenterol* (2015) **110**:1324–1338. doi:10.1038/ajg.2015.233
  14. Rubin DT, Ananthakrishnan AN, Siegel CA, Sauer BG, Long MD. ACG Clinical Guideline: Ulcerative Colitis in Adults. *Am J Gastroenterol* (2019) **114**:384–413. doi:10.14309/ajg.0000000000000152
  15. Kobayashi T, Siegmund B, Le Berre C, Wei SC, Ferrante M, Shen B, Bernstein CN, Danese S, Peyrin-Biroulet L, Hibi T. Ulcerative colitis. *Nat Rev Dis Prim* (2020) **6**:74. doi:10.1038/s41572-020-0205-x
  16. Zhang J, Zhao Y, Hou T, Zeng H, Kalambhe D, Wang B, Shen X, Huang Y. Macrophage-based nanotherapeutic strategies in ulcerative colitis. *J Control Release* (2020) **320**:363–380. doi:10.1016/j.jconrel.2020.01.047
  17. Wéra O, Lancellotti P, Oury C. The Dual Role of Neutrophils in Inflammatory Bowel Diseases. *J Clin Med* (2016) **5**:118. doi:10.3390/jcm5120118
  18. Bressenot A, Salleron J, Bastien C, Danese S, Boulagnon-Rombi C, Peyrin-Biroulet L.



- Comparing histological activity indexes in UC. *Gut* (2015) **64**:1412–1418. doi:10.1136/gutjnl-2014-307477
19. Giuffrida P, Corazza GR, Di Sabatino A. Old and New Lymphocyte Players in Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci* (2018) **63**:277–288. doi:10.1007/s10620-017-4892-4
  20. Zheng W-P, Flavell RA. The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. *Cell* (1997) **89**:587–596. doi:10.1016/S0030-6657(08)70226-9
  21. Popp V, Gerlach K, Mott S, Turowska A, Garn H, Atreya R, Lehr HA, Ho IC, Renz H, Weigmann B, et al. Rectal Delivery of a DNzyme That Specifically Blocks the Transcription Factor GATA3 and Reduces Colitis in Mice. *Gastroenterology* (2017) **152**:176-192.e5. doi:10.1053/j.gastro.2016.09.005
  22. Nemeth ZH, Bogdanovski DA, Barratt-Stopper P, Paglinco SR, Antonioli L, Rolandelli RH. Crohn's Disease and Ulcerative Colitis Show Unique Cytokine Profiles. *Cureus* (2017) **9**: doi:10.7759/cureus.1177
  23. Rosen MJ, Karns R, Vallance JE, Bezold R, Waddell A, Collins MH, Haberman Y, Minar P, Baldassano RN, Hyams JS, et al. Mucosal Expression of Type 2 and Type 17 Immune Response Genes Distinguishes Ulcerative Colitis From Colon-Only Crohn's Disease in Treatment-Naive Pediatric Patients. *Gastroenterology* (2017) **152**:1345-1357.e7. doi:10.1053/j.gastro.2017.01.016
  24. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Bürgel N, Fromm M, et al. Interleukin-13 Is the Key Effector Th2 Cytokine in Ulcerative Colitis That Affects Epithelial Tight Junctions, Apoptosis, and Cell Restitution. *Gastroenterology* (2005) **129**:550–564. doi:10.1053/j.gastro.2005.05.002
  25. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* (2009) **9**:799–809. doi:10.1038/nri2653
  26. Clough JN, Omer OS, Tasker S, Lord GM, Irving PM. Regulatory T-cell therapy in Crohn's disease: Challenges and advances. *Gut* (2020) **69**:942–952. doi:10.1136/gutjnl-2019-319850

27. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* (2003) **52**:65–70. doi:10.1136/gut.52.1.65
28. De Souza HSP, Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: Current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* (2016) **13**:13–27. doi:10.1038/nrgastro.2015.186
29. Breugelmans T, Van Spaendonk H, De Man JG, De Schepper HU, Jauregui-Amezaga A, Macken E, Lindén SK, Pintelon I, Timmermans JP, De Winter BY, et al. In-depth study of transmembrane mucins in association with intestinal barrier dysfunction during the course of cell transfer and dss-induced colitis. *J Crohn's Colitis* (2020) **14**:974–994. doi:10.1093/ECCO-JCC/JJAA015
30. Yamada T, Hino S, Iijima H, Genda T, Aoki R, Nagata R, Han KH, Hirota M, Kinashi Y, Oguchi H, et al. Mucin O-glycans facilitate symbiosynthesis to maintain gut immune homeostasis. *EBioMedicine* (2019) **48**:513–525. doi:10.1016/j.ebiom.2019.09.008
31. Burrello C, Giuffrè MR, Macandog AD, Diaz-Basabe A, Cribiù FM, Lopez G, Borgo F, Nezi L, Caprioli F, Vecchi M, et al. Fecal microbiota transplantation controls murine chronic intestinal inflammation by modulating immune cell functions and gut microbiota composition. *Cells* (2019) **8**: doi:10.3390/cells8060517
32. Xu Y ming, Gao Q, Zhang J zhao, Lu Y tao, Xing D ming, Qin Y qing, Fang J. Prolyl hydroxylase 3 controls the intestine goblet cell generation through stabilizing ATOH1. *Cell Death Differ* (2020) **27**:2131–2142. doi:10.1038/s41418-020-0490-7
33. Earley H, Lennon G, Balfe Á, Coffey JC, Winter DC, O'Connell PR. The abundance of Akkermansia muciniphila and its relationship with sulphated colonic mucins in health and ulcerative colitis. *Sci Rep* (2019) **9**:1–9. doi:10.1038/s41598-019-51878-3
34. Costa CARA, Quaglio AEV, Di Stasi LC. Pfaffia paniculata (Brazilian ginseng) extract modulates Mapk and mucin pathways in intestinal inflammation. *J Ethnopharmacol* (2018) **213**:21–25. doi:10.1016/j.jep.2017.10.009
35. Schroeder BO. Fight them or feed them: How the intestinal mucus layer manages the gut microbiota. *Gastroenterol Rep* (2019) **7**:3–12. doi:10.1093/gastro/goy052

36. Zolotova NA, Polikarpova A V., Khochanskii DN, Makarova O V., Mikhailova LP. Expression of Mucins and Claudins in the Colon during Acute and Chronic Experimental Colitis. *Bull Exp Biol Med* (2018) **165**:434–437. doi:10.1007/s10517-018-4187-6
37. Van Der Post S, Jabbar KS, Birchenough G, Arike L, Akhtar N, Sjovall H, Johansson MEV, Hansson GC. Structural weakening of the colonic mucus barrier is an early event in ulcerative colitis pathogenesis. *Gut* (2019) **68**:2142–2151. doi:10.1136/gutjnl-2018-317571
38. Cornick S, Kumar M, Moreau F, Gaisano H, Chadee K. VAMP8-mediated MUC2 mucin exocytosis from colonic goblet cells maintains innate intestinal homeostasis. *Nat Commun* (2019) **10**: doi:10.1038/s41467-019-11811-8
39. Pelaseyed T, Bergstrom JH, Gystafsson JK, Ermund A, Birchenough G, Schutte A, Van Der Post S, Svensson F, Rodríguez-Piñeiro A, Nystrom E, et al. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev* (2014) **260**:87–107. doi:10.1111/imr.12182.The
40. Su L, Nalle SC, Shen L, Turner ES, Singh G, Breskin LA, Khramtsova EA, Khramtsova G, Tsai PY, Fu YX, et al. TNFR2 activates mlck-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis. *Gastroenterology* (2013) **145**:407–415. doi:10.1053/j.gastro.2013.04.011
41. Hernandez-Chirlaque C, Aranda CJ, Ocón B, Capitán-Cañadas F, Ortega-González M, Carrero JJ, Suárez MD, Zarzuelo A, de Medina FS, Martínez-Augustin O. Germ-free and antibiotic-treated mice are highly susceptible to epithelial injury in DSS colitis. *J Crohn's Colitis* (2016)1–16. doi:10.1093/ecco-jcc/jjw096
42. Sharma D, Malik A, Guy CS, Karki R, Vogel P, Kanneganti TD. Pypin Inflammasome Regulates Tight Junction Integrity to Restrict Colitis and Tumorigenesis. *Gastroenterology* (2018) **154**:948-964.e8. doi:10.1053/j.gastro.2017.11.276
43. Guo G, Shi F, Zhu J, Shao Y, Gong W, Zhou G, Wu H, She J, Shi W. Piperine, a functional food alkaloid, exhibits inhibitory potential against TNBS-induced colitis via the inhibition of IκB-α/NF-κB and induces tight junction protein (claudin-1, occludin, and ZO-1) signaling pathway in

- experimental mice. *Hum Exp Toxicol* (2020) **39**:477–491. doi:10.1177/0960327119892042
44. Fei L, Xu K. Zhikang Capsule ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis by inhibition of inflammation, apoptosis, oxidative stress and MyD88-dependent TLR4 signaling pathway. *J Ethnopharmacol* (2016) **192**:236–247. doi:10.1016/j.jep.2016.07.055
45. Farraye FA, Melmed GY, Lichtenstein GR, Kane S V. ACG Clinical Guideline: Preventive Care in Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol* (2017) **112**:241–258. doi:10.1038/ajg.2016.537
46. Wolford DD, Fichera A. Prophylaxis of Crohn's disease recurrence: A surgeon's perspective. *Ann Gastroenterol Surg* (2020) **4**:514–520. doi:10.1002/ags3.12368
47. Gomes JP, Watad A, Shoenfeld Y. Nicotine and autoimmunity: The lotus' flower in tobacco. *Pharmacol Res* (2018) **128**:101–109. doi:10.1016/j.phrs.2017.10.005
48. Bonaz B, Sinniger V, Pellissier S. Vagus nerve stimulation: a new promising therapeutic tool in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* (2017) **282**:46–63. doi:10.1111/joim.12611
49. Murray K, Reardon C. The cholinergic anti-inflammatory pathway revisited. *Neurogastroenterol Motil* (2018) **30**:0–3. doi:10.1111/nmo.13288
50. Koopman FA, Chavan SS, Miljko S, Grazio S, Sokolovic S, Schuurman PR, Mehta AD, Levine YA, Faltys M, Zitnik R, et al. Vagus nerve stimulation inhibits cytokine production and attenuates disease severity in Rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2016) **113**:8284–8289. doi:10.1073/pnas.1605635113
51. Inoue T, Abe C, Sung SSJ, Moscalu S, Jankowski J, Huang L, Ye H, Rosin DL, Guyenet PG, Okusa MD. Vagus nerve stimulation mediates protection from kidney ischemia-reperfusion injury through  $\alpha 7$ nAChR+ splenocytes. *J Clin Invest* (2016) **126**:1939–1952. doi:10.1172/JCI83658
52. Ji H, Rabbi MF, Labis B, Pavlov VA, Tracey KJ, Ghia J-E. Central cholinergic activation of a vagus nerve-to spleen circuit alleviates experimental colitis HHS Public Access. *Mucosal Immunol* (2014) **7**:335–347. doi:10.1038/mi.2013.52
53. Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, DiRaimo R, Ulloa L, Yang H, Sudan S, Czura CJ, Ivanova

- SM, Tracey KJ. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Exp Med* (2002) **195**:781–788. doi:10.1084/jem.20011714
54. Borovikova L V, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. (2000). Available at: [www.nature.com](http://www.nature.com) [Accessed September 23, 2020]
55. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Ina - insight Rev Artic* (2002) **420**:853–859.
56. Fujii T, Watanabe Y, Inoue T, Kawashima K. Upregulation of mRNA encoding the M5 muscarinic acetylcholine receptor in human T- and B-lymphocytes during immunological responses. *Neurochem Res* (2003) **28**:423–429. doi:10.1023/A:1022840416292
57. Kruse AC, Kobilka BK, Gautam D, Sexton PM, Christopoulos A, Wess J. Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development. *Nat Rev Drug Discov* (2014) **13**:549–560. doi:10.1038/nrd4295
58. Gatta V, Mengod G, Reale M, Tata AM. Possible Correlation between Cholinergic System Alterations and Neuro/Inflammation in Multiple Sclerosis. *Biomedicines* (2020) doi:10.3390/biomedicines8060153
59. Kawashima K, Fujii T, Moriwaki Y, Misawa H, Horiguchi K. Non-neuronal cholinergic system in regulation of immune function with a focus on  $\alpha 7$  nAChRs. *Int Immunopharmacol* (2015) **29**:127–134. doi:10.1016/j.intimp.2015.04.015
60. Wang H, Yu M, Ochani M, Amelia CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang N, Ulloa L, et al. Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* (2003) **421**:384–388. doi:10.1038/nature01339
61. Huston JM, Ochani M, Rosas-Ballina M, Liao H, Ochani K, Pavlov VA, Gallowitsch-Puerta M, Ashok M, Czura CJ, Foxwell B, et al. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J Exp Med* (2006) **203**:1623–1629. doi:10.1084/jem.20052362
62. Uni R, Inoue T, Nakamura Y, Fukaya D, Hasegawa S, Wu CH, Fujii R, Surattichaiyakul B, Peerapanyasut W, Ozeki A, et al. Vagus nerve stimulation even after injury ameliorates

- cisplatin-induced nephropathy via reducing macrophage infiltration. *Sci Rep* (2020) **10**:9472.  
doi:10.1038/s41598-020-66295-0
63. Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Sergio I, Valdés- Ferrer YAL, Reardon C, Tusche MW, Pavlov VA, Andersson U, Chavan S, Mak TW, et al. Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit. *Science* (80- ) (2011) **334**:98–101.  
doi:10.1126/science.1209985.Acetylcholine-Synthesizing
64. Berthoud HR, Powley TL. Interaction between parasympathetic and sympathetic nerves in prevertebral ganglia: Morphological evidence for vagal efferent innervation of ganglion cells in the rat. *Microsc Res Tech* (1996) **35**:80–86. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19960901)35:1<80::AID-JEMT7>3.0.CO;2-W
65. Matteoli G, Gomez-Pinilla PJ, Nemethova A, Giovangiulio M Di, Cailotto C, Van Bree SH, Michel K, Tracey KJ, Schemann M, Boesmans W, et al. A distinct vagal anti-inflammatory pathway modulates intestinal muscularis resident macrophages independent of the spleen. *Gut* (2014) **63**:938–948. doi:10.1136/gutjnl-2013-304676
66. Verheijden S, Boeckxstaens GE. Neuroimmune interaction and the regulation of intestinal immune homeostasis. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* (2018) **314**:G75–G80.  
doi:10.1152/ajpgi.00425.2016
67. de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, Berthoud HR, Uematsu S, Akira S, van den Wijngaard RM, et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol* (2005) **6**:844–851. doi:10.1038/ni1229
68. Matteoli G, Gomez-Pinilla PJ, Nemethova A, Giovangiulio M Di, Cailotto C, Van Bree SH, Michel K, Tracey KJ, Schemann M, Boesmans W, et al. A distinct vagal anti-inflammatory pathway modulates intestinal muscularis resident macrophages independent of the spleen. *Gut* (2014) **63**:938–948. doi:10.1136/gutjnl-2013-304676
69. Carrington E V., Evers J, Grossi U, Dinning PG, Scott SM, O’Connell PR, Jones JFX, Knowles CH. A systematic review of sacral nerve stimulation mechanisms in the treatment of fecal incontinence and constipation. *Neurogastroenterol Motil* (2014) **26**:1222–1237.

- doi:10.1111/nmo.12388
70. Tu L, Gharibani P, Yin J, Chen JDZ. Sacral nerve stimulation ameliorates colonic barrier functions in a rodent model of colitis. *Neurogastroenterol Motil* (2020) **32**: doi:10.1111/nmo.13916
  71. Guo J, Jin H, Shi Z, Yin J, Pasricha T, Chen JDZ. Sacral nerve stimulation improves colonic inflammation mediated by autonomic-inflammatory cytokine mechanism in rats. *Neurogastroenterol Motil* (2019) **31**: doi:10.1111/nmo.13676
  72. Pasricha TS, Zhang H, Zhang N, Chen JDZ. Sacral nerve stimulation prompts vagally-mediated amelioration of rodent colitis. *Physiol Rep* (2020) **8**:1–7. doi:10.14814/phy2.14294
  73. Ye Z, Zhu Y, Tang N, Zhao X, Jiang J, Ma J, Zhang H.  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 attenuates DSS-induced intestinal colitis by improving intestinal mucosal barrier function. *Mol Med* (2022) **28**: doi:10.1186/s10020-022-00485-6
  74. Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *npj Regen Med* (2019) **4**: doi:10.1038/s41536-019-0083-6
  75. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* (2006) **8**:315–317. doi:10.1080/14653240600855905
  76. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytom Part A* (2018) **93**:19–31. doi:10.1002/cyto.a.23242
  77. Eggenhofer E, Luk F, Dahlke MH, Hoogduijn MJ. The life and fate of mesenchymal stem cells. *Front Immunol* (2014) **5**:1–7. doi:10.3389/fimmu.2014.00148
  78. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* (2008) **8**:726–736. doi:10.1038/nri2395
  79. Amorin B, Alegretti AP, Valim V, Pezzi A, Laureano AM, da Silva MAL, Wieck A, Silla L.

- Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease: a review. *Hum Cell* (2014) **27**:137–150. doi:10.1007/s13577-014-0095-x
80. Wise AF, Williams TM, Kiewiet MBG, Payne NL, Siatskas C, Samuel CS, Ricardo SD. Human mesenchymal stem cells alter macrophage phenotype and promote regeneration via homing to the kidney following ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol - Ren Physiol* (2014) **306**:1222–1235. doi:10.1152/ajprenal.00675.2013
81. Wei ST, Huang YC, Chiang JY, Lin CC, Lin YJ, Shyu WC, Chen HC, Hsieh CH. Gain of CXCR7 function with mesenchymal stem cell therapy ameliorates experimental arthritis via enhancing tissue regeneration and immunomodulation. *Stem Cell Res Ther* (2021) **12**:1–19. doi:10.1186/s13287-021-02402-w
82. Shen Z, Huang W, Liu J, Tian J, Wang S, Rui K. Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes on Autoimmune Diseases. *Front Immunol* (2021) **12**: doi:10.3389/fimmu.2021.749192
83. Staff N, Jones D, Singer W. Mesenchymal Stromal Cell Therapies for Neurodegenerative Diseases. *Mayo Clin Proc* (2019) **94**:892–905. doi:10.1016/j.mayocp.2019.01.001
84. Tieu A, Hu K, Gnyra C, Montroy J, Fergusson DA, Allan DS, Stewart DJ, Thébaud B, Lalu MM. Mesenchymal stromal cell extracellular vesicles as therapy for acute and chronic respiratory diseases: A meta-analysis. *J Extracell Vesicles* (2021) **10**: doi:10.1002/jev2.12141
85. Hu C, Wu Z, Li L. Mesenchymal stromal cells promote liver regeneration through regulation of immune cells. *Int J Biol Sci* (2020) **16**:893–903. doi:10.7150/ijbs.39725
86. Fan H, Zhao G, Liu L, Liu F, Gong W, Liu X, Yang L, Wang J, Hou Y. Pre-treatment with IL-1 $\beta$  enhances the efficacy of MSC transplantation in DSS-induced colitis. *Cell Mol Immunol* (2012) **9**:473–481. doi:10.1038/cmi.2012.40
87. Watanabe S, Arimura Y, Nagaishi K, Isshiki H, Onodera K, Nasuno M, Yamashita K, Idogawa M, Naishiro Y, Murata M, et al. Conditioned mesenchymal stem cells produce pleiotropic gut trophic factors. *J Gastroenterol* (2014) **49**:270–282. doi:10.1007/s00535-013-0901-3
88. da Costa Gonçalves F, Grings M, Nunes NS, Pinto FO, Garcez TNA, Visioli F, Leipnitz G, Paz



- AH. Antioxidant properties of mesenchymal stem cells against oxidative stress in a murine model of colitis. *Biotechnol Lett* (2017) **39**:613–622. doi:10.1007/s10529-016-2272-3
89. Gonçalves F da C, Schneider N, Pinto FO tesbelgu., Meyer FS, Visioli F, Pfaffenseller B, Lopez PL da C, Passos EP andolf., Cirne-Lima EO bin., Meurer L, et al. Intravenous vs intraperitoneal mesenchymal stem cells administration: what is the best route for treating experimental colitis? *World J Gastroenterol* (2014) **20**:18228–18239. doi:10.3748/wjg.v20.i48.18228
90. Gonçalves F da C, Serafini M, Mello HF, Pfaffenseller B, Araújo AB, Visioli F, Paz. Bioactive factors secreted from mesenchymal stromal cells protect the intestines from experimental colitis in a three-dimensional culture. (2018) doi:10.1016/j.jcyt.2018.06.007
91. Heidari M, Pouya S, Baghaei K, Aghdaei HA, Namaki S, Zali MR, Hashemi SM. The immunomodulatory effects of adipose-derived mesenchymal stem cells and mesenchymal stem cells-conditioned medium in chronic colitis. *J Cell Physiol* (2018) **233**:8754–8766. doi:10.1002/jcp.26765
92. Wu Q, Xie S, Zhu Y, Chen J, Tian J, Xiong S, Wu C, Ye Y, Peng Y. Wogonin Strengthens the Therapeutic Effects of Mesenchymal Stem Cells in DSS-Induced Colitis via Promoting IL-10 Production. *Oxid Med Cell Longev* (2021) **2021**: doi:10.1155/2021/5527935
93. Forbes GM. Mesenchymal Stromal Cell Therapy in Crohn's Disease. *Dig Dis* (2017) **35**:115–122. doi:10.1159/000449091
94. Hoogduijn MJ, Betjes MGH, Baan CC. Mesenchymal stromal cells for organ transplantation: Different sources and unique characteristics? *Curr Opin Organ Transplant* (2014) **19**:41–46. doi:10.1097/MOT.0000000000000036
95. Luk F, De Witte SFH, Korevaar SS, Roemeling-Van Rhijn M, Franquesa M, Strini T, Van Den Engel S, Gargasha M, Roy D, Dor FJMF, et al. Inactivated mesenchymal stem cells maintain immunomodulatory capacity. *Stem Cells Dev* (2016) **25**:1342–1354. doi:10.1089/scd.2016.0068
96. Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, Laine GA, Cox CS. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: The pulmonary

- first-pass effect. *Stem Cells Dev* (2009) **18**:683–691. doi:10.1089/scd.2008.0253
97. Lu W, Fu C, Song L, Yao Y, Zhang X, Chen Z, Li Y, Ma G, Shen C. Exposure to supernatants of macrophages that phagocytized dead mesenchymal stem cells improves hypoxic cardiomyocytes survival. *Int J Cardiol* (2013) **165**:333–340. doi:10.1016/j.ijcard.2012.03.088
98. de Witte SFH, Luk F, Sierra Parraga JM, Gargasha M, Merino A, Korevaar SS, Shankar AS, O'Flynn L, Elliman SJ, Roy D, et al. Immunomodulation By Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells (MSC) Is Triggered Through Phagocytosis of MSC By Monocytic Cells. *Stem Cells* (2018) **36**:602–615. doi:10.1002/stem.2779
99. Guangwen Ren, Xin Zhao, Liying Zhang, Jimin Zhang AL, Ling W. Inflammatory Cytokine-Induced Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Mesenchymal Stem Cells Are Critical for Immunosuppression. *J Immunol* (2010) **184**:2321–2328. doi:10.4049/jimmunol.0902023.Inflammatory
100. Del Papa B, Sportoletti P, Cecchini D, Rosati E, Balucani C, Baldoni S, Fettucciari K, Marconi P, Martelli MF, Falzetti F, et al. Notch1 modulates mesenchymal stem cells mediated regulatory T-cell induction. *Eur J Immunol* (2013) **43**:182–187. doi:10.1002/eji.201242643
101. Gieseke F, Böhringer J, Bussolari R, Dominici M, Handgretinger R, Müller I. Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Blood* (2010) **116**:3770–3779. doi:10.1182/blood-2010-02-270777
102. Yi T, Song SU. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res* (2012) **35**:213–221. doi:10.1007/s12272-012-0202-z
103. Li N, Hua J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cell Mol Life Sci* (2017) **74**:2345–2360. doi:10.1007/s00018-017-2473-5
104. Liu F, Qiu H, Xue M, Zhang S, Zhang X, Xu J, Chen J, Yang Y, Xie J. MSC-secreted TGF- $\beta$  regulates lipopolysaccharide-stimulated macrophage M2-like polarization via the Akt / FoxO1 pathway. (2019)1–14.
105. Wang C, Chen J, Sun L, Liu Y. TGF-beta signaling-dependent alleviation of dextran sulfate sodium-induced colitis by mesenchymal stem cell transplantation. *Mol Biol Rep* (2014)

41:4977–4983. doi:10.1007/s11033-014-3364-6

106. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: Central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* (2009) **113**:6576–6583. doi:10.1182/blood-2009-02-203943
107. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Robey PG, Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* (2009) **15**:42–49. doi:10.1038/nm.1905
108. Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol* (2012) **12**:383–396. doi:10.1038/nri3209
109. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: Role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* (2008) **111**:1327–1333. doi:10.1182/blood-2007-02-074997
110. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* (2006) **107**:367–372. doi:10.1182/blood-2005-07-2657
111. De Witte SFH, Merino AM, Franquesa M, Strini T, Van Zoggel JAA, Korevaar SS, Luk F, Garghesha M, O'Flynn L, Roy D, et al. Cytokine treatment optimises the immunotherapeutic effects of umbilical cord-derived MSC for treatment of inflammatory liver disease. *Stem Cell Res Ther* (2017) **8**:1–12. doi:10.1186/s13287-017-0590-6
112. Gonçalves FDC, Luk F, Korevaar SS, Bouzid R, Paz AH, López-Iglesias C, Baan CC, Merino A, Hoogduijn MJ. Membrane particles generated from mesenchymal stromal cells modulate immune responses by selective targeting of pro-inflammatory monocytes. *Sci Rep* (2017) **7**:1–13. doi:10.1038/s41598-017-12121-z
113. Krueger TEG, Thorek DLJ, Denmeade SR, Isaacs JT, Brennen WN. Concise Review: Mesenchymal Stem Cell-Based Drug Delivery: The Good, the Bad, the Ugly, and the Promise.

114. da Costa Gonçalves F, Korevaar SS, Ortiz Virumbrales M, Baan CC, Reinders MEJ, Merino A, Lombardo E, Hoogduijn MJ. Mesenchymal Stromal Cell Derived Membrane Particles Are Internalized by Macrophages and Endothelial Cells Through Receptor-Mediated Endocytosis and Phagocytosis. *Front Immunol* (2021) **12**: doi:10.3389/fimmu.2021.651109
115. Merino A, Sablik M, Korevaar SS, López-Iglesias C, Ortiz-Virumbrales M, Baan CC, Lombardo E, Hoogduijn MJ. Membrane Particles Derived From Adipose Tissue Mesenchymal Stromal Cells Improve Endothelial Cell Barrier Integrity. *Front Immunol* (2021) **12**:1–13. doi:10.3389/fimmu.2021.650522
116. Borovikova L V., Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* (2000) **405**:458–462. doi:10.1038/35013070
117. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* (2002) **420**:853–859. doi:10.1038/nature01321
118. Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, Diraimo R, Ulloa L, Yang H, Sudan S, Czura CJ, Ivanova SM, Tracey KJ. Pharmacological Stimulation of the Cholinergic Antiinflammatory Pathway. Rockefeller University Press (2002). Available at: <http://www.jem.org/cgi/content/full/195/6/781> [Accessed September 23, 2020]
119. Koopman FA, Chavan SS, Miljko S, Grazio S, Sokolovic S, Schuurman PR, Mehta AD, Levine YA, Faltys M, Zitnik R, et al. Vagus nerve stimulation inhibits cytokine production and attenuates disease severity in rheumatoid arthritis. doi:10.1073/pnas.1605635113
120. Ji H, Rabbi MF, Labis B, Pavlov VA, Tracey KJ, Ghia J-E. Central cholinergic activation of a vagus nerve-to spleen circuit alleviates experimental colitis HHS Public Access. *Mucosal Immunol* (2014) **7**:335–347. doi:10.1038/mi.2013.52
121. Nunes NS, Chandran P, Sundby M, Visioli F, da Costa Gonçalves F, Burks SR, Paz AH, Frank JA. Therapeutic ultrasound attenuates DSS-induced colitis through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *EBioMedicine* (2019) **45**:495–510. doi:10.1016/j.ebiom.2019.06.033
122. Dave M, Mehta K, Luther J, Baruah A, Dietz AB, Faubion WA. Mesenchymal Stem Cell

- Therapy for Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analysis HHS Public Access. *Inflamm Bowel Dis* (2015) **21**:2696–2707. doi:10.1097/MIB.0000000000000543
123. Hosseini-Asl SK, Mehrabani D, Karimi-Busheri F. Therapeutic effect of mesenchymal stem cells in ulcerative colitis: A review on Achievements and challenges. *J Clin Med* (2020) **9**:1–17. doi:10.3390/jcm9123922
124. Ando Y, Inaba M, Sakaguchi Y, Tsuda M, Guo KQ, Omae M, Okazaki K, Ikehara S. Subcutaneous adipose tissue-derived stem cells facilitate colonic mucosal recovery from 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis in rats. *Inflamm Bowel Dis* (2008) **14**:826–838. doi:10.1002/ibd.20382
125. Lee HJ, Oh SH, Jang HW, Kwon JH, Lee KJ, Kim CH, Park SJ, Hong SP, Cheon JH, Kim T II, et al. Long-term effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in dextran sulfate sodium-induced murine chronic colitis. *Gut Liver* (2016) **10**:412–419. doi:10.5009/gnl15229
126. Cheng W, Su JL, Hu Y, Huang Q, Shi H, Wang L, Ren JL. Interleukin-25 primed mesenchymal stem cells Achieve better therapeutic effects on dextran sulfate sodium-induced colitis via inhibiting Th17 immune response and inducing T regulatory cell phenotype. *Am J Transl Res* (2017) **9**:4149–4160.
127. Barnhoorn M, De Jonge-Muller E, Molendijk I, Van Gulijk M, Lebbink O, Janson S, Schoonderwoerd M, Van Der Helm D, Van Der Meulen-De Jong A, Hawinkels L, et al. Endoscopic Administration of Mesenchymal Stromal Cells Reduces Inflammation in Experimental Colitis. *Inflamm Bowel Dis* (2018) **24**:1755–1767. doi:10.1093/ibd/izy130
128. Heidari N, Abbasi-Kenarsari H, Namaki S, Baghaei K, Zali MR, Ghaffari Khaligh S, Hashemi SM. Adipose-derived mesenchymal stem cell-secreted exosome alleviates dextran sulfate sodium-induced acute colitis by Treg cell induction and inflammatory cytokine reduction. *J Cell Physiol* (2021) **236**:5906–5920. doi:10.1002/JCP.30275
129. Nikolic A, Simovic Markovic B, Gazdic M, Randall Harrell C, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, L Lukic M, Stojkovic M, et al. Intraperitoneal administration of mesenchymal stem cells ameliorates acute dextran sulfate sodium-induced colitis by suppressing dendritic cells. *Biomed Pharmacother* (2018) **100**:426–432. doi:10.1016/j.biopha.2018.02.060

130. Lim JY, Kim BS, Ryu D Bin, Kim TW, Park G, Min CK. The therapeutic efficacy of mesenchymal stromal cells on experimental colitis was improved by the IFN- $\gamma$  and poly(I:C) priming through promoting the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Stem Cell Res Ther* (2021) **12**:1–13. doi:10.1186/s13287-020-02087-7

**GRUPO DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

**Projeto:** 170003

**Data de Aprovação do Projeto:** 25/01/2017

**Título:** Estudo das partículas de membrana de células-tronco mesenquimais e seu meio condicionado em modelos animais de doenças inflamatórias intestinais

**Data de Término:** 01/03/2019

**Pesquisador Responsável:** ANA HELENA DA ROSA PAZ

**Equipe de pesquisa:**

FABIANY DA COSTA GONCALVES

FABIANY DA COSTA GONCALVES

Submissão	Documento	Especie/Linhagem	Sexo/Idade	Qtd.	Data Reunião	Situação
02/01/2017	APROVAÇÃO	CAMUNDONGO - C57BL/6	M/8-12semanas	40	24/01/2017	APROVADO
02/01/2017	APROVAÇÃO	CAMUNDONGO - BALB/c	M/8-12semanas	50	24/01/2017	APROVADO

**Total de Animais:** 90



Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

10. ANEXO

Carta de aprovação do projeto 20170003