

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E
HEPATOLOGIA

Douglas Fabiano Lenz Nemos

**Avaliação dos efeitos da terapia com células estromais mesenquimais no
sistema nervoso entérico de animais com colite induzida por DSS**

Porto Alegre

2022

Douglas Fabiano Lenz Nemos

Avaliação dos efeitos da terapia com células estromais mesenquimais no sistema nervoso entérico de animais com colite induzida por DSS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Helena da Rosa Paz

Coorientadora: Profa. Dra. Paula Rigon da Luz Soster

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Lenz Nemos , Douglas Fabiano

Avaliação dos efeitos da terapia com células estromais mesenquimais no sistema nervoso entérico de animais com colite induzida por DSS / Douglas Fabiano Lenz Nemos . -- 2022.

63 f.

Orientadora: Ana Helena da Rosa Paz.

Coorientador: Paula Rigon da Luz Soster.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Colite Ulcerativa. 2. Terapia celular. 3. Sistema nervoso entérico. 4. Células estromais mesenquimais. 5. Doenças inflamatórias intestinais. I. da Rosa Paz, Ana Helena, orient. II. Rigon da Luz Soster, Paula, coorient. III. Título.

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

À Cândia Lenz, minha mãe, por tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que em sua infinita misericórdia me concedeu a possibilidade de realizar esse mestrado.

Agradeço a companhia e apoio da minha esposa Laura e meu filho Lucas e dos filhos de quatro patas, Raika, Rubi e Juquinha.

A palavra agradecimento e gratidão não expressam meu verdadeiro sentimento em relação à minha orientadora, Profa. Dra. Ana Helena da Rosa Paz e à minha coorientadora, Profa. Dra. Paula Rigon da Luz Soster pela bondade, apoio, incentivo, paciência e carinho durante toda essa jornada.

Não poderia deixar de citar a contribuição, parceria e incentivo dos colegas Maikel Rosa Oliveira e Leonardo Jung.

Agradeço também ao Programa de Pós-graduação em Ciências Graduação Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Agradeço a todos que contribuíram a seu modo para realização desse trabalho.

Sumário

RESUMO/ PALAVRAS-CHAVE	7
ABSTRACT/KEY WORDS	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	11
INTRODUÇÃO	13
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
JUSTIFICATIVA	29
QUESTÃO DA PESQUISA	30
HIPÓTESE	31
OBJETIVOS.....	32
MÉTODOS.....	33
RESULTADOS	41
DISCUSSÃO.....	42
CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

RESUMO/ PALAVRAS-CHAVE

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são inflamações crônicas do trato gastrointestinal de etiologia desconhecida. Estudos demonstraram alterações estruturais nos plexos nervosos de pacientes com DII. Análises de biópsias teciduais desses pacientes mostraram anormalidades, como plexos e nervos de dimensão aumentada em decorrência de hipertrofia e/ou hiperplasia de neurônios. A terapia com células-tronco tem sido muito estudada e demonstrou ser capaz de diminuir a inflamação intestinal e modular as citocinas inflamatórias, reduzindo, assim, a inflamação tecidual. Entretanto, muito pouco se sabe sobre os efeitos da terapia celular nos plexos do sistema nervoso entérico (SNE) de pacientes com DII. Esta dissertação avaliou os plexos nervosos mioentéricos de animais com colite induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS) e tratados com células estromais mesenquimais (MSC) buscando elucidar os efeitos da terapia celular no SNE. Foram realizadas contagens celulares e avaliações morfométricas dos plexos nervosos, bem como a imunohistoquímica para HU, nNOS e S100B. Os resultados mostraram que a colite induzida por DSS foi capaz de promover alterações no plexo nervoso mioentérico causando um aumento dos mesmos (indicativo de plexite), em comparação com o grupo controle. Entretanto, o tratamento com MSC nos dias 2 e 5 do protocolo de indução da doença foi capaz de proteger o plexo nervoso dos danos provocados pelo processo inflamatório. Da mesma forma, o aumento na porcentagem de neurônios imunorreativos para nNOS observada nos animais com DII não foi observada no grupo tratado com MSC. O número de neurônios por área de plexo mioentérico também se mostrou alterado, sendo reduzido no grupo de animais com colite induzida por DSS. A proteína S100B apresentou maiores níveis na camada muscular de animais com DII em relação aos controles saudáveis. Tal efeito não foi observado nos animais doentes e tratados com MSC. Dessa forma, demonstramos que as MSCs possuem efeito protetor para a neuroinflamação provocada por DSS no SNE.

Palavras chave: Colite ulcerativa, terapia celular, neuroinflamação, plexo mioentérico, MSC

ABSTRACT/KEY WORDS

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic inflammations of the gastrointestinal tract of unknown etiology. Studies have demonstrated structural changes in the nervous plexuses of patients with IBD. Analysis of tissue biopsies from these patients showed abnormalities, such as enlarged plexus and nerves due to neuronal hypertrophy and/or hyperplasia. Stem cell therapy has been extensively studied and shown to be able to decrease intestinal inflammation and modulate inflammatory cytokines, thus reducing tissue inflammation. However, very little is known about the effects of cell therapy on the plexuses of the enteric nervous system (ENS) of IBD patients. This work evaluated the myenteric nerve plexuses of animals with colitis induced by dextran sodium sulfate (DSS) and treated with mesenchymal stromal cells (MSC) seeking to elucidate the effects of cell therapy on the ENS. Cell counts and morphometric evaluations of the nerve plexuses were performed, as well as immunohistochemistry for HU, nNOS and S100B. The results demonstrate that DSS-induced colitis was able to promote alterations in the myenteric nervous plexus, causing an increase in them (indicative of plexitis), in comparison with the control group. However, treatment with MSC on days 2 and 5 of the disease induction protocol was able to protect the nervous plexus from damage caused by the inflammatory process. Likewise, the increase in the percentage of nNOS-immunoreactive neurons observed in animals with IBD was not observed in the MSC-treated group. The number of neurons per myenteric plexus area was also altered, being reduced in the group of animals with DSS-induced colitis. The S100B protein showed higher levels in the muscle layer of animals with IBD compared to healthy control. Such an effect was not observed in sick animals treated with MSC. Thus, we demonstrate that MSCs have a protective effect against neuroinflammation caused by DSS in the ENS.

KEY WORDS: Ulcerative colitis, cell therapy, neuroinflammation, myoenteric plexus, MSC

LISTA DE ABREVIATURAS

BM-MSK – MSK derivada da medula óssea

CD – Doença de Crohn

ChAT – Colina acetiltransferase

DII – Doença inflamatória intestinal

DSS – Sulfato de sódio dextrano

ENS – *Enteric nervous system*

GFAP – Proteína glial fibrilar ácida

GSH – Glutathiona

GSNE – Glia do sistema nervoso entérico

HGF – Fator de crescimento de hepatócito

HLA – Antígeno leucocitário humano

IBD – *Inflammatory bowel diseases*

IFN γ – Interferon gama

IHQ – Imunoistoquímica

IL-13 – Interleucina 13

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-5 – Interleucina 5

IR – Imunorreativos

MSK – Células estromais mesenquimais

nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal

NOS – Óxido nítrico sintase

ON – Óxido nítrico

PGE-2 – Prostaglandina E2

SNC – Sistema nervoso central

SNE – Sistema nervoso entérico

TGF – Fator de crescimento transformante

Th1 – Linfócito T *helper* 1

Th2 – Linfócito T *helper* 2

TNBS – 2,4,6-trinitrobenzeno sulfonato

TNF – Fator de necrose tumoral

UC – Colite ulcerativa

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Representação esquemática das regiões afetadas pelas Doenças Inflamatórias Intestinais.....	16
Figura 2 - Representação esquemática de algumas conexões envolvidas nos reflexos entéricos locais.....	21
Figura 3 - Efeito modulador das MSCs nas células imunes.....	25
Figura 4 - Efeito protetor de meio condicionado, partículas de membrana e MSCs íntegras na inflamação do cólon.....	27
Figura 5 - Coloração H&E de um intestino de um camundongo C57BL/6.....	34
Tabela 1 - Graduação histológica da colite.....	35
Figura 6 - Imagens histológicas representativas dos diferentes grupos estudados..	41
Tabela 2 - Valores do Score Histológico para os diferentes grupos.....	42
Figura 7 - Imagens histológicas representativas dos plexos mioentéricos nos diferentes grupos estudados.....	43

Figura 8 - Análise morfométrica da área dos plexos mioentéricos.....	43
Figura 9 - Representação de um plexo nervoso mioentérico IR para a proteína S100B permitindo a identificação de neurônios e GSNE.....	44
Figura 10 - Razão do número de neurônios por área de plexo mioentérico.....	45
Figura 11 - Porcentagem de células imunorreativas para nNOS.....	46
Figura 12 - Imunorreatividade para S100B.....	47

INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são inflamações crônicas, recorrentes, do trato gastrointestinal de etiologia desconhecida e que apresentam dois fenótipos distintos: a Doença de Crohn (CD, do inglês *Crohn's disease*) e a Colite Ulcerativa (UC, do inglês *ulcerative colitis*). Os pacientes com DII apresentam fases alternadas de inflamação aguda e remissão, e sintomas como dor abdominal, diarreia e perda de peso. Enquanto a CD pode causar inflamação transmural e afetar qualquer parte do trato gastrointestinal de forma descontínua, a UC é tipicamente uma inflamação restrita à mucosa e limitada ao cólon. O sistema nervoso entérico (SNE) compreende uma complexa rede de neurônios e células gliais que inervam o trato gastrointestinal e é responsável pela regulação e coordenação das funções intestinais, independentemente do sistema nervoso central (SNC). Funções intestinais como a motilidade intestinal, o transporte de líquido e eletrólitos, a secreção de mucinas, a produção de citocinas e a regulação da barreira epitelial são reguladas pelo SNE, e todos esses aspectos estão importantemente comprometidos em situações de DII.

Sabe-se que a inflamação intestinal promove alterações neuroquímicas em populações de neurônios colinérgicos e nitrérgicos do plexo mioentérico, o que acaba por influenciar/interromper as funções e a motilidade gastrointestinais. Os insultos induzidos pela inflamação não só atingem os plexos nervosos do intestino, como também são parte integrante da geração dos sintomas das DII. Estudos mostram que a presença de plexite mioentérica e submucosa é preditivo de recidiva precoce. Portanto, mudanças estruturais no SNE parecem ser preditivas da evolução das doenças inflamatórias intestinais, o que sugere que a neuroproteção

possa diminuir a gravidade e desempenhar um papel na recorrência das DII. A célula estromal mesenquimal (MSC, do inglês *mesenchymal stromal cell*) possui um grande potencial terapêutico associado as propriedades imunomoduladoras, sendo estudada em uma grande variedade de aplicações terapêuticas, em especial para terapia celular de doenças inflamatórias e autoimunes. MSCs são capazes de reverter os danos observados na mucosa e submucosa de modelos animais de colite ulcerativa. Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a infusão sistêmica de MSCs é capaz de diminuir a inflamação intestinal, modular as citocinas inflamatórias e induzir a apoptose de células T da mucosa intestinal, além de promover um aumento de enzimas antioxidantes e reduzir os danos gerados pelo estresse oxidativo em modelo de colite induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS, do inglês *dextran sodium sulfate*). Entretanto, a literatura carece de maiores esclarecimentos sobre o efeito destas células nos plexos nervosos. Neste trabalho, através de análises morfométricas e de imunohistoquímica, buscamos elucidar os efeitos da terapia com MSCs no plexo nervoso mioentérico de animais submetidos a modelo de colite ulcerativa induzido por DSS e tratados com MSCs nos dias 2 e 5 do protocolo de indução.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Doenças inflamatórias intestinais

O termo doença inflamatória intestinal (DII) é utilizado para descrever inflamações prolongadas do trato gastrointestinal de etiologia desconhecida e que apresentam dois principais fenótipos distintos: a doença de Crohn (CD, do inglês *Crohn's disease*), que pode apresentar-se em todo o todo o trato gastrointestinal (tendo como localização mais comum o íleo terminal), e a colite ulcerativa (UC, do inglês *ulcerative colitis*), que normalmente afeta a mucosa do cólon (HOLLAND et al., 2021).

Estudos demonstraram que a incidência e a prevalência das DII vêm aumentando nos últimos anos, especialmente em países industrializados (MOUM et al., 2014). No Brasil, estudos epidemiológicos relatam que o estado de SP, mais desenvolvido e com maior atividade econômica, também apresenta a maior taxa de incidência de DII, comparável a países europeus como Portugal e Irlanda, o que pode estar associado a maior acesso a atendimento médico e centros médicos de referência (GASPARINI., 2018; ZALTMAN., 2021). No entanto, a incidência de DII também está aumentando em vários países de baixa renda na América Latina e no Caribe (KOTZE et al., 2020).

Embora a etiologia das DIIs ainda não tenha sido completamente esclarecida, elas são tratadas como doenças imunológicas que provavelmente se desenvolvam a partir de interações entre o meio ambiente e fatores microbianos imunomediados em um hospedeiro predisposto (NEURATH et al., 2020). Uma variedade de estudos indica que há uma disfunção do sistema imunológico da mucosa intestinal aos antígenos entéricos, desencadeando um processo inflamatório crônico em

indivíduos geneticamente suscetíveis (GREGORIE et al.,2017; UNIKEN et al., 2017).
Dentre os fatores ambientais que podem contribuir para o desenvolvimento da DII, podem ser citados o fumo, o estresse, a higiene, os hábitos alimentares, a atividade física e a qualidade do sono (ANANTHAKRISHNAN., 2017).

Os pacientes com DII apresentam fases alternadas de inflamação aguda e remissão, e sintomas como dor abdominal, diarreia e perda de peso. Enquanto a CD pode causar inflamação transmural e afetar qualquer parte do trato gastrointestinal de forma descontínua, a UC é tipicamente uma inflamação restrita à mucosa e limitada ao cólon (Figura 1).

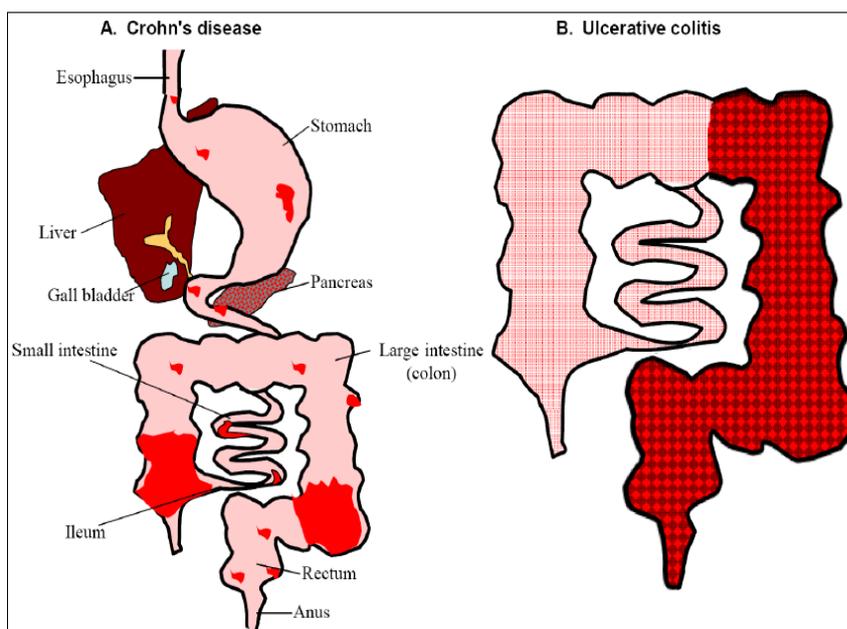


Figura 1 - Representação esquemática das regiões afetadas (em destaque) pelas Doenças Inflamatórias Intestinais. (A) Doença de Crohn: a inflamação pode afetar todo o trato digestivo, da boca ao ânus. (B) Colite Ulcerativa: a inflamação é limitada ao cólon. Fonte: SINGH et al., 2010.

Em indivíduos saudáveis, a mucosa intestinal apresenta tolerância para bactérias simbióticas, portanto, células do sistema imune inato iniciam repostas imunes apenas contra antígenos exógenos. 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 (WÉRA et al., 2016). Diversas células imunes estão envolvidas neste processo, como macrófagos, neutrófilos e células T do *cluster* de diferenciação (CD4⁺). A UC resulta da excessiva função de células T efectoras ou da deficiência da função das células T regulatórias na inflamação. Dessa forma, a ativação de células Th1 (linfócitos T *helper* 1) promove ativação e infiltração demasiadas de macrófagos e neutrófilos, ocasionando inflamações da mucosa intestinal e produção descontrolada de citocinas. A excessiva resposta de células Th1 está associada com um aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-2 (interleucina-2), IFN- γ (interferon-gama) e/ou TNF (fator de necrose tumoral), assim como a excessiva resposta de células Th2 (linfócitos T *helper* 2) está associada com a secreção de IL-4 (interleucina-4), IL-5 (interleucina-5) e/ou IL-13 (interleucina-13) (BOUMA e STROBER, 2003).

Além do sistema imune, a barreira epitelial intestinal também exerce um papel essencial na homeostase do intestino. O muco secretado pelas células caliciformes atua como uma barreira física que separa a microbiota do contato direto com o epitélio que reveste o intestino, e protege o órgão de danos físicos e químicos (BREUGELMANS et al., 2020). 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 recrutamento e ativação de células imunes e o conseqüente início do desenvolvimento da inflamação intestinal.

O curso da UC é caracterizado por crises que se alternam com períodos de remissão, sendo que uma minoria dos pacientes tem atividade contínua. A severidade das crises e a resposta ao tratamento variam desde sintomas leves, sem manifestações sistêmicas, até risco de morte fulminante por colite naqueles

pacientes que não respondem ao tratamento e, portanto, são candidatos à intervenção cirúrgica (COSNES et al., 2011). Com a progressão da doença, o paciente apresenta perda de peso, fadiga, perda do apetite relacionada à deficiência de nutrientes, muco nas fezes, sangramento retal que pode ser severo, febre e anemia.

Atualmente, não há cura conhecida para as DIIs. Os tratamentos disponíveis consistem principalmente de aminossalicílicos, corticosteroides, imunossupressores e anticorpos monoclonais que visam bloquear o recrutamento de células imunes para o intestino inflamado. No entanto, esses tratamentos apenas atenuam os sintomas clínicos e não são capazes de promover a remissão sustentada da doença, podendo, muitas vezes, se associar a efeitos adversos como, por exemplo, uma maior suscetibilidade a infecções intracelulares oportunistas (DE LANGE KM et al., 2015). Além disso, vários pacientes não respondem aos tratamentos existentes, o que torna imperativo o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (PEYRIN-BIROULET 2015).

Modelo experimental de colite ulcerativa

Modelos animais de DIIs são muito importantes para auxiliar no conhecimento da patogênese, especialmente dada a complexa heterogeneidade genética e a variedade de fatores etiológicos envolvidos no desenvolvimento natural da doença. Nesse sentido, a utilização de animais de laboratório tem sido ferramenta essencial para a investigação dos mecanismos celulares e moleculares que conduzem o processo inflamatório, além do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (BAUER et al., 2010).

O sulfato de sódio dextrano (DSS, do inglês *dextran sodium sulfate*), é um polissacarídeo sulfatado solúvel em água, carregado negativamente, com um peso molecular altamente variável (entre 5 e 1400 kDa) e que conhecidamente apresenta toxicidade seletiva ao cólon, induzindo o desenvolvimento de inflamação (OKAYASU et al., 1990). A indução da colite que mais se assemelha a doença humana se dá através da administração de 40-50 kDa DSS na água potável por aproximadamente 8 dias. O mecanismo pelo qual o DSS induz a inflamação intestinal não é claro, mas é provavelmente o resultado de danos à monocamada epitelial que reveste o intestino grosso, permitindo a disseminação do conteúdo intestinal pró-inflamatório (por exemplo, bactérias e seus produtos) no tecido subjacente. O modelo de colite induzida por DSS é muito popular na pesquisa de DIIs devido à sua rapidez, simplicidade, reprodutibilidade e controlabilidade. Modelos agudos, crônicos e recorrentes de inflamação intestinal podem ser alcançados modificando a concentração de DSS e a frequência de administração. A UC experimental resulta da excessiva função de células T efectoras ou da deficiência da função das células T regulatórias na inflamação. Dessa forma, a ativação de células Th1 promove ativação e infiltração demasiada de macrófagos e neutrófilos, ocasionando inflamações da mucosa intestinal e produção descontrolada de citocinas (CHASSAING et al., 2014). A colite aguda induzida por DSS apresenta características morfológicas e fisiológicas semelhantes à UC em humanos, incluindo ulcerações superficiais, lesão da mucosa, produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios, infiltrações leucocitárias, diarreia, sangue nas fezes e perda de peso (GONÇALVES et al., 2013). Esse modelo tem demonstrado vantagens para estudos que visam novas terapias ou de manipulações genéticas devido à sua simplicidade e reprodutibilidade (ELSHEIKH et al., 2012).

Sistema nervoso entérico

Compreendendo uma complexa rede de neurônios e células gliais, o sistema nervoso entérico (SNE) intrinsecamente inerva o trato gastrointestinal e é responsável pela regulação e coordenação das funções intestinais, independentemente do sistema nervoso central (SNC) (FURNESS, 2012). No trato digestório, o SNE está organizado em dois grandes plexos ganglionares, o plexo mioentérico (de Auerbach) e o plexo submucoso (de Meissner). O plexo mioentérico consiste de gânglios e fibras que formam redes neuronais situadas entre a camada muscular circular interna e a camada muscular longitudinal externa (FURNESS, 2006) e sua função está diretamente associada a regulação reflexa da contratilidade muscular. Já o plexo nervoso submucoso localiza-se na camada submucosa, normalmente próximo à camada muscular circular interna, e controla atividades vasomotoras e secretoras da mucosa (Figura 2). O SNE se distribui ao longo de todo o trato digestório estendendo-se do esôfago ao reto e também apresentando inervações em pâncreas e sistema biliar.

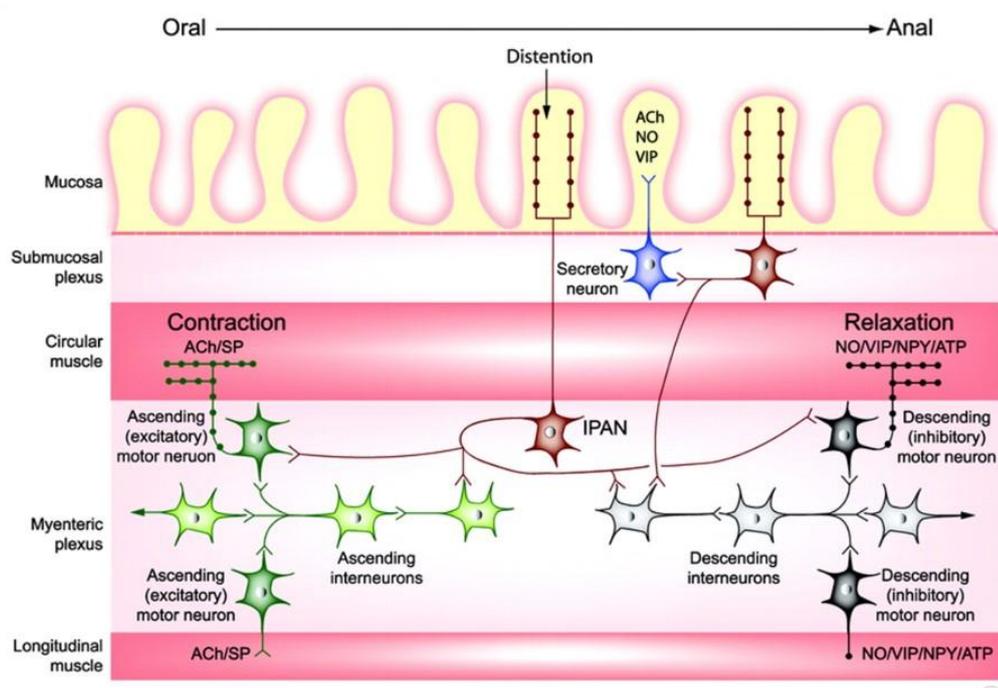


Figura 2 - Representação esquemática de algumas conexões envolvidas nos reflexos entéricos locais. Na imagem estão representados os plexos submucoso e mioentérico e neurônios sensoriais, interneurônios e neurônios motores inibitórios e excitatórios. Fonte: BENARROCH, 2007.

Os plexos nervosos do SNE contêm uma variedade de neurônios funcionalmente distintos que podem ser agrupados por suas funções como neurônios intrínsecos aferentes primários, interneurônios e neurônios motores, os quais estão sinapticamente ligados uns aos outros em microcircuitos (FURNESS, 2006). Os neurônios intrínsecos aferentes primários são neurônios sensoriais que apresentam corpo celular grande quando comparados aos demais neurônios do plexo. Os interneurônios apresentam como característica a resposta a reflexos com rápidos potenciais excitatórios pós-sinápticos. Finalmente, os neurônios motores inervam as camadas musculares do trato digestório de forma excitatória ou inibitória (MACHADO, 2019). Nesse sentido, o óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*) tem sido considerado um importante neurotransmissor inibitório no intestino. Assim, neurônios positivos para óxido nítrico sintase (NOS, do inglês *nitric oxide synthase*), são classificados como neurônios inibitórios que exercem funções relacionadas ao relaxamento das camadas musculares. Por outro lado, neurônios positivos para a enzima catalisadora colina acetiltransferase (ChAT, do inglês *choline acetiltransferase*) são caracterizados como neurônios excitatórios (MACHADO, 2019).

Além disso, os neurônios entéricos são suportados por células que compõem a glia do sistema nervoso entérico (GSNE) semelhantes aos astrócitos do SNC, que podem modular a função neuronal. A GSNE tem demonstrado ser muito mais do que um mero suporte mecânico para neurônios, uma vez que estudos recentes

demonstram seu ativo envolvimento na regulação da homeostase, motilidade e processos inflamatórios do intestino (CIRILLO et al., 2011). As células da GSNE liberam moléculas sinalizadoras que medeiam importantes funções do SNE. Entre estas, grande importância tem sido dada para a proteína S100B, uma neurotrofina difusível, situada no citoplasma e/ou no núcleo da GSNE e que pode provocar um efeito neurogênico (quando em concentrações nanomolares) ou efeito neurodegenerativo (quando em concentrações micromolares) promovendo neuroinflamação. Este fato demonstra o papel-chave das células da GSNE como reguladores da homeostase intestinal (CIRILLO et al., 2011). Alterações que atinjam a GSNE podem causar degeneração do epitélio da mucosa, dismotilidade e a má absorção de nutrientes por partes dos segmentos intestinais, demonstrando os diversos papéis e a influência direta da homeostase glial na digestão bem como na neurotransmissão entérica (OKURA et al., 2019)

Em suma, o SNE regula e coordena funções intestinais como a motilidade intestinal, o transporte de líquido e eletrólitos, a secreção de mucinas, a produção de citocinas e a regulação da barreira epitelial. Todos esses aspectos estão comprometidos em situações de DII, portanto, não é surpreendente que exista grande interesse em elucidar o papel do SNE na patogênese das DIIs (FERRANTE et al., 2006).

Nesse sentido, vários estudos demonstraram alterações estruturais do SNE em pacientes com DII. Análises de biópsias teciduais de pacientes com CD e UC mostram anormalidades, como gânglios e nervos de dimensão aumentada em decorrência de hipertrofia e/ou hiperplasia de neurônios, bem como alterações na ativação e proliferação de células da glia (WINSTON et al., 2013).

Estudos experimentais demonstraram que sinais oriundos da microbiota promovem a formação de uma rede glial que parte do plexo nervoso e invade continuamente a lâmina própria. A inflamação tecidual promove, também, alterações neuroquímicas em populações de neurônios colinérgicos e nitrérgicos do plexo mioentérico, o que acaba por influenciar/interromper as funções e a motilidade gastrointestinais (KRAUTER et al., 2007). Interessantemente, foi demonstrado que as alterações estruturais e funcionais observadas no SNE persistem para além da resolução da inflamação ativa (SOKOI et al., 2009). Esses achados sugerem que os insultos induzidos pela inflamação não só atingem o SNE como também são parte integrante da geração dos sintomas das DIIs. Estudos mostram que a presença de plexite mioentérica e submucosa é preditiva de recidiva precoce de CD (LAKHAN et al., 2010; FIRDAUS et al., 2006). Portanto, mudanças estruturais no SNE parecem ser preditivas na evolução da doença, sugerindo que a neuroproteção possa diminuir a gravidade e desempenhar um papel na recorrência das DIIs (PRÉVILLE et al., 1998).

Células estromais mesenquimais (MSC)

As células estromais mesenquimais (MSC, do inglês *mesenchymal stromal cell*) são células multipotentes capazes de se diferenciar em linhagens mesodermiais, em particular linhagens osteoblásticas, adipogênicas e condrogênicas. As MSCs são, de fato, uma população heterogênea de células caracterizadas imunofenotipicamente pela expressão de marcadores celulares como CD73, CD90 e CD105, e não possuem a expressão de marcadores de linhagem hematopoiética CD45, CD34, CD11c, CD14, CD19, CD79A e HLA-DR. As MSCs

originalmente descobertas e, portanto, mais estudadas, provém da medula óssea. Contudo, a origem da obtenção de MSCs foi expandida para outros tecidos, incluindo músculo, tecido adiposo e tecidos neonatais (PHITADIA et al., 2011; NICHOLL et al. 1994; GONZALEZ et al., 2009).

As MSCs possuem um grande potencial terapêutico na medicina regenerativa devido à sua capacidade de diferenciação *in vitro*, *homing* para tecidos inflamados após infusão *in vivo* e secreção de várias moléculas bioativas (NEUNLIST et al., 2003). Somado a isso, as propriedades imunomodulatórias das MSCs sugerem que mesmo MSCs de antígenos leucocitários humanos (HLA, do inglês *human leucocyte antigen*) incompatíveis podem ser adequadas para uma grande variedade de novas aplicações terapêuticas, em especial para terapia celular de doenças inflamatórias e autoimunes (XUE et al., 2011).

As MSCs possuem uma alta capacidade imunossupressora e interagem com células do sistema imunológico através de diversos mecanismos. Estudos mostram que a imunossupressão das MSCs é mediada pela secreção de fatores solúveis e pela presença de proteína de superfície das MSCs. Elas são capazes de secretar fatores anti-inflamatórios, como fator de crescimento transformante (TGF)- β , prostaglandina E2 (PGE-2) e fator de crescimento de hepatócito (HGF) (PRÉVILE et al., 1998). Através da secreção de TGF- β e outros fatores, as MSCs promovem a indução de células T reguladoras (ENGELA et al., 2013), macrófagos reguladores e células B reguladoras (ENGELA et al., 2013; MAGGINI et al., 2010; PENG et al., 2015) e, assim, transmitem seus efeitos imunossupressores para outros tipos de células que exercem diferentes mecanismos de supressão imunológica (Figura 3).

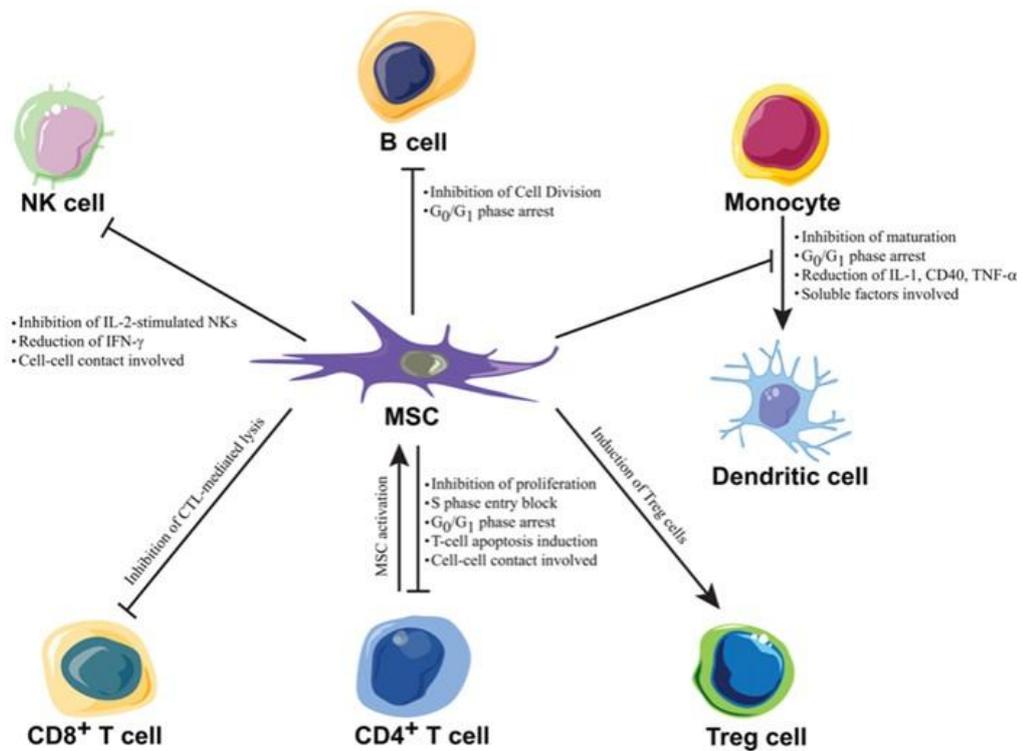


Figura 3 - Efeito modulador das MSCs nas células imunes. Os efeitos imunomoduladores das MSCs incluem a inibição da proliferação de linfócitos B, T, CD4⁺ e T CD8⁺, a indução de linfócitos T regulatórios, inibição da maturação de monócitos e a inibição da função das células NK. Legenda: CTL: linfócito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

Além disso, estudos investigando o secretoma das MSC sugerem que numerosos fatores bioativos secretados por MSCs medeiam neuroproteção via suporte trófico, imunomodulação e anti-apoptose (MUNN et al., 2013; SKALNIKOVA et al., 2011).

A Terapia Celular para DII

Diante do exposto, alguns estudos têm abordado a terapia com MSCs como promissora no tratamento de DII. MSCs autólogas e alogênicas têm sido avaliadas

em ensaios clínicos em duas modalidades diferentes: injeção local de MSC para tratar a CD fistulizante e infusão intravenosa de MSC para tratar a CD luminal ou UC (GREGORIE et al.,2017). Atualmente, os resultados dos ensaios clínicos são particularmente encorajadores na CD fistulizante perianal. De fato, as MSCs demonstraram sua capacidade de curar fístulas da CD perianal em pacientes refratários à terapia convencional ou biológica em vários ensaios controlados (MOLENDJIK et al., 2015; PANES et al., 2016). Entretanto, as MSCs ainda precisam demonstrar sua eficácia na CD luminal e na UC (DHERE et al., 2016; LIANG et a., 2012).

Nesse sentido, estudos experimentais em modelos animais têm auxiliado o melhor entendimento dos mecanismos celulares, moleculares e imunológicos das DIIs associados à terapia celular. Recentes trabalhos têm demonstrado uma melhora clínica e histopatológica da colite após infusão de MSC, como diminuição da inflamação e aumento da sobrevida (DA COSTA GONÇALVES et al., 2016; WANG et al., 2016).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a infusão sistêmica de MSCs é capaz de diminuir a inflamação intestinal, modular as citocinas inflamatórias e induzir a apoptose de células T da mucosa intestinal, além de promover um aumento de enzimas antioxidantes e reduzir os danos gerados pelo estresse oxidativo em modelo de colite induzida por DSS (GONÇALVES et al., 2014; DA COSTA GONÇALVES et al., 2016). Demonstramos também, através de cultura organotípica, que os fatores bioativos secretados por MSCs promovem a proliferação de células da mucosa intestinal e que o tratamento com MSC promove uma diminuição no número de células CD3⁺ *in vitro* (DA COSTA et al., 2018). Recentemente observamos que não só as MSCs íntegras, mas também seu meio condicionado e

partículas de membrana também são capazes de controlar os danos promovidos pelo processo inflamatório no intestino de animais com colite induzida por DSS (SERAFINI et al., 2022- *manuscrito submetido*) (Figura 4).

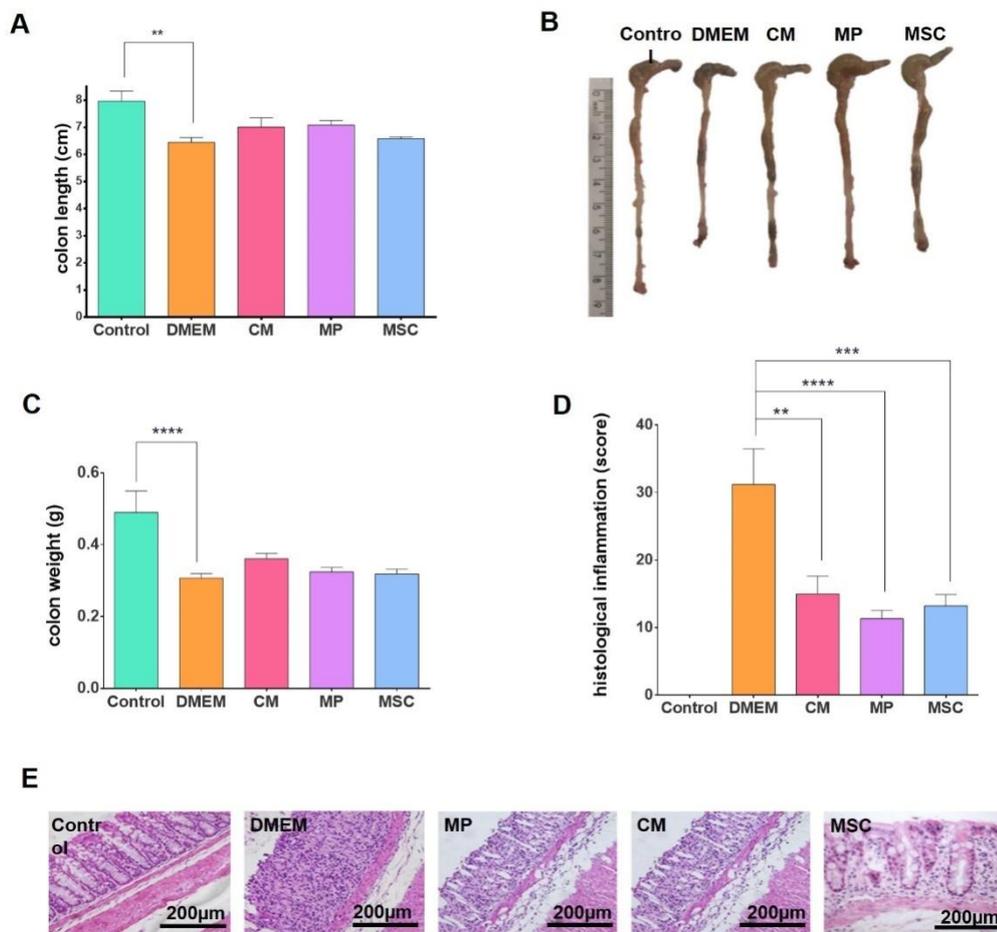


Figura 4 - Efeito protetor de meio condicionado, partículas de membrana e MSCs íntegras na inflamação do cólon. (A) Comprimento do cólon. (B) Imagem representativa exibindo a diferença no comprimento do cólon entre os grupos de tratamento. (C) Peso do cólon. (D) Escore de inflamação histológica. (E) Lâminas histológicas em coloração de hematoxilina e eosina. Os dados são representados como média \pm SEM. **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ versus grupo DMEM.

Embora a literatura demonstre o efeito das MSCs na restauração e reparo da barreira epitelial através de ações anti-inflamatórias, poucos estudos examinaram os efeitos de terapias baseada em MSC na atenuação da neuropatia entérica induzida

pela inflamação. Os estudos existentes demonstraram que MSCs de medula óssea aplicadas localmente apresentam efeito neuroprotetor em neurônios entéricos danificados pela inflamação induzida por 2,4,6-trinitrobenzeno-sulfonato (TNBS). Robinson e colaboradores (2015) demonstraram que a inflamação intestinal promove um aumento no número de neurônios inibitórios positivos para nNOS (óxido nítrico sintase neuronal, do inglês *neuronal nitric oxide synthase*) e uma redução na população de neurônios excitatórios (ChAT positivos) e essas modificações são revertidas a partir da terapia com MSCs (RANI et al., 2015; FISCHER et al., 2009; JORGENSEN et al., 2003).

Entretanto, muito pouco se sabe sobre os efeitos da terapia celular nas células gliais do SNE. Estas células produzem moléculas neuroprotetoras como a glutathione (GSH), que protegem os neurônios durante o estresse oxidativo. Assim, neste estudo, pretendemos avaliar os efeitos da terapia celular não somente nos neurônios do SNE, mas também na ativação das células gliais, investigando um possível mecanismo de neuroproteção.

JUSTIFICATIVA

A inflamação intestinal promove alterações neuroquímicas em populações de neurônios colinérgicos e nitrérgicos do plexo mioentérico, o que acaba por influenciar/interrromper as funções e a motilidade gastrointestinais. Os insultos induzidos pela inflamação não só atingem os plexos nervosos do intestino, como também são parte integrante da geração dos sintomas das doenças inflamatórias intestinais. Estudos mostram que a presença de plexite mioentérica e submucosa é preditiva de recidiva precoce. Portanto, mudanças estruturais no sistema nervoso entérico parecem ser preditivas da evolução das doenças inflamatórias intestinais, o que sugere que a neuroproteção possa diminuir a gravidade e desempenhar um papel na recorrência destas patologias. Células estromais mesenquimais demonstram importante efeito imunomodulador e são capazes de reverter os danos observados na mucosa e submucosa de modelos animais de colite ulcerativa. Entretanto a literatura carece de maiores esclarecimentos sobre o efeito destas células nos plexos nervosos.

QUESTÃO DA PESQUISA

A terapia com células estromais mesequimais no modelo murino de colite induzida por sulfato de sódio dextrano é capaz de proteger o plexo mioentérico dos danos ocasionados pelo processo inflamatório?

HIPÓTESE

A terapia com células estromais mesenquimais, ao reduzir o processo inflamatório da mucosa e submucosa colônica, protege os neurônios e células da glia do plexo nervoso mioentérico dos danos associados à inflamação tecidual.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar, nos plexos nervosos mioentéricos de animais com colite induzida por DSS, os efeitos da terapia com MSCs em neurônios e células da glia.

Objetivos específicos:

- Quantificar e avaliar as características morfométricas dos plexos nervosos mioentéricos;
- Avaliar a imunorreatividade Hu: proteína presente no soma neuronal;
- Avaliar a imunorreatividade nNOS: óxido nítrico sintase neuronal, marcador de neurônios mioentéricos inibitórios;
- Avaliar a imunorreatividade para S100B: proteína presente em células da glia.

MÉTODOS

Locais de realização

O projeto foi desenvolvido no Laboratório Células Tecidos e Genes (CTG) do Centro de Pesquisa Experimental (CPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Houve participação e apoio do Departamento de Ciências Morfológicas da UFRGS, da Unidade de Pesquisa Laboratorial (UPL) e da Unidade de Patologia Experimental (UPE) do CPE do HCPA.

Amostras Biológicas

Este projeto utilizou material biológico oriundo de projetos de pesquisa previamente realizados pelo grupo de pesquisa. Amostras do projeto intitulado “Análise do efeito anti-inflamatório do transplante de células-tronco mesenquimais para modelo murino de colite aguda”. O referido projeto foi avaliado e aprovado pela CEUA HCPA sob o número de registro GPPG 11-0244.

Amostras de animais saudáveis (grupo controle), animais com retocolite ulcerativa induzida por sulfato de sódio dextrano (grupo DSS), e animais com colite induzida por DSS tratados com MSC (grupo MSC) foram previamente fixadas em formol tamponado 10% e incluídas em parafina, no projeto anteriormente mencionado. Foram avaliados 5 animais de cada grupo.

Confecção de Lâminas de Hematoxilina e Eosina

Na eutanásia, o cólon dos animais foi removido e lavado com solução fisiológica. Após a lavagem, com auxílio de uma tesoura de dissecação, o tubo foi

aberto e a porção luminal exposta. Utilizamos a técnica de *swiss-roll*, que permite a avaliação de todo o comprimento do intestino de forma longitudinal (Figura 5).



Figura 5 – Coloração de H&E em intestino de um camundongo C57BL/6. A imagem é composta de uma porção do intestino delgado e todo o comprimento do intestino grosso. A porção entre a seta preta e a linha preta marca o intestino delgado. Entre a linha preta e a seta laranja está todo o intestino grosso. A região entre a linha laranja e a seta laranja mostra a porção distal do intestino grosso. Barra de escala = 1000μm Fonte: BIALKOWSKA et al., 2016.

Lâminas com coloração de H&E (hematoxilina e eosina) foram confeccionadas para a classificação histológica do tecido seguindo os critérios de Dieleman e colaboradores (1998). Secções do cólon (4μm) foram realizadas em micrótomo (Leica). Para coloração padrão de H&E as seções foram imersas em xileno (3 x 4 minutos), seguido de etanol 100% (3 minutos), etanol 90% (2 minutos), etanol 70% (2 minutos). Após a desidratação, as lâminas foram enxaguadas com água corrente e, na sequência, incubadas em hematoxilina (4 minutos), incubadas

em água (1 minuto), seguido de eosina (3 minutos). Após, foram novamente enxaguadas em água corrente, incubadas em etanol 100% (2 x 1 minuto), xileno (2 x 3 minutos) e montadas em lâminas de vidro com meio de montagem Permount.

Avaliações histológicas do cólon

Para determinar o desenvolvimento da doença inflamatória intestinal, foi conduzida uma avaliação do escore histológico segundo Dieleman e colaboradores (1998) (Tabela 1). Cada parâmetro histológico, como severidade da inflamação (0-3), profundidade da inflamação (0-3), regeneração (0-4) e dano à cripta (0-4), foi multiplicado pela porcentagem de comprometimento do tecido (1 ponto para 1-25%, 2 pontos para 26-50%, 3 pontos para 51-75%, 4 pontos para 76-100%). Portanto, a severidade e a profundidade da inflamação tiveram uma escala de pontuações de 0 a 12, a regeneração e o dano à cripta de 0 a 16. O índice histológico da doença foi calculado como a soma dos produtos de todos os parâmetros.

Tabela 1 - Graduação histológica da colite

Características	Grau	Descrição
Inflamação	0	Nenhum
	1	Leve
	2	Moderado
	3	Severo
Extensão	0	Nenhum
	1	Mucosa
	2	Mucosa e submucosa
	3	Transmural
Regeneração	4	Nenhuma reparação tecidual
	3	Superfície epitelial não intacta
	2	Regeneração com depleção de cripta
	1	Regeneração quase completa
	0	Completa regeneração ou tecido

			normal
Dano à cripta	0		Nenhum
	1		Basal 1/3 danificado
	2		Basal 2/3 danificado
	3		Apenas a superfície do epitélio intacta
	4		Cripta inteira e epitélio perdido
Percentual de Envolvimento			
	1		1-25%
	2		26-50%
	3		51-75%
	4		76-100%

Fonte:
DIELEMAN

et al., 1998.

Avaliação Morfométrica do Plexo Nervoso Mioentérico

Imagens histológicas de pelo menos 10 plexos por animal foram realizadas em microscópio Zeiss AXIO imager M2 em aumento de 20x. Na camada muscular, mais especificamente entre a circular interna e a longitudinal externa, procuramos localizar o plexo mioentérico ou de Auerbach. Os plexos ou glângios são definidos como estruturas neurais contendo ao menos dois corpos de neurônios identificáveis envoltos por componentes de tecido conjuntivo. Utilizando o software ZEN 2012, a área dos plexos foi delimitada e a área selecionada medida em μm^2 . Foram avaliados pelo menos 10 plexos por animal nos diferentes grupos experimentais.

Análise imunohistoquímica (IHQ)

Para a avaliação da imunorreatividade às proteínas HU, nNOS e S100B, cortes histológicos foram submetidos a processamento imunoistoquímico.

Cortes longitudinais de 4 μm de espessura foram obtidos para a realização das reações de imunoistoquímica. A IHQ foi processada utilizando o método da

estreptavidina-biotina-peroxidase. A desparafinização das amostras foi realizada em banhos consecutivos de álcool e xilol. Para a recuperação antigênica, os cortes foram imersos em tampão citrato pH 6,0 durante 20 minutos, a 95°C. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por banhos consecutivos de peróxido de hidrogênio 5% em metanol (v/v), por 10 minutos, à temperatura ambiente. Reações inespecíficas foram bloqueadas por incubação das lâminas com PBS 10% leite em pó por 10 minutos. Em seguida, os anticorpos primários diluídos em PBS foram adicionados às lâminas que ficaram a 4°C *overnight*. Após lavagem com água corrente, os anticorpos secundários foram adicionados e incubados por 30 minutos. Após nova lavagem foi adicionada estreptavidina e realizada a revelação. A imunorreatividade para os anticorpos para S100B, Hu e nNOS foi avaliada. Foram utilizados controles teciduais positivos e negativos de acordo com a recomendação dos fabricantes, além de controles na ausência dos anticorpos primário e secundário.

Número total de neurônios por plexo

Originalmente, o número total de neurônios mioentéricos imunorreativos (IR) para a proteína Hu, uma marcadora da linhagem neuronal e altamente restrita ao núcleo neuronal, seria quantificado em pelo menos 10 plexos por animal em aumento de 20x. Contudo, a marcação imunoistoquímica para Hu não pode ser realizada em todas as amostras, mesmo após otimização do protocolo a partir de alteração no pH do tampão de recuperação antigênica, bem como com a utilização de “panela de pressão”. Dessa forma, optamos por realizar a contagem de neurônios a partir de características morfológicas da célula como soma grande,

núcleo eucromático e nucléolo evidente. A contagem foi realizada nas lâminas com marcação para S100B, o que nos permitiu identificar as células da GSNE (IR para S100B em núcleo e citoplasma) e realizar a contagem somente dos neurônios. Foi utilizado o software ImageJ/FIJI. A área dos plexos foi medida e o número de neurônios quantificados. Os resultados consistem no número de neurônios por área em cada plexo nervoso mioentérico.

Quantificação da imunorreatividade para nNOS

Toda a análise de marcação foi realizada pelo programa ImageJ/FIJI. Inicialmente foi feita a separação dos vetores de cores da imagem através do plugin “*color deconvolution*”, que já possui os vetores específicos para a coloração utilizada. Após a seleção da imagem com o vetor correspondente à marcação positiva, foi definido um limite de intensidade de marcação que foi identificado como marcação positiva ou como negativa. Para a análise da marcação de nNOs foi utilizado o valor de intensidade de pixels em 165. Dessa forma, foi gerada uma imagem binária, onde todo o pixel que estivesse acima desse valor estaria positivo e todo que estivesse abaixo desse limite seria apresentado como negativo. A área de interesse foi então definida selecionando-se a porção do intestino onde está localizado o plexo mioentérico. A área abriga a divisão entre as camadas musculares do intestino. Com a seleção definida, o software obteve os seguintes dados: área total da seleção, valor médio dos pixels e porcentagem da área coberta, sendo o último dado o resultado principal. Com esse valor, foi possível obter a porcentagem da área da imagem na qual havia a marcação acima do limite

selecionado, possibilitando uma comparação quantitativa da marcação entre os grupos experimentais.

Foram avaliadas imagens histológicas obtidas capturas no microscópio Invertido Olympus IX7. Foram quantificados no mínimo 10 gânglios por animal, totalizando, pelo menos, 50 amostras por grupo experimental. A área de imunorreatividade foi expressa como uma porcentagem da área total examinada.

Quantificação da imunorreatividade para S100B

Para a quantificação da IR para S100B foram analisadas imagens histológicas da marcação IHQ para S100B nos diferentes grupos experimentais. Foram avaliadas imagens histológicas obtidas capturas no microscópio com aumento de 400 vezes. Foram quantificados no mínimo 10 gânglios por animal totalizando, pelo menos, 50 amostras por grupo. As imagens histológicas foram analisadas no software ImageJ/FIJI. Utilizamos o plugin “*color deconvolution*” na opção H-DAB e selecionamos a marcação de DAB após a deconvolução. Selecionamos a região da camada muscular como um todo e medimos a média de intensidade da marcação para DAB, ou seja da imunorreatividade para S100B. No mesmo campo selecionamos uma região sem marcação para realizarmos a medida do *background*. O valor de intensidade de marcação foi calculado como a medida obtida na camada muscular menos o valor do *background*.

Análise estatística

As diferenças estatísticas foram determinadas utilizando o teste Anova de 1 via, seguida de pós-teste de Tukey, para amostras com distribuição normal. Para amostras que não apresentaram normalidade realizamos o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn. Utilizamos o software Prism v6.0 (Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Dados foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

DISCUSSÃO

As DIIs são doenças de etiologia não definida, cuja incidência têm aumentado continuamente, especialmente em países desenvolvidos. A ausência de terapia curativa estimula o desenvolvimento de estudos que buscam novas estratégias terapêuticas para estas doenças. Neste sentido nosso grupo de pesquisa estuda a aplicação da terapia celular com MSCs no intuito de controlar o processo inflamatório e reduzir os danos teciduais decorrentes da inflamação (GONÇALVES 2018, DA COSTA GONÇALVES, 2014, 2017; NUNES 2018). A literatura apresenta numerosos estudos corroborando os resultados e demonstrando o efeito imunomodulador das MSCs em diferentes modelos de colite, nos quais estes tratamentos foram efetivos em diminuir a severidade e a atividade da doença (ANDO, 2008; LEE, 2016; BARNHOORN, 2018). A maioria dos estudos de DII se baseia fortemente em abordagens imunológicas que relacionam a ativação de células imunes à exacerbação periódica e remissões da doença. No entanto, resta elucidar as alterações a longo prazo que permanecem no intestino, mesmo em períodos de remissão entre episódios agudos. Recentemente tem sido direcionada a atenção para alvos previamente inesperados do processo inflamatório luminal, como células da musculatura lisa e componentes do SNE. Nesse sentido, estudos vêm relatando mudanças estruturais e funcionais marcantes no SNE de pacientes e modelos animais de DII que refletem em alterações na função intestinal, distotilidade colônica, hipersensibilidade e disfunção mioentérica (FERRANTE, 2006; SOKOL, 2009; EVANGELINELLIS, 2022). Nessa dissertação avaliamos os efeitos da terapia com MSC no plexo nervoso mioentérico de animais com colite induzida por DSS. Pudemos observar que as MSCs além de promover uma

diminuição do processo inflamatório e auxiliar no processo de reparação da mucosa, têm a capacidade de atuar promovendo a proteção aos plexos nervosos mioentéricos do dano causado pelo processo inflamatório.

Estudos pré-clínicos demonstram que o tratamento com diferentes fontes de MSCs, incluindo MSCs derivadas da medula óssea (BM-MSCs) (LEE et al., 2016), MSCs derivadas de tecido adiposo (DA COSTA GONÇALVES, 2014, 2017), e tecidos neonatais (GONÇALVES 2018) mostraram efeitos protetores contra inflamação e facilitaram a reconstrução da permeabilidade da mucosa em animais com DII experimental.

Após a administração sistêmica de MSCs, estas células migram para os gânglios linfáticos, onde interagem com células imunes e fornecem uma sinalização imunomoduladora e/ou imunossupressora promovendo, assim impacto terapêutico na DII (KANG et al., 2018). Nesse sentido, os dados aqui apresentados corroboram dados da literatura que mostram efeito anti-inflamatório a partir do transplante de MSCs para modelo de colite induzida por DSS. A análise histológica demonstrou que, enquanto o grupo DSS apresentou extensa ulceração da mucosa com importante edema e infiltrado inflamatório, o grupo tratado com MSC apresentou menor intensidade de danos as criptas, bem como menor infiltrado inflamatório.

Além da avaliação usual que leva em consideração principalmente a mucosa e submucosa intestinal, principais áreas afetadas nas doenças inflamatórias intestinais, estudos experimentais demonstraram que a inflamação dessas camadas, promove alterações em neurônios do plexo mioentérico, o que acaba por influenciar/interromper as funções e a motilidade gastrointestinais (KRAUTER et al., 2007). Nesse sentido, buscamos avaliar o possível efeito da terapia celular com MSCs na proteção ou preservação dos componentes do SNE. Observamos um

aumento no tamanho do plexo mioentérico dos animais com colite induzida por DSS em relação ao grupo controle. Esse fato pode estar associado a presença de plexite, ou seja, infiltrado de células inflamatórias na região do plexo. Entretanto, não podemos afirmar este fato, uma vez que não realizamos marcação para células imunes. Outro fato que pode estar associado ao aumento da área do plexo como um todo, são as mudanças na área do perfil celular de neurônios individualmente, o que pode estar associado à morte celular por necrose que, caracteristicamente, promove um aumento do volume celular, desorganização do citoplasma, além do extravasamento do conteúdo celular (ZIEGLER et al., 2004; MACHADO 2019). Por outro lado, os animais que receberam transplante de MSCs não apresentam diferença estatística em relação aos animais saudáveis, indicando a proteção da terapia celular. Além disso, o aumento no número de células gliais observado no plexo mioentérico de pacientes com DIIs (GRUNDMANN, 2019) também pode estar associado ao aumento na área do plexo. Entretanto, para afirmar que esse aumento foi representativo em nosso modelo seria necessária a avaliação da expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP, do inglês *glial fibrillary acidic protein*), o que não foi realizado em nosso estudo.

Observamos uma redução no número total de neurônios em relação à área no grupo DSS ($0,84 \pm 0,4$), que diferiu estatisticamente do grupo controle ($2,5 \pm 0,63$) e do grupo DSS+MSC ($1,94 \pm 0,49$). Embora o grupo DSS+MSC também seja diferente do controle saudável, o número de neurônios é superior ao observado no grupo DSS, indicando possível proteção da terapia celular aos neurônios. Sanovic e colaboradores também observaram uma redução no número de neurônios por área do plexo em decorrência da inflamação intestinal (SANOVIC et al., 1999). Robinson e colaboradores, que também avaliaram o efeito da terapia com MSCs para o

tratamento da colite, demonstraram que em modelo de colite induzido por 2,4,6-trinitrobenzeno-sulfonato em cobaias, as MSCs foram eficazes na prevenção da perda de neurônios mioentéricos identificados pelo marcador neuronal HU, e que a dose de MSC é importante para o efeito observado, uma vez que 1×10^5 MSCs não apresentou os mesmos efeitos 1×10^6 células administradas por enema (ROBINSON et al., 2014; ROBINSON et al., 2017). Em nosso estudo administramos 1×10^6 MSCs por via intravenosa em modelo experimental de colite induzida por DSS e, apesar das diferenças em relação ao modelo animal e a via de administração, observamos dados muito semelhantes em relação à preservação dos neurônios mioentéricos.

Os neurônios entéricos apresentam grande plasticidade e podem alterar sua composição química em determinadas situações. Em cada neurônio ocorre a síntese, o armazenamento e a liberação final do neurotransmissor principal e de outros neuromoduladores (principalmente neuropeptídeos). Em condições ambientais de lesão tecidual e/ou inflamação, os neurônios entéricos podem apresentar mudança em sua codificação química, aprimorando a expressão de alguns neurotransmissores e neuromoduladores e diminuição de outros em adaptação à mudança (PALUS, 2016; RZAP, 2020). Observamos uma redução no número de neurônios nNOS positivos, demonstrando que a inflamação intestinal afeta não somente a densidade de neurônios entéricos, mas também sua função. Neurônios nitrérgicos são, em sua maioria, interneurônios ou neurônios motores inibitórios que inervam as camadas musculares e medeiam o relaxamento do músculo liso no trato digestório e, portanto, são importante fator envolvido na contratilidade gástrica e intestinal (BULT, 1990; RZAP, 2020). Observamos nos animais com colite induzida por DSS, uma redução significativa no número de neurônios inibitórios em relação ao grupo saudável e o grupo tratado com MSCs.

Nossos dados diferem de Robinson e colaboradores que observaram um aumento no número de neurônios nNOS positivos em modelo animal de doença inflamatória (ROBINSON et al., 2017). Entretanto, no artigo de Bódi e colaboradores, fica claro que a regulação da expressão de nNOS pode variar nos diferentes modelos animais de doenças inflamatórias intestinais (BÓDI et al., 2019). Nosso estudo utilizou camundongos e DSS, um conhecido modelo de indução de colite ulcerativa, enquanto o estudo de Robinson utilizou cobaias e TNBS, ácido que provoca uma lesão que se assemelha mais à fisiopatologia da Doença de Crohn, provocando, inclusive, diferentes respostas imunológicas. Por outro lado, nossos dados corroboram os de Machado (2019), que também observou uma redução na população de neurônios nitrérgicos no plexo mioentérico de animais com colite.

Nos últimos anos entendeu-se o papel fundamental das células da glia do sistema nervoso entérico no fornecimento de suporte neurotrófico e na resposta à inflamação (GRUBISIC e GULBRANSEN, 2017). A literatura recente vem mostrando que as células da glia do sistema nervoso entérico assumem importante papel também na regulação do sistema imune, atuando na modulação da resposta imunológica e influenciando a barreira epitelial (GRUNDMANN, 2019). Nesse sentido avaliamos, a expressão da proteína S100B, uma proteína ligante de cálcio presente principalmente nos astrócitos e em fluídos biológicos (líquido cefalorraquidiano, cordão umbilical, urina, saliva, líquido amniótico) considerada um biomarcador confiável de sofrimento neural ativo (MICHETTI, 2019). Observamos nos animais com colite induzida por DSS um aumento nos níveis de S100B, estatisticamente diferente dos demais grupos estudados. Apesar da literatura apresentar maior convergência em relação ao papel extracelular da proteína S100B (MICHETTI, 2019), estudos mostram que o número de células gliais positivas para

S100b na margem proximal das ressecções cirúrgicas está associada a recorrência pós-operatória de CD (LI et al., 2018) e que a expressão de S100b se correlaciona com a presença de CD3 (cluster de diferenciação 3) e a infiltração de células T no plexo mioentérico (COSSAIS et al., 2019) indicando, portanto o papel dessa proteína como marcador intracelular importante na fisiopatologia das DIIs. Interessantemente, o tratamento com MSCs foi capaz de reduzir os níveis intracelulares de S100B nas células da glia do plexo mioentérico, sendo que este grupo não apresentou diferença em relação aos controles saudáveis, indicando que as MSCs atuaram de forma protetiva também nas células gliais.

Em suma, nosso estudo apresenta resultados que demonstram o papel protetivo que a terapia células estromais mesenquimais promove ao plexo mioentérico durante o processo inflamatório. Tal efeito pode estar associado a uma redução da inflamação da mucosa, o que pode ter impedido que as células do plexo sofressem os efeitos da inflamação, ou a uma ação dependente da migração de MSCs para o plexo, e da liberação de fatores neurotróficos que podem ter atuado na proteção de neurônios e células da glia. Embora os mecanismos exatos da neuroproteção pelas MSCs permaneçam desconhecidos, MSCs podem agir através da liberação de fatores solúveis como moléculas neuroregulatórias, citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas, que atuam de forma neuroprotetora e neurorestauradora. Esses efeitos podem incluir o aumento viabilidade neuronal, a regeneração das fibras nervosas, bem como, a indução da proliferação e diferenciação de células progenitoras neurais endógenas (UCCELLI, 2008). Além disso, numerosos estudos demonstram que fatores solúveis liberados por MSCs medeiam a neuroproteção via suporte trófico, imunomodulação e anti-apoptose, além de atuar na redução do estresse oxidativo (ROBINSON, 2018).

Os dados aqui apresentados são relevantes para a produção de mais investigações sobre o mecanismo de neuroproteção entérica baseado em MSCs, o que favorece o avanço da aplicação da terapia celular para doenças inflamatórias intestinais.

CONCLUSÕES

A partir dos dados gerados durante este mestrado, é possível concluir que:

- a) A colite ulcerativa induzida por DSS promoveu alterações morfométricas nos plexos nervosos mioentéricos ocasionando um aumento na área total do plexo em relação ao grupo controle saudável e ao grupo tratado com MSCs;
- b) Apesar do insucesso em relação a técnica de imunorreatividade para a proteína Hu (proteína presente no soma neuronal), foi possível analisar o número de neurônios em cada plexo a partir da marcação para S100B, o que nos permitiu identificar as células da Glia do sistema nervoso entérico (IR para S100B em núcleo e citoplasma) e realizar a contagem somente dos neurônios. Observamos que, nos animais do grupo DSS houve uma redução na quantidade de neurônios por área em relação aos demais grupos. Por outro lado no grupo tratado com MSC o número de neurônios por área do plexo foi maior embora ainda tenha apresentado diferença estatística em relação ao controle saudável;
- c) A colite induzida por DSS promoveu uma diminuição na porcentagem de células imunorreativas para nNOS o que não foi observado nos demais grupos;
- d) A proteína S100b, considerada um biomarcador confiável de sofrimento neural ativo apresentou maiores níveis de imunorreatividade no grupo DSS que foi estatisticamente diferente dos demais grupos estudados.
- e) Com base no exposto, podemos concluir que as MSCs apresentaram, no modelo animal estudado, um papel protetivo não só à mucosa e submucosa, diretamente afetados pela inflamação, mas também para o plexo nervoso mioentérico durante o processo inflamatório.

PERSPECTIVAS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o objetivo de melhorar a qualidade do trabalho para publicação, temos como perspectivas:

1. Realizar, nas amostras estudadas, a avaliação de imunorreatividade para GFAP a fim de avaliar o efeito da inflamação e da terapia celular nos astrócitos;
2. Padronizar a reação de imunoistoquímica para HU e repetir as avaliações do número total de neurônios;
3. Padronizar e desenvolver a técnica de imunofluorescência para avaliarmos a dupla marcação de GFAP e S100B.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANANTHAKRISHNAN, Ashwin N. Epidemiology and risk factors for IBD. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 12, n. 4, p. 205-217, 2015.

ANDO, Yugo et al. Subcutaneous adipose tissue–derived stem cells facilitate colonic mucosal recovery from 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)–induced colitis in rats. **Inflammatory bowel diseases**, v. 14, n. 6, p. 826-838, 2008.

BAUER, Christian et al. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. **Gut**, v. 59, n. 9, p. 1192-1199, 2010.

BENARROCH, Eduardo E. Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications. **Neurology**, v. 69, n. 20, p. 1953-1957, 2007.

BIALKOWSKA, Agnieszka B. et al. Improved Swiss-rolling technique for intestinal tissue preparation for immunohistochemical and immunofluorescent analyses. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 113, p. e54161, 2016.

BÓDI, Nikolett; SZALAI, Zita; BAGYÁNSZKI, Mária. Nitroergic enteric neurons in health and disease—Focus on animal models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, p. 2003, 2019.

BOUMA, Gerd; STROBER, Warren. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nature reviews immunology**, v. 3, n. 7, p. 521-533, 2003.

BREUGELMANS, Tom et al. In-depth study of transmembrane mucins in association with intestinal barrier dysfunction during the course of T cell transfer and DSS-induced colitis. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 14, n. 7, p. 974-994, 2020.

BULT, Hetal et al. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. **Nature**, v. 345, n. 6273, p. 346-347, 1990.

CHASSAING, Benoit et al. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. **Current protocols in immunology**, v. 104, n. 1, p. 15.25. 1-15.25. 14, 2014.

CIRILLO, Carla et al. S100B protein in the gut: the evidence for enteroglial-sustained intestinal inflammation. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 17, n. 10, p. 1261, 2011.

DA COSTA GONÇALVES, Fabiany et al. Antioxidant properties of mesenchymal stem cells against oxidative stress in a murine model of colitis. **Biotechnology letters**, v. 39, n. 4, p. 613-622, 2017.

DA COSTA GONÇALVES, Fabiany et al. Antioxidant properties of mesenchymal stem cells against oxidative stress in a murine model of colitis. **Biotechnology letters**, v. 39, n. 4, p. 613-622, 2017.

DA COSTA GONÇALVES, Fabiany et al. Characterization of Acute Murine Dextran Sodium Sulfate (DSS) Colitis: Severity of Inflammation is Dependent on the DSS Molecular Weight and Concentration. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, n. 1, p. 1-9, 2013.

DA COSTA GONÇALVES, Fabiany et al. Intravenous vs intraperitoneal mesenchymal stem cells administration: what is the best route for treating experimental colitis?. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 48, p. 18228, 2014.

DE LANGE, Katrina M.; BARRETT, Jeffrey C. Understanding inflammatory bowel disease via immunogenetics. **Journal of autoimmunity**, v. 64, p. 91-100, 2015.

DHERE, T. et al. The safety of autologous and metabolically fit bone marrow mesenchymal stromal cells in medically refractory Crohn's disease—a phase 1 trial with three doses. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 44, n. 5, p. 471-481, 2016.

DIELEMAN, Palmen M.J, H. Akol, E. Bloemena, A. S. Pena et al., Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. **Clin Exp Immunol** v.114, p. 385-391. 1998.

ELSHEIKH, W. et al. Dextran sulfate sodium induces pan-gastroenteritis in rodents: implications for studies of colitis. **J Physiol Pharmacol**, v. 63, n. 5, p. 463-9, 2012.

ENGELA, Anja U. et al. Human adipose-tissue derived mesenchymal stem cells induce functional de-novo regulatory T cells with methylated FOXP3 gene DNA. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 173, n. 2, p. 343-354, 2013.

EVANGELINELLIS, Mariá Munhoz et al. Effects of a P2X7 receptor antagonist on myenteric neurons in the distal colon of an experimental rat model of ulcerative colitis. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 157, n. 1, p. 65-81, 2022.

FERRANTE, Marc et al. The value of myenteric plexitis to predict early postoperative Crohn's disease recurrence. **Gastroenterology**, v. 130, n. 6, p. 1595-1606, 2006.

FIRDAUS W.J., Wyttenbach A. Diaz-Latoud C. Currie RW. Arrigo AP. Analysis of oxidative events induced by expanded polyglutamine huntingtin exon 1 that are differentially restored by expression of heat shock proteins or treatment with an antioxidant. **FEBS J**, v. 273, p. 3076-3093, 2006.

FISCHER, Uwe M. et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. **Stem cells and development**, v. 18, n. 5, p. 683-692, 2009.

FURNESS, John B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 9, n. 5, p. 286-294, 2012.

FURNESS, John B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 9, n. 5, p. 286-294, 2012.

GONCALVES, Fabiany Da Costa et al. Bioactive factors secreted from mesenchymal stromal cells protect the intestines from experimental colitis in a three-dimensional culture. **Cytotherapy**, v. 20, n. 12, p. 1459-1471, 2018.

GONZÁLEZ, Manuel A. et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. **Gastroenterology**, v. 136, n. 3, p. 978-989, 2009.

GRÉGOIRE, Céline et al. mesenchymal stromal cell therapy for inflammatory bowel diseases. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 45, n. 2, p. 205-221, 2017.

GRUNDMANN, David et al. Enteric glia: S100, GFAP, and beyond. **The Anatomical Record**, v. 302, n. 8, p. 1333-1344, 2019.

HOLLAND, Amy Marie et al. The enteric nervous system in gastrointestinal disease etiology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 10, p. 4713-4733, 2021.

JORGENSEN, C. et al. Engineering mesenchymal stem cells for immunotherapy. **Gene therapy**, v. 10, n. 10, p. 928-931, 2003.

KANG, Jingjing et al. Systematic exposition of mesenchymal stem cell for inflammatory bowel disease and its associated colorectal cancer. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

KRAUTER, E. M. et al. Changes in colonic motility and the electrophysiological properties of myenteric neurons persist following recovery from trinitrobenzene sulfonic acid colitis in the guinea pig. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 19, n. 12, p. 990-1000, 2007.

LAKHAN, Shaheen E.; KIRCHGESSNER, Annette. Neuroinflammation in inflammatory bowel disease. **Journal of neuroinflammation**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2010.

LEE, Hyun Jung et al. Long-term effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in dextran sulfate sodium-induced murine chronic colitis. **Gut and liver**, v. 10, n. 3, p. 412, 2016.

LIANG, Jun et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in seven patients with refractory inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 61, n. 3, p. 468-469, 2012.

MACHADO, Felipe Alexandre. **Papel do receptor P2X7 nos neurônios entéricos e nas células gliais entéricas na colite ulcerativa experimental**. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MAGGINI, Julian et al. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. **PloS one**, v. 5, n. 2, p. e9252, 2010.

MICHETTI, Fabrizio et al. The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury. **Journal of Neurochemistry**, v. 148, n. 2, p. 168-187, 2019.

MOLENDIJK, Ilse et al. Allogeneic bone marrow–derived mesenchymal stromal cells promote healing of refractory perianal fistulas in patients with Crohn’s disease. **Gastroenterology**, v. 149, n. 4, p. 918-927. e6, 2015.

MUNN, David H.; MELLOR, Andrew L. Indoleamine 2, 3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. **Trends in immunology**, v. 34, n. 3, p. 137-143, 2013.

NEUNLIST, M. et al. Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. **Gut**, v. 52, n. 1, p. 84-90, 2003.

NEURATH, Markus F. Host–microbiota interactions in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 2, p. 76-77, 2020.

NICHOLL, I. D.; QUINLAN, R. A. Chaperone activity of alpha-crystallins modulates intermediate filament assembly. **The EMBO journal**, v. 13, n. 4, p. 945-953, 1994.

NUNES, Natalia Schneider et al. Temporal clinical, proteomic, histological and cellular immune responses of dextran sulfate sodium-induced acute colitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 38, p. 4341, 2018.

OKAYASU, Isao et al. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 98, n. 3, p. 694-702, 1990.

PALUS, Katarzyna; CAŁKA, Jarosław. Neurochemical plasticity of the coeliac-superior mesenteric ganglion complex neurons projecting to the prepyloric area of the porcine stomach following hyperacidity. **Neural Plasticity**, v. 2016, 2016.

PANÉS, Julián et al. Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial. **The Lancet**, v. 388, n. 10051, p. 1281-1290, 2016.

PENG, Y. et al. Mesenchymal stromal cells infusions improve refractory chronic graft versus host disease through an increase of CD5+ regulatory B cells producing interleukin 10. **Leukemia**, v. 29, n. 3, p. 636-646, 2015.

PITHADIA, Anand B.; JAIN, Sunita. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). **Pharmacological Reports**, v. 63, n. 3, p. 629-642, 2011.

PRÉVILLE, Xavier; GAESTEL, Matthias; ARRIGO, André-Patrick. Phosphorylation is not essential for protection of L929 cells by Hsp25 against H₂O₂-mediated disruption actin cytoskeleton, a protection which appears related to the redox change mediated by Hsp25. **Cell stress & chaperones**, v. 3, n. 3, p. 177, 1998.

RANI, Sweta et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: toward cell-free therapeutic applications. **Molecular Therapy**, v. 23, n. 5, p. 812-823, 2015.

ROBINSON, Ainsley M. et al. Neuroprotective potential of mesenchymal stem cell-based therapy in acute stages of TNBS-induced colitis in guinea-pigs. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0139023, 2015.

ROBINSON, Ainsley M. et al. Mesenchymal stem cells and conditioned medium avert enteric neuropathy and colon dysfunction in guinea pig TNBS-induced

colitis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 307, n. 11, p. G1115-G1129, 2014.

ROBINSON, Ainsley M. et al. The neuroprotective effects of human bone marrow mesenchymal stem cells are dose-dependent in TNBS colitis. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1-18, 2017.

RZĄP, Dominika; CZAJKOWSKA, Marta; CAŁKA, Jarosław. Neurochemical plasticity of nNOS-, VIP-and CART-immunoreactive neurons following prolonged acetylsalicylic acid supplementation in the porcine jejunum. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 6, p. 2157, 2020.

SANOVIC, Srdan; LAMB, Damian P.; BLENNERHASSETT, Michael G. Damage to the enteric nervous system in experimental colitis. **The American journal of pathology**, v. 155, n. 4, p. 1051-1057, 1999.

SKALNIKOVA, Helena et al. Mapping of the secretome of primary isolates of mammalian cells, stem cells and derived cell lines. **Proteomics**, v. 11, n. 4, p. 691-708, 2011.

SOKOL, Harry et al. Plexitis as a predictive factor of early postoperative clinical recurrence in Crohn's disease. **Gut**, v. 58, n. 9, p. 1218-1225, 2009.

UCCELLI, Antonio; MORETTA, Lorenzo; PISTOIA, Vito. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nature reviews immunology**, v. 8, n. 9, p. 726-736, 2008.

WANG, Min et al. Intraperitoneal injection (IP), Intravenous injection (IV) or anal injection (AI)? Best way for mesenchymal stem cells transplantation for colitis. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016.

WÉRA, Odile; LANCELLOTTI, Patrizio; OURY, Cécile. The dual role of neutrophils in inflammatory bowel diseases. **Journal of clinical medicine**, v. 5, n. 12, p. 118, 2016.

WINSTON, John H.; LI, Qingjie; SARNA, Sushil K. Paradoxical regulation of ChAT and nNOS expression in animal models of Crohn's colitis and ulcerative

colitis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 305, n. 4, p. G295-G302, 2013.

XUE, Hongyu; SUFIT, Alexandra JD; WISCHMEYER, Paul E. Glutamine therapy improves outcome of in vitro and in vivo experimental colitis models. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 35, n. 2, p. 188-197, 2011.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **Physiology**, v. 19, n. 3, p. 124-128, 2004.