

LAYARA ROBERTA FERREIRA DUARTE

**ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA VIA ANTI-
INFLAMATÓRIA COLINÉRGICA PROTEGE DA
DOENÇA DO ENXERTO-VERSUS-HOSPEDEIRO (GVHD)**

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Maio/2021

LAYARA ROBERTA FERREIRA DUARTE

**ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA VIA ANTI-INFLAMATÓRIA
COLINÉRGICA PROTEGE DA DOENÇA DO ENXERTO-
VERSUS-HOSPEDEIRO (GVHD)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia
Celular

Orientador(a): Dra. Barbara
Maximino Rezende

Co-orientador(a): Dra. Vanessa
Pinho da Silva

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Maio/2021

043

Duarte, Layara Roberta Ferreira.

Estimulação elétrica da via anti-inflamatória colinérgica protege da doença do enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) [manuscrito] / Layara Roberta Ferreira Duarte. – 2021.

87 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador(a): Dra. Barbara Maximino Rezende. Co-orientador(a): Dra. Vanessa Pinho da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Doença Enxerto-Hospedeiro. 3. Neurônios Colinérgicos. 4. Inflamação. I. Gonçalves, Barbara Maximino Rezende. II. Silva, Vanessa Pinho da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576

RESUMO

A doença do enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) é uma síndrome inflamatória sistêmica que ocorre após o transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas. Esta doença afeta diversos órgãos, principalmente o fígado, intestino e baço, denominados órgãos alvo da GVHD. A via anti-inflamatória colinérgica (CAIP), um mecanismo neurológico capaz de controlar a inflamação periférica por meio do nervo vago, tem se mostrado importante na modulação do sistema imunológico e redução da inflamação em diversos modelos de doenças inflamatórias, tais como colite, sepse e artrite reumatoide. Entretanto, ainda não há estudos explorando essa regulação neuroimune na GVHD. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o papel da via anti-inflamatória colinérgica na modulação da resposta inflamatória associada à GVHD. A GVHD aguda foi induzida pelo transplante de células alogênicas da medula óssea e esplenócitos de camundongos BALB/c para C57BL/6J, nos grupos GVHD e GVHD+VNS. Camundongos que receberam células da medula óssea e esplenócitos de camundongos singênicos (C57BL/6J) não desenvolveram a doença e constituíram o grupo controle. Para análise da estimulação da CAIP, os camundongos do grupo GVHD+VNS foram submetidos à estimulação elétrica do nervo vago (VNS) e 6 horas depois receberam o transplante alogênico. O fígado e o intestino foram submetidos à análise histopatológica e os animais estimulados apresentaram lesão intestinal e hepática reduzidas, enquanto os animais doentes (grupo GVHD) apresentaram lesões intestinais graves que resultaram na perda da arquitetura desse órgão, além de considerável infiltrado inflamatório no fígado. Ensaios de ELISA para as principais citocinas e quimiocinas inflamatórias também foram realizados e no grupo GVHD+VNS observamos aumento dos níveis intestinais de IL-10, TNF- α e CCL2 e diminuição nos níveis de CCL2, CCL5 e TNF- α hepáticos. Nos animais estimulados observamos também redução da atrofia esplênica associada à GVHD. Ensaios de n-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG), mieloperoxidase (MPO) e esfregaço de sangue periférico foram realizados para quantificar os leucócitos totais e diferenciais no intestino, fígado, baço e sangue. Os animais estimulados apresentaram redução no número de neutrófilos no baço e redução do número de macrófagos no fígado, assim como redução da linfopenia e neutrofilia associadas à GVHD. A função cardíaca também foi analisada por ecocardiograma e no grupo GVHD+VNS observamos prevenção do dano cardíaco associado à doença do enxerto-versus-hospedeiro. Por fim, os camundongos receptores foram avaliados clinicamente, com um sistema de pontuação padrão, e acompanhados quanto à mortalidade. A VNS reduziu os sinais clínicos e a mortalidade dos animais submetidos a GVHD. Em conjunto, esses dados demonstraram que a ativação da via anti-inflamatória colinérgica contribui para a regulação da resposta inflamatória e gravidade relacionadas à GVHD, destacando a estimulação elétrica do nervo vago como uma potencial estratégia terapêutica para a doença.

Palavras-chave: GVHD, inflamação, transplante de medula óssea, TCTH, nervo vago, via anti-inflamatória colinérgica, CAIP.

ABSTRACT

Graft-versus-host disease (GVHD) is a systemic inflammatory syndrome that occurs after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. This disease affects GVHD target organs, including liver, intestine and spleen. The cholinergic anti-inflammatory pathway (CAIP), a neurological mechanism capable of controlling peripheral inflammation through the vagus nerve, has been shown to be important in immune system modulation and reducing inflammation in several models of inflammatory diseases such as colitis, sepsis and rheumatoid arthritis. However, there are no studies exploring this neuroimmune regulation in GVHD. Therefore, the aim of this study was to evaluate the role of the cholinergic anti-inflammatory pathway in modulation of the GVHD inflammatory response. Acute GVHD was induced by transplant of allogeneic bone marrow cells and splenocytes from Balb/c mice to C57BL/6J in GVHD and GVHD+VNS groups. Mice that received bone marrow cells and splenocytes from syngeneic animals (C57BL/6J) did not develop any disease and were considered the control group. To analyze the CAIP stimulation, GVHD+VNS mice were subjected to vagus nerve electrical stimulation (VNS) 6 hours before the transplant. The liver and intestine were processed for histopathological analysis and the stimulated animals showed reduced intestinal and hepatic injury, while the animals in the GVHD group had severe intestinal injuries leading the loss of the organ architecture and a prominent inflammatory infiltrate in the liver. ELISA assays for the main inflammatory cytokines and chemokines were also performed and the GVHD+VNS group presented an increase in intestinal levels of IL-10, TNF- α and CCL2 and a decrease in hepatic levels of CCL2, CCL5 and TNF- α . We also observed a reduction in splenic atrophy in GVHD+VNS mice. N-acetyl- β -D-glicosaminidase (NAG), myeloperoxidase (MPO) and peripheral blood smear assays were performed to quantify the total and differential leukocytes in the intestine, liver, spleen and blood. The mice that received electrical stimulation showed a reduction in the infiltrate of neutrophils in the spleen and macrophages in the liver. Moreover, there was a reduction in lymphopenia and neutrophilia related to GVHD in the GVHD+VNS group. Cardiac function was also analyzed by echocardiogram and in the GVHD+VNS group, we observed a prevention of cardiac damage related to graft-versus-host disease. Finally, recipient mice were clinically evaluated with a standard scoring system and monitored for mortality. Electrical stimulation resulted in effective protection from GVHD, reducing clinical signs and lethality of the disease. Altogether, our results demonstrated that the activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway contributes to regulation of inflammatory response and severity related to GVHD. Thus, VNS has a potential therapeutic application in graft-versus-host disease treatment.

Keywords: GVHD, inflammation, bone marrow transplantation, HSCT, vagus nerve, cholinergic anti-inflammatory pathway, CAIP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fisiopatologia da GVHD.....	16
Figura 2. Representação esquemática da via anti-inflamatória colinérgica.....	24
Figura 3. Isolamento cirúrgico do nervo vago para estimulação elétrica.....	26
Figura 4. Dispositivo para VNS invasiva em camundongo.....	27
Figura 5. Estimulação elétrica invasiva do nervo vago.....	29
Figura 6. Regiões da orelha com inervação pelo ramo auricular cutâneo do nervo vago.....	30
Figura 7. Ramo cervical do nervo vago.....	30
Figura 8. Dispositivos para VNS não invasiva.....	31
Figura 9. Posições do eletrodo de estimulação elétrica não invasiva.....	31
Figura 10. A VNS reduz lesão intestinal e hepática associadas à GVHD.....	44
Figura 11. A VNS aumenta a concentração intestinal de IL-10, TNF- α e CCL2 em animais submetidos à GVHD.....	45
Figura 12. A VNS diminui a concentração hepática de CCL2, CCL5 e TNF- α em animais submetidos à GVHD.....	46
Figura 13. A VNS inibe a atrofia esplênica associada à GVHD.....	47
Figura 14. Efeito da VNS nas citocinas e quimiocinas no baço.....	48
Figura 15. A VNS previne a leucopenia e neutrofilia associadas à GVHD.....	49
Figura 16. A VNS reduz o acúmulo de neutrófilos no baço e macrófagos no fígado de animais submetidos à GVHD.....	50
Figura 17. A VNS previne danos cardíacos associados à GVHD.....	51
Figura 18. A VNS reduz a morbidade e mortalidade associadas à GVHD.....	52

LISTA DE ABREVIACOES

ACh: acetilcolina

AChE: acetilcolinesterase

aGVHD: doença do enxerto-versus-hospedeiro aguda ou “acute graft-versus-host disease”

ALT: alanina aminotransferase

APCs: células apresentadoras de antígeno

AST: aspartato aminotransferase

ATG: globulinas anti-timócitos

CAIP: via anti-inflamatória colinérgica

CDTN: Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear

cGVHD: doença do enxerto-versus-hospedeiro crônica ou “chronic graft-versus-host disease”

ChAT: colina-O-acetiltransferase

DAMPs: padrões moleculares associados ao dano

DC: Doença de Crohn

DSS: dextrano sulfato de sódio

FC: frequência cardíaca

FDA: U.S. Food and Drug Administration

FMT: transplante de microbiota fecal

GVHD: doença do enxerto-versus-hospedeiro ou “graft-versus-host disease”

GVL: enxerto contra leucemia ou “graft-versus-leukemia”

HDAC: histona desacetilase

HLA: Antígeno Leucocitário Humano

IFN- γ : interferon gama

IL-12: interleucina 12

IL-17: interleucina 17

IL-1 β : interleucina 1 beta

IL-2: interleucina 2

IL-6: interleucina 6

JAK2: Janus quinase 2

LDH: lactato desidrogenase

LPS: lipopolissacarídeo bacteriano
mAChR: receptores muscarínicos de acetilcolina
MDSCs: células supressoras de linhagem mieloide
MHC: complexo principal de histocompatibilidade
MPO: mieloperoxidase
MSCs: células-tronco mesenquimais
nAChR: receptores nicotínicos de acetilcolina
NAG: n-acetil- β -D-glicosaminidase
NF- κ B: fator nuclear de transcrição κ B
NK: células *natural killer*
PA: pressão arterial
PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos
RCE: ramo cervical esquerdo
SNC: sistema nervoso central
STAT3: transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas
TGI: trato gastrointestinal
Th17: células T produtoras de IL-17
TLR: receptor do tipo Toll
TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
Tregs: células T regulatórias
VNS: estimulação do nervo vago
 α 7nAChR: receptor alfa7 nicotínico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas	12
1.2 Doença do enxerto-versus-hospedeiro ou “graft-versus-host disease” (GVHD).....	13
1.3 Estratégias terapêuticas usadas na prevenção ou tratamento da GVHD	19
1.4 Via anti-inflamatória colinérgica (CAIP)	21
1.5 Estimulação da CAIP	26
2. OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo geral	35
2.2 Objetivos específicos	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 Animais.....	36
3.2 Estimulação elétrica do nervo vago	36
3.3 Indução da GVHD aguda	36
3.4 Avaliação dos parâmetros clínicos e sobrevivência.....	37
3.5 Confeção de lâminas histológicas	38
3.6 Avaliação da graduação histopatológica	39
3.7 Análise dos parâmetros fisiológicos do coração	40
3.8 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA.....	41
3.9 Confeção de lâminas de esfregaço sanguíneo.....	41
3.10 Quantificação do infiltrado de neutrófilos no tecido pelo método de atividade da mieloperoxidase (MPO)	42
3.11 Quantificação do infiltrado de macrófagos no tecido pelo método de atividade da n-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG).....	42
3.12 Análises estatísticas	43
4. RESULTADOS.....	44
4.1 A VNS reduz lesão intestinal e hepática associadas à GVHD	44
4.2 A VNS aumenta a concentração intestinal de IL-10, TNF-α e CCL2 e reduz a concentração hepática de CCL2, CCL5 e TNF-α em animais submetidos à GVHD	46
4.3 A VNS inibe a atrofia esplênica associada à GVHD	47
4.4 A VNS previne a linfopenia e neutrofilia associadas à GVHD	49

4.5 A VNS reduz o acúmulo de neutrófilos no baço e macrófagos no fígado de animais submetidos à GVHD	49
4.6 A VNS previne danos cardíacos associados à GVHD	50
4.7 A VNS reduz a morbidade e a mortalidade associadas à GVHD	51
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÃO	61
7. PERSPECTIVAS	62
8. REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) é uma modalidade terapêutica utilizada para uma série de doenças malignas, hematológicas, imunológicas e genéticas. Esta terapia consiste na infusão intravenosa de células progenitoras hematopoiéticas para restabelecer a função da medula em pacientes com danos nesse órgão (GONÇALVES; BENVENÛ; BONFANTI, 2009). O TCTH que usa células progenitoras hematopoiéticas do próprio paciente é chamado autólogo, enquanto o TCTH alogênico envolve a transferência de células-tronco hematopoiéticas de um indivíduo doador para uma outra pessoa, denominada receptor (GYURKOCZA; REZVANI; STORB, 2010; MAJHAIL et al., 2015).

A era do transplante de células hematopoiéticas começou com o reconhecimento de que a depleção da medula óssea por irradiação de feixe de fótons externo em camundongos poderia ser prevenida protegendo seus baços com placas de chumbo (GERSHON-COHEN; HERMEL; GRIFFITH, 1952; JACOBSON et al., 1951). Estudos subsequentes mostraram que a infusão intravenosa de células da medula óssea ou do baço após a irradiação de camundongos e ratos poderia prevenir a morte desses animais (LORENZ et al., 1951). As razões para o efeito protetor dessas intervenções experimentais foram objeto de controvérsia durante um tempo, mas em meados da década de 1950, estudos realizados em vários laboratórios concluíram que a proteção era devida a presença de células-tronco hematopoiéticas na medula óssea e baço (BARON; STORB, 2004; SMITH, 1968; THOMAS et al., 1957).

Quando desenvolvido inicialmente, o TCTH alogênico foi considerado uma abordagem para resgatar pacientes dos efeitos colaterais tóxicos de doses supra letais de radiação e quimioterapia usadas para tratar várias doenças. Contudo, logo ficou evidente que o TCTH possuía também eficácia para o tratamento de doenças malignas em decorrência das reações imunológicas das células do doador contra células hospedeiras malignas. Inicialmente, o TCTH alogênico era realizado principalmente para pacientes com leucemia em estágio avançado ou anemia aplástica após falha de todos os tratamentos convencionais (THOMAS et al., 1975b, 1975a). Entretanto, devido aos avanços na seleção de doadores, regimes de condicionamento e cuidados de suporte, o TCTH alogênico tem sido cada vez mais indicado na clínica. Desde a sua criação como terapia, foram realizados globalmente mais de 1 milhão de TCTH e no Brasil são realizados em média 2400 TCTH anualmente, dos quais 40% são alogênicos (HÜLSDÜNKER et al., 2018; TRANSPLANTES, 2020). Atualmente, as doenças mais

comumente tratadas pelo TCTH alogênico são leucemias agudas, crônicas e mielodisplásicas; síndromes mieloproliferativas; doenças malignas, como linfoma não Hodgkin, linfoma de Hodgkin e mieloma múltiplo; e ainda anemia aplástica, imunodeficiências e outras doenças não malignas diversas (GYURKOCZA; REZVANI; STORB, 2010).

Três fontes diferentes de células-tronco podem ser usadas para o TCTH: medula óssea, sangue periférico e sangue do cordão umbilical (CHEUK, 2013). As limitações no uso de células do sangue de cordão umbilical incluem uma recuperação hematopoiética mais lenta e atraso na reconstituição da função imunológica devido ao número limitado de células progenitoras (SINGH; MCGUIRK, 2016). A facilidade na obtenção das células-tronco periféricas favorece o uso dessa fonte celular, já que essas células são coletadas após o doador receber um estímulo para que as células-tronco da medula óssea sejam mobilizadas para o sangue periférico, enquanto que a doação de células-tronco da medula óssea envolve a remoção de células do osso pélvico do doador sob anestesia geral (HOLTICK et al., 2014).

Apesar de ser eficaz, o TCTH alogênico está associado a uma taxa de toxicidade significativa (RAMADAN; PACZESNY, 2015; TUGUES et al., 2018), sendo o desenvolvimento da doença do enxerto-versus-hospedeiro ou “graft-versus-host disease” (GVHD), sua principal limitação, ocorrendo em cerca de 40 a 60% dos pacientes transplantados (Tugues et al., 2018; Zeiser & Blazar, 2017).

1.2 Doença do enxerto-versus-hospedeiro ou “graft-versus-host disease” (GVHD)

A GVHD é gerada quando os linfócitos T do indivíduo doador reconhecem disparidades antigênicas presentes no organismo do paciente receptor do TCTH, levando a uma resposta inflamatória exacerbada. Esta doença é a segunda principal causa de morte em pacientes que recebem o transplante de células-tronco alogênico, atrás apenas da morte por recidiva maligna das doenças de base que justificaram o transplante (PELED; HANASH; JENQ, 2016).

A primeira descrição da GVHD foi realizada em 1956 por Dick van Bekkum, médico e pesquisador holandês, documentando a reconstituição hematopoiética após radiação letal da medula óssea. Os bombardeamentos atômicos das cidades de Hiroshima e Nagasaki no final da Segunda Guerra Mundial, causaram a morte de milhares de cidadãos japoneses devido ao desenvolvimento de uma doença desconhecida chamada de “síndrome da radiação”. Buscando compreender melhor os efeitos da exposição à bomba, Vos, Davids, Weijzen e van Bekkum

compararam a sobrevivência de camundongos após irradiação corporal total apenas ou seguida por transplante de células isogênicas (mesma linhagem para receptor e doador) ou alogênicas (células-tronco de diferentes linhagens) administradas por via intravenosa (van BEKKUM; de VRIES, 1967; VRIESENDORP; HEIDT, 2016). Foi demonstrado, então, que os camundongos que receberam apenas a irradiação morreram antes do dia 20 pelos efeitos da aplasia de medula óssea, chamada “doença primária”. Por sua vez, camundongos irradiados e infundidos com células-tronco singênicas se recuperavam da toxicidade por radiação, sem desenvolverem outros sinais clínicos. Já os animais que receberam células-tronco alogênicas se recuperaram das lesões causadas pela radiação e aplasia, mas desenvolveram uma “doença secundária”, apresentando diarreia, perda de peso, erupções cutâneas e lesões hepáticas, causando posteriormente a morte desses animais (van BEKKUM; de VRIES, 1967; BLAZAR; MURPHY; ABEDI, 2012; COGHILL et al., 2011; VOGELSANG; LEE; BENSEN-KENNEDY, 2003). Em 1962, a condição clínica conhecida como “doença secundária”, foi nomeada como doença do enxerto-versus-hospedeiro (BLAZAR; MURPHY; ABEDI, 2012).

Anos depois, em 1966, Billingham postulou os três requisitos cruciais para o desenvolvimento da GVHD: (1) o enxerto transplantado deve conter células imunocompetentes; (2) o receptor deve ser incapaz de rejeitar ou eliminar as células transplantadas; (3) e o receptor deve expressar antígenos teciduais que não estão presentes no doador do transplante, sendo reconhecidos como estranhos pelas células doadas, desencadeando então, uma reação imunológica contra essas células (BILLINGHAM, 1966). Hoje, sabemos que as células imunocompetentes são linfócitos T que estão presentes no inóculo das células-tronco e são necessários para montar uma resposta imune eficaz (GHIMIRE et al., 2017).

A identidade imunológica de um indivíduo é expressa em proteínas de superfície celular codificadas pelo sistema HLA (Antígeno Leucocitário Humano), localizado no cromossomo 6 (JAMES; GEORGOPOULOS, 2018). Essas proteínas desempenham um papel fundamental nas reações imunológicas quando células-tronco hematopoiéticas são transplantadas, pois as respostas das células T dependem da disparidade entre o doador e o receptor em relação ao HLA. Sendo assim, no cenário do transplante alogênico, o grau de incompatibilidade do HLA, gerado pela incompatibilidade de sexo entre doador e receptor e o grau de parentesco dos receptores e doadores, são importantes preditores do prognóstico do transplante alogênico. Esses fatores, somados com a intensidade do regime de condicionamento e a fonte do enxerto,

constituem os principais fatores de risco para geração da GVHD (JAGASIA et al., 2012; MARTINO et al., 2006; SINGH; MCGUIRK, 2016; ZEISER; BLAZAR, 2017).

O regime de condicionamento, ou preparação pré-transplante, é usado tanto para erradicar a doença maligna de base, quanto para induzir a imunossupressão que contribuirá para a “pega” do enxerto e replicação das células doadas (COPELAN, 2006). O cronograma desses regimes conta com sessões de quimioterapia, usando por exemplo a ciclofosfamida, um agente alquilante que possui efeitos antiangiogênicos e imunomoduladores (SISTIGU et al., 2011) e irradiação total do corpo (BARRETT; SAVANI, 2006). O regime padrão de condicionamento mieloablativo é o mais recomendado para pacientes com malignidades mieloides, porém apresenta altas taxas de mortalidade não-recidivante. Foram desenvolvidos, então, métodos de condicionamento de intensidade reduzida, projetados para serem imunossupressores, limitando a toxicidade sistêmica. Porém, regimes de baixa intensidade apresentam um risco aumentado de falha do enxerto (BARRETT; SAVANI, 2006; CHAKRAVERTY et al., 2002; MARTINO et al., 2006).

Quanto à fonte do enxerto, apesar da facilidade na obtenção das células-tronco periféricas ser uma vantagem do seu uso, alguns estudos relataram que o transplante de células-tronco periféricas está associado a um risco maior de desenvolver GVHD comparado ao transplante de células-tronco de medula óssea (HOLTICK et al., 2014). Além disso, ao analisarmos o uso das células de cordão umbilical, apesar de alguns estudos terem demonstrado diminuição do risco de GVHD em comparação com os enxertos de medula, o uso dessa fonte está associado à recuperação retardada da contagem de células e ao aumento do risco de falha do enxerto, o que acarreta maiores chances de aparecimento de hemorragia e/ou infecção nos pacientes (HARRIS; FERRARA; LEVINE, 2013).

A GVHD pode se manifestar de forma aguda e crônica, de acordo com os processos patológicos envolvidos e o tempo de aparecimento dos sintomas. Enquanto a GVHD aguda (aGVHD) apresenta muitos componentes inflamatórios, a GVHD crônica (cGVHD) apresenta predominantemente características auto-imunes e fibróticas (BLAZAR; MURPHY; ABEDI, 2012). A cGVHD se manifesta como uma patologia multiorgânica, e historicamente tem sido definida temporalmente como a GVHD que ocorre após 100 dias do transplante, apresentando sintomas como esclerose de pele; bronquiolite obliterante; lesões fibróticas na pele, pulmão e boca; além de fascite muscular ou articular (MACDONALD; HILL; BLAZAR, 2017). A aGVHD, por sua vez, pode se manifestar logo após a ocorrência do transplante e os sintomas tipicamente relacionados incluem erupção maculopapilar, hiperbilirrubinemia com icterícia,

náusea, vômitos, diarreia aquosa e/ou com sangue e cólicas abdominais (ZEISER; BLAZAR, 2017).

A GVHD aguda, foco desse trabalho, pode ser dividida em 3 fases conforme os fenômenos imunológicos que acontecem. Inicialmente, na primeira fase, moléculas como lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) liberadas das lesões intestinais durante o regime de condicionamento, além de outros padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e alguns padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), ativam receptores imunológicos inatos, incluindo receptores do tipo Toll (TLR), levando à liberação de uma “tempestade de citocinas” (BLAZAR; MURPHY; ABEDI, 2012). Os tecidos do hospedeiro danificados liberam mais “sinais de perigo”, em resposta ao regime de condicionamento, que incluem citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6), que ativam as células apresentadoras de antígeno (APCs) do hospedeiro (MALARD; HUANG; SIM, 2020) (Figura 1).

Na segunda fase, a interação das células T com as APCs ativadas que expressam MHC e antígenos de histocompatibilidade menores do hospedeiro, leva à ativação e expansão das células T (ZEISER; BLAZAR, 2017) (Figura 1). Uma resposta eficiente das células T requer também sinais co-estimulatórios. A CD28 foi bem caracterizada como a molécula co-estimulatória mais eficaz, expressa por células T não ativadas e ativadas, para regulação das respostas dessas células em diversas doenças, incluindo a GVHD. A co-estimulação através de CD28 regula vários aspectos da função das células T, incluindo a secreção de citocinas, proliferação e sobrevivência celular (LI et al., 2011).

Finalmente, na terceira fase, as células T ativadas na fase anterior e monócitos migram para os tecidos-alvo da GVHD (pele, intestino, fígado e baço) e recrutam outras células efetoras, como linfócitos T citotóxicos e células NK (*natural killer*). Essas células efetoras, ao chegarem nos tecidos alvos, causam danos, através de citotoxicidade direta ou liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , interleucina 2 (IL-2), interleucina 12 (IL-12), interleucina 17 (IL-17), interferon gama (IFN- γ), CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5 (CASTOR; PINHO; TEIXEIRA, 2012; CHEUNG et al., 2012; KUMAR; MOHAMMADPOUR; CAO, 2017; WESTIN et al., 2011; ZEISER; BLAZAR, 2017) (Figura 1). A diferenciação das células T em células efetoras ou de memória, assim como o equilíbrio entre as células T efetoras e as células T regulatórias (Tregs) são decisivos em relação à capacidade de geração da GVHD aguda (RAMADAN; PACZESNY, 2015; ZEISER; BLAZAR, 2017).

Apesar de causarem danos e serem as principais células responsáveis pelo desenvolvimento da GVHD, as células T alorreativas derivadas dos doadores são fundamentais para atacarem as células malignas do hospedeiro, produzindo o efeito benéfico conhecido como enxerto contra leucemia, do termo em inglês, “graft-versus-leukemia” (GVL). Embora a depleção de células T da amostra do doador antes do transplante alogênico possa prevenir ou reduzir a GVHD, isso implica em um prejuízo da resposta GVL e o aumento das taxas de recidiva da doença de base (TUGUES et al., 2018). Sendo assim, tratamentos eficazes devem ser capazes de reduzir os danos causados pela GVHD, sem, no entanto, comprometerem a atividade do enxerto-versus-leucemia.

Nosso entendimento das características biológicas da GVHD é baseado principalmente em estudos em camundongos. Embora a aplicação desses estudos em humanos seja limitada por diferenças nos níveis fisiológicos e imunológicos, modelos murinos da GVHD embasam a geração de novos conhecimentos acerca da doença (ZEISER; BLAZAR, 2017). Devido à disponibilidade de uma infinidade de reagentes, animais transgênicos ou knockout e linhagens de células tumorais transplantáveis para avaliar os efeitos antitumorais, modelos murinos facilitam o estudo dos processos imunológicos associados à GVHD. A indução de modelos agudos de GVHD em camundongos geralmente é realizada pelo transplante de medula óssea como fonte de células-tronco hematopoiéticas, suplementado com esplenócitos, em receptores alogênicos irradiados. Assim é possível que sejam testadas novas abordagens de tratamento e é esta a estratégia experimental utilizada em nosso trabalho (BLAZAR; MURPHY; ABEDI, 2012).

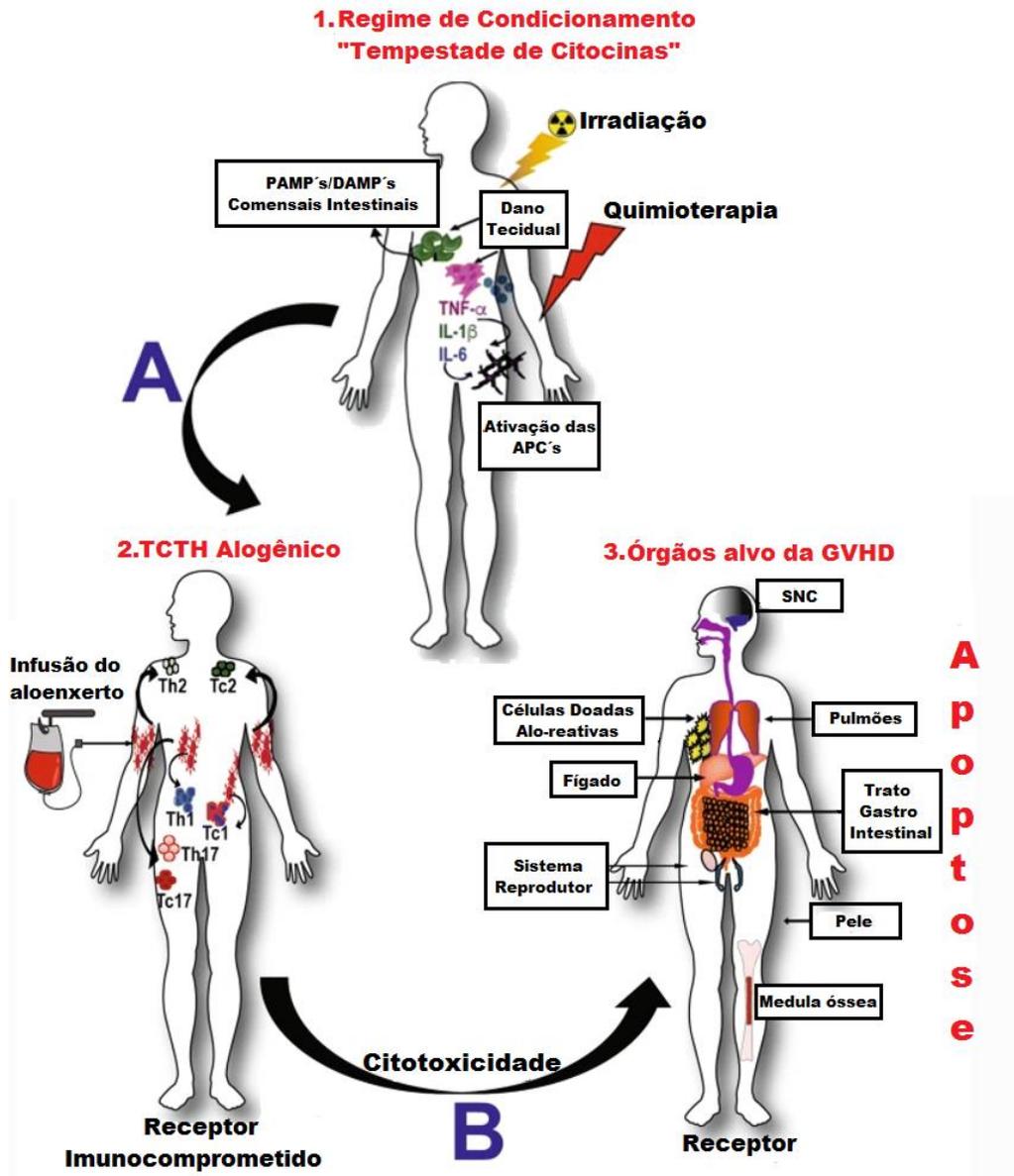


Figura 1. Fisiopatologia da GVHD. O desenvolvimento da GVHD se inicia com o regime de condicionamento, que envolve sessões de irradiação e/ou quimioterapia. Este regime produz dano tecidual e, conseqüentemente, a liberação de várias citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , fenômeno conhecido como "tempestade de citocinas". O dano tecidual também causa a liberação de DAMPs e PAMPs. A liberação dos PAMPs/DAMPs e das citocinas levam ao aumento da expressão de antígenos via MHC nas células apresentadoras de antígenos. O paciente imunocomprometido é então submetido a um transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênico. As células T maduras do doador, infundidas em um ambiente preparado para ativação imunológica, interagem com as APCs do hospedeiro, o que leva à proliferação e polarização de LT em células T CD4⁺ Th1, Th2 e Th17 e células T CD8⁺ citotóxicas. Essas células T patogênicas ativadas se infiltram em vários órgãos-alvo, incluindo o intestino, o sistema nervoso central, o fígado, o trato gastrointestinal, a pele e o sistema reprodutor, amplificando a destruição local do tecido, por exemplo, por meio de apoptose das células residentes (Adaptada de VILLA; MCFADDEN, 2018).

1.3 Estratégias terapêuticas usadas na prevenção ou tratamento da GVHD

A medida profilática mais adotada para a GVHD aguda envolve a utilização de ciclosporina, um inibidor da calcineurina, e metotrexato, um antimetabólito com atividade anti-inflamatória e antiproliferativa, que atua diminuindo a atividade das células T em baixas doses não citotóxicas (GIACCONE et al., 2005; HAMILTON, 2018). Um estudo sequencial, prospectivo e randomizado, mostrou que uma combinação de ciclosporina e metotrexato foi superior ao uso da ciclosporina isolada na prevenção da GVHD (ZEISER; BLAZAR, 2017). Entretanto, apesar da adoção de medidas profiláticas, aproximadamente 60% dos pacientes ainda desenvolvem a doença e seu tratamento é baseado no uso de glicocorticoides, sendo a metilprednisolona ou a prednisona, nas doses de 1 a 2 mg/kg, os mais utilizados (QIAN; WU; SHEN, 2013).

A ampla atividade dos glicocorticoides, incluindo a indução de apoptose das células T, supressão da ativação de macrófagos e supressão na liberação de citocinas pró-inflamatórias, explica porque esses medicamentos ainda são o tratamento de primeira linha tanto da GVHD aguda como da GVHD crônica. Porém, a administração de altas doses e/ou uso prolongado desses medicamentos pode causar efeitos colaterais graves, tais como aumento na taxa de infecções oportunistas, diabetes, miopatia e osteonecrose, que são fatores que aumentam a morbidade e mortalidade associadas à GVHD (MARTÍNEZ; URBANO-ISPÍZUA, 2011). Apesar do uso dos glicocorticoides, aproximadamente 50% dos pacientes tratados não apresentam melhora, desenvolvendo a GVHD aguda refratária a esteroides, que é diagnosticada quando a doença progride em 3 dias ou não há melhora clínica após 5 a 7 dias do tratamento inicial com glicocorticoides (QIAN; WU; SHEN, 2013). Para esses pacientes, não há um bom prognóstico a longo prazo, com uma taxa de sobrevivência de apenas 5 a 30% (BLAZAR; MURPHY; ABEDI, 2012; WESTIN et al., 2011; ZEISER; BLAZAR, 2017).

Estratégias terapêuticas atuais vêm sendo estudadas como alternativas ao uso dos glicocorticoides, como por exemplo, inibidores de calcineurina e micofenolato, que interferem com diferentes sinais de ativação das células T (CHOI; REDDY, 2014). Outra opção terapêutica é a ciclofosfamida, que induz seletivamente a apoptose de células T aloativadas (BLAZAR; MURPHY; ABEDI, 2012). Agentes que causam depleção de linfócitos, como globulinas anti-timócitos (ATG) e anticorpos citotóxicos dirigidos contra antígenos expressos em linfócitos T, tais como os anticorpos monoclonais dirigidos contra o receptor CD52 também podem ser utilizados. Embora estas drogas provaram ser úteis para o tratamento da GVHD, nenhuma delas é totalmente eficaz. Além disso, apesar de apresentarem diminuição da resposta inflamatória

associada à GVHD, essas estratégias baseadas na imunossupressão de células T possuem efeitos deletérios, por atuarem também impedindo a GVL (BLAZAR; MURPHY; ABEDI, 2012; QIAN; WU; SHEN, 2013).

Como estratégia de segunda linha, há também o uso de agentes bloqueadores de TNF- α , como o etanercept, uma molécula solúvel que compete pela ligação do TNF- α em seus receptores celulares, ou o infliximab, um anticorpo monoclonal que se liga ao TNF α , impedindo sua ligação aos seus receptores. Entretanto, apesar de serem mais específicas, não resultaram em maiores taxas de sobrevida (LEVINE, 2011). Recentemente, inibidores da JAK2 (Janus quinase 2) demonstraram efeitos promissores no controle da GVHD, assim como os inibidores da histona desacetilase (HDAC). Estudos em modelos animais mostraram que a inibição de JAK2 preveniu a migração de células T para os órgãos alvos da GVHD. Inibidores da HDAC, por sua vez, são capazes de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-12 e IL-6, o que resultou, em ambos os tratamentos, na redução dos sintomas da GVHD e preservação da ação da GVL (CARNITI et al., 2015; GHIMIRE et al., 2017; REDDY et al., 2008; TESHIMA; REDDY; ZEISER, 2016).

Estratégias focadas na modulação da microbiota intestinal, como abordagens que usam transplante de microbiota fecal (FMT), também estão em fase de testes experimentais e clínicos para tratamento da GVHD. Entretanto, apesar dos estudos preliminares sugerirem que o FMT em receptores de TCHT é seguro, viável e associado com uma eficácia promissora em vários cenários clínicos, até agora não foram obtidos dados suficientes para comprovação de sua aplicabilidade clínica. Ainda não foram criados protocolos de triagem padronizados para pacientes imunocomprometidos, nem há ampla evidência sobre a identificação de fatores associados à falha do tratamento nesta população de pacientes (ABU-SBEIH; ALI; WANG, 2019). Portanto, serão necessárias avaliações prospectivas adicionais sobre o uso de FMT em pacientes submetidos ao TCHT para melhor compreender seus efeitos sobre o microbioma do receptor e para melhor caracterizar sua influência nos resultados clínicos obtidos (ABU-SBEIH; ALI; WANG, 2019; DEFILIPP et al., 2018; VAN LIER et al., 2020; WEBB et al., 2016).

Abordagens celulares também vem sendo utilizadas, como a indução das células Tregs em pacientes, a partir da administração de interleucina 2 (IL-2). Além das Tregs, existem outros candidatos alternativos à terapia celular na GVHD, como as células-tronco mesenquimais (MSCs), que atuam como imunorreguladoras indiretas e induzem o reparo tecidual (GHIMIRE et al., 2017; TESHIMA; REDDY; ZEISER, 2016).

Apesar da variedade de estratégias de segunda e terceira linhas para tratamento da GVHD aguda refratária a esteroides, há para quase todas, baixas taxas de resposta associadas à alta mortalidade (GHIMIRE et al., 2017; QIAN; WU; SHEN, 2013). Desta forma, há ainda hoje, grande interesse científico e clínico na busca por novos alvos farmacológicos e alternativas terapêuticas para a GVHD.

1.4 Via anti-inflamatória colinérgica (CAIP)

Nas últimas décadas, tornou-se evidente que a comunicação entre os sistemas nervoso e imunológico pode influenciar a resposta inflamatória através da liberação de neurotransmissores, citocinas e hormônios. Vários mecanismos baseados nessa comunicação já foram descritos, como por exemplo, a liberação de glicocorticoides pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal demonstrou ter um importante papel na modulação do sistema imunológico e redução da inflamação (MATTEOLI; BOECKXSTAENS, 2013).

A compreensão dos mecanismos neurais que regulam a inflamação avançou com a identificação de uma via capaz de inibir a ativação de macrófagos. Em 2000, Borovikova e colegas, demonstraram em um primeiro estudo, que a estimulação do nervo vago periférico atenuou significativamente o desenvolvimento da hipotensão induzida por LPS (choque) em ratos expostos a doses letais de endotoxina. Essa prevenção do choque estava relacionada à supressão da síntese de TNF- α no fígado, baço e coração, com conseqüentemente diminuição das concentrações séricas de TNF- α durante a endotoxemia. Nesse mesmo ano, em um segundo estudo, durante a investigação do agente anti-inflamatório “Semapimod” (CNI-1493), que atua inibindo a p38 MAP quinase, Borovikova e colegas, revelaram o efeito anti-inflamatório vagal usando também um modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Tanto a aplicação intracerebroventricular de CNI-1493, quanto a estimulação elétrica do nervo vago periférico, diminuíram os sinais da inflamação aguda, inibindo a síntese periférica de TNF- α (BOROVIKOVA et al., 2000a, 2000b). Esses experimentos demonstraram, pela primeira vez, que as fibras eferentes do nervo vago fornecem um canal de comunicação entre o sistema nervoso central e o sistema imunológico que controla a inflamação através da liberação de acetilcolina, sendo esse circuito denominado via anti-inflamatória colinérgica ou “cholinergic anti-inflammatory pathway” (CAIP) (BONAZ; SINNIGER; PELLISSIER, 2017b; HUSTON; TRACEY, 2011; SOUZA et al., 2002; TRACEY, 2002).

Propõe-se que, durante a estimulação da CAIP, os neurônios sensoriais periféricos sejam ativados por mediadores inflamatórios, tais como TNF- α , IL-1 β e HMGB1 liberados durante o processo inflamatório, seguido do envio de sinais para o sistema nervoso central (SNC) via fibras vagais aferentes (HUSTON; TRACEY, 2011; TRACEY, 2002). As fibras vagais eferentes, por sua vez, liberam neuromediadores na periferia para modular células imunes locais (GOVERSE; STAKENBORG; MATTEOLI, 2016; HUSTON; TRACEY, 2011; KANASHIRO et al., 2017). A base molecular deste circuito anti-inflamatório inclui o neurotransmissor acetilcolina (ACh) que interage com o receptor alfa7 nicotínico ($\alpha 7$ nAChR) expresso em monócitos, macrófagos, células dendríticas e outras células imunes (HUSTON; TRACEY, 2011).

O sistema colinérgico é uma das vias excitatórias que participam do sistema parassimpático, simpático e do sistema nervoso central, usando a acetilcolina como neurotransmissor. A acetilcolina é um composto quimicamente estável e que pode persistir por um longo período após ser liberada na fenda sináptica. Sua molécula é sintetizada a partir de dois precursores: acetil coenzima A e colina, a partir da ação da enzima colina-O-acetiltransferase (ChAT). A ACh é então liberada por fusão de vesículas em membranas celulares e interage com seus receptores muscarínicos (mAChR) e nicotínicos (nAChR) (HUSTON; TRACEY, 2011). Sua eliminação espontânea é lenta devido ao átomo de amônio quaternário existente na porção da colina e, por esse motivo, a enzima acetilcolinesterase (AChE) está presente no sistema neurossintético da fenda para terminar rapidamente o sinal. A AChE divide a acetilcolina em ácido acético e colina (CHEUNG et al., 2012; POHANKA, 2012).

Os receptores muscarínicos da nicotina são uma família de receptores acoplados à proteína G que desempenham um papel importante na neurotransmissão colinérgica central. Os subtipos de receptores muscarínicos foram inicialmente classificados farmacologicamente como M1 ou M2 com base em sua sensibilidade diferencial à pirenzepina, um antagonista seletivo do receptor M1. Entretanto, através de técnicas de biologia molecular, são conhecidos agora cinco subtipos de receptores muscarínicos nomeados de M1 a M5 com base na ordem de sua descoberta (FELDER, 1995). Os membros da família de receptores muscarínicos de acetilcolina estão envolvidos em um grande número de funções fisiológicas, tanto no sistema nervoso central quanto na periferia do corpo. Periféricamente, os receptores muscarínicos medeiam ações como redução da frequência cardíaca, contrações de fibras musculares lisas e estimulação da liberação de secreções glandulares. Já os receptores muscarínicos centrais estão

envolvidos em um grande número de funções vegetativas, sensoriais e motoras (WESS, 1993; WESS et al., 2003). Receptores muscarínicos do subtipo M1 intracerebrais, por exemplo, foram implicados no controle das funções viscerais pelo nervo vago, incluindo a síntese de glicogênio no fígado e estímulo da secreção pancreática exócrina (HUSTON; TRACEY, 2011; PAVLOV et al., 2006b; TRACEY, 2002).

Diferenças importantes são observadas entre a regulação das funções fisiológicas pela via colinérgica vagal clássica, predominantemente mediada por receptores muscarínicos, e a função imunomoduladora do nervo vago, mediada principalmente pelo receptor nicotínico $\alpha 7$ nAChR (GALLOWITSCH-PUERTA; PAVLOV, 2007; PAVLOV et al., 2006b). Os receptores nicotínicos de acetilcolina consistem em canais catiônicos formados por cinco subunidades que permitem o influxo de cátions. Os nAChRs presentes em células não neuronais existem como pentâmeros heteroméricos compostos de unidades α e β ($\alpha 2/\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5/\alpha 6/\alpha 9/\alpha 10$ e $\beta 2/\beta 3/\beta 4$) ou como um pentâmero homomérico composto de subunidades $\alpha 7$ (KAWASHIMA et al., 2012). O subtipo $\alpha 7$ nAChR, expresso por células imunes, como células mononucleares, linfócitos e células dendríticas, é ativado rapidamente, após a ligação com a ACh ou seus agonistas, e sua dessensibilização também é rápida (FUJII et al., 1996; GALLOWITSCH-PUERTA; PAVLOV, 2007). Este receptor, $\alpha 7$ nAChR, exibe uma maior permeabilidade para cátions de cálcio (Ca^{2+}) em relação aos outros nAChRs (COUTURIER et al., 1990). Como resultado do aumento das concentrações intracelulares de Ca^{2+} , as vias de sinalização celular são ativadas, induzindo respostas que regulam o processo inflamatório (ZDANOWSKI et al., 2015). Os efeitos gerados pela estimulação de $\alpha 7$ nAChRs levam à inibição da atividade do NF- κ B (fator nuclear de transcrição κ B), por supressão da fosforilação de I- κ B. Além disso, a ativação de $\alpha 7$ nAChR pode levar ao recrutamento de JAK2 iniciando uma transdução de sinais intracelular mediada pela STAT3 (transdutor de sinal e ativador da transcrição 3). Como resultado, essas sinalizações promovem a inibição do processo inflamatório (DE JONGE et al., 2005; KANASHIRO et al., 2017; ZDANOWSKI et al., 2015). Já foi demonstrado ainda, em modelo de colite induzido por oxazolona em camundongos, que a ativação do receptor nicotínico $\alpha 7$ nAChR está associada à melhora clínica e histológica do cólon, como consequência de um aumento de células Tregs e uma diminuição recíproca de células T produtoras de IL-17 (Th17), indicando desta forma que o efeito terapêutico da ativação do $\alpha 7$ nAChR decorre também da relação de Treg e Th17 (GALITOVSKIY et al., 2011).

Tendo em vista a extensa inervação do trato gastrointestinal, não é de se surpreender que o sistema nervoso, através do nervo vago, desempenhe um papel importante na modulação

da ativação imune na parede intestinal (GOVERSE; STAKENBORG; MATTEOLI, 2016). Já foi demonstrado que há no trato gastrointestinal uma comunicação vagal direta entre a parede intestinal e o SNC (BERTHOUD; CARLSON; POWLEY, 1991; BERTHOUD; JEDRZEJEWSKA; POWLEY, 1990). Durante a inflamação intestinal, ocorre ativação direta de núcleos vagais, como já foi demonstrado em um modelo murino de íleo pós-operatório (CAILOTTO et al., 2012; THE et al., 2011). A sinalização colinérgica é capaz de controlar a inflamação por meio da redução de citocinas pró-inflamatórias em diferentes condições inflamatórias intestinais tais como colite, íleo pós-operatório e doença de Crohn (Figura 2). Na literatura era descrito que, na parede intestinal, o nervo vago entra em contato com as células imunes apenas indiretamente, uma vez que os nervos eferentes vagais fazem sinapses somente com os neurônios entéricos. No entanto, evidências anatômicas mais recentes revelaram uma grande proximidade entre fibras neuronais colinérgicas e macrófagos residentes no intestino, tanto no nível do plexo mioentérico quanto na lâmina própria (CAILOTTO et al., 2011; NEMETHOVA et al., 2013; MATTEOLI et al., 2014). Esse subconjunto de macrófagos residentes no intestino está localizado entre as camadas musculares da parede intestinal, no nível do plexo mioentérico, e é regulado pela ativação da CAIP. Após sua ativação, essas células são capazes de controlar a inflamação por meio da inibição da ativação dos próprios macrófagos e também da regulação da liberação de citocinas, tais como TNF- α , IL-1 β e IL-6, produzidas por essas células (BOROVIKOVA et al., 2000a; WANG et al., 2003). Corroborando a interação do nervo vago com o sistema imune gastrointestinal, a realização da vagotomia, por sua vez, agravou o quadro de colite gerado por dextrano sulfato de sódio (DSS) em modelo murino experimental, através de um mecanismo mediado por macrófagos e a liberação de níveis mais altos de IL-6, IL-1 β , e TNF- α . Embora muitas células imunes intestinais expressem receptores nicotínicos para interagir com a ACh, macrófagos e células dendríticas são descritas como as principais efetoras dessa via (JI et al., 2014a).

Em contraste com o que se observa no intestino, a ativação da CAIP no baço ocorre de forma indireta. O modelo atualmente proposto para ativação da CAIP no baço, reconhece que a ligação do nervo vago com esse órgão não é exclusivamente neural (MARTELLI; MCKINLEY; MCALLEN, 2014). Como há evidências de que os linfócitos podem sintetizar e liberar acetilcolina, foi proposto que eles podem ser a fonte de acetilcolina que retransmite as informações funcionais originárias do nervo vago para o baço (ROSAS-BALLINA et al., 2011). Assim, a ativação do nervo esplênico e, subsequente liberação de noradrenalina, estimula a produção de acetilcolina por um subconjunto de células T CD4⁺ presentes na polpa branca

esplênica pela ativação do receptor β 2-adrenérgico expresso em suas membranas (MATTEOLI; BOECKXSTAENS, 2013). A acetilcolina em seguida, cruza a zona marginal em direção à polpa vermelha e ativa os receptores nicotínicos α 7nAChRs, presentes em macrófagos esplênicos, o que resulta na supressão da produção de mediadores inflamatórios, tais como TNF- α , IL-1 β e HMGB1 (BASSI et al., 2020; GIGLIOTTI; OKUSA, 2014; MATTEOLI; BOECKXSTAENS, 2013).

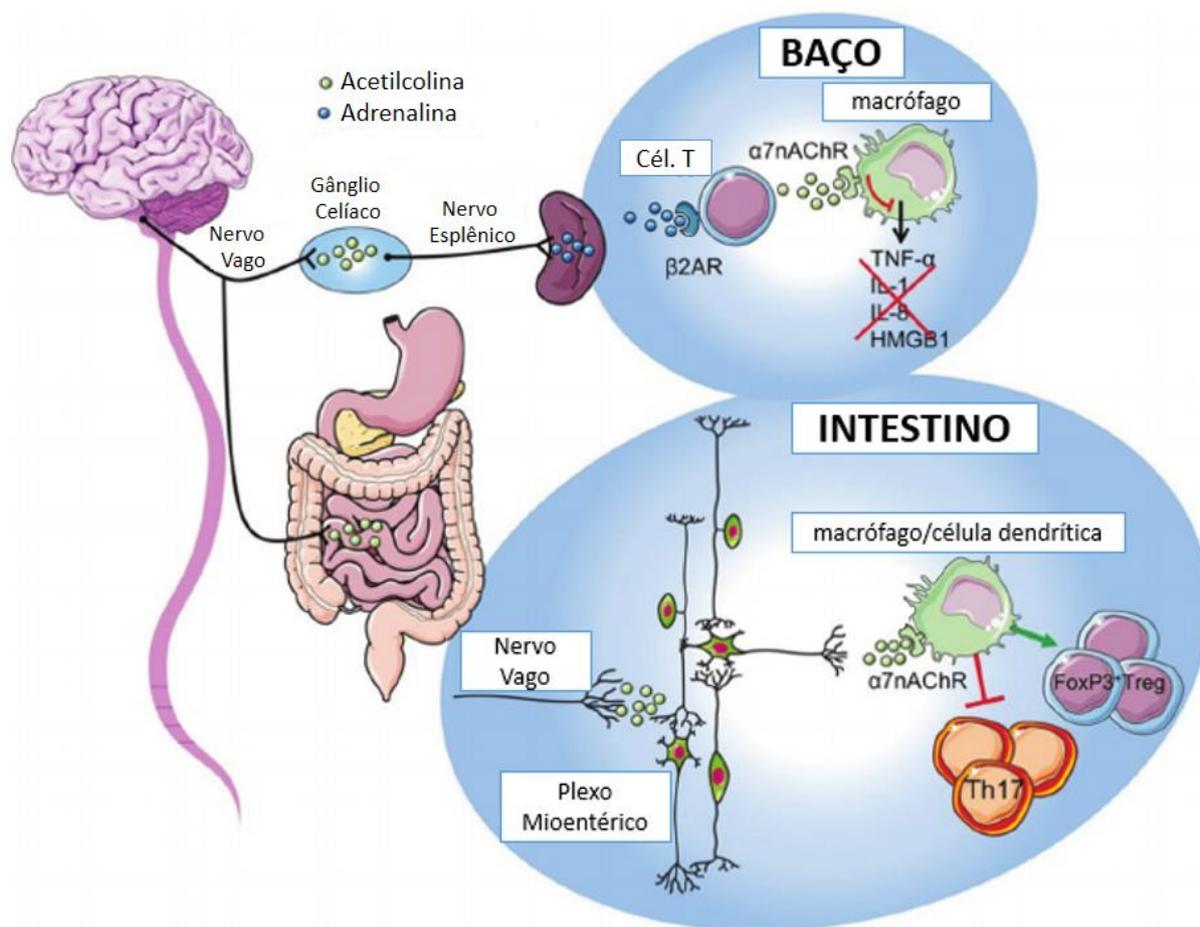


Figura 2. Representação esquemática da via anti-inflamatória colinérgica. Durante a inflamação sistêmica, o sistema nervoso central é ativado pelos nervos aferentes vagais. Após a integração com o SNC, essa entrada sensorial acionará o “braço” eferente vagal através do gânglio mesentérico celíaco superior, modulando a resposta imune no baço. A ativação dos neurônios adrenérgicos no baço leva à liberação de adrenalina que induz a liberação de acetilcolina por um subconjunto de células T que expressam em suas membranas receptores β 2-adrenérgicos. A acetilcolina interage com α 7nAChR expresso em macrófagos produtores de citocinas, reduzindo a liberação TNF- α , IL-1 β , IL-8, HMGB1 e outros mediadores inflamatórios. No intestino, a ativação do “braço” eferente vagal, entra em contato direto com os neurônios mioentéricos, presentes no plexo mioentérico da parede intestinal. A ativação dos neurônios entéricos induz a liberação de acetilcolina, levando ao controle da inflamação

intestinal, por meio da ligação da acetilcolina em seu receptor $\alpha 7nAChR$ presente em células como macrófagos e células dendríticas. Essa ligação causa alterações no equilíbrio dinâmico das respostas linfocitárias, com a diminuição da atividade de linfócitos do tipo Th17, responsável pelo aumento dos sinais inflamatórios e aumento da resposta de linfócitos do tipo Treg, que possuem ação no controle da inflamação (Adaptada de Matteoli ; Boeckxstaens, 2013).

1.5 Estimulação da CAIP

A via anti-inflamatória colinérgica pode ser ativada por estimulação do nervo vago (VNS, do inglês “Vagus Nerve Stimulation”) via fármacos, ou eletricamente por meio de eletrodos. A estimulação farmacológica da CAIP é realizada a partir da administração de agonistas de $\alpha 7nAChR$ ou por inibidores da acetilcolinesterase (JI et al., 2014a). Essas drogas levam à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, prevenindo lesões teciduais e melhorando a sobrevida em vários modelos experimentais de inflamação como endotoxemia (BERNIK et al., 2002), pancreatite experimental (VAN WESTERLOO et al., 2006), modelo murino de artrite reumatoide (VAN MAANEN et al., 2009), íleo pós-operatório (THE et al., 2011), colite (JI et al., 2014b; SHIFRIN et al., 2013) e peritonite séptica (VAN WESTERLOO et al., 2005). A administração de galantamina, um inibidor de acetilcolinesterase, por exemplo, foi capaz de diminuir drasticamente a liberação de TNF- α , melhorando a sobrevida em modelos murinos de endotoxemia (PAVLOV et al., 2006a).

O $\alpha 7nAChR$ também pode ser ativado por agonistas como a nicotina e o 3-(2,4-dimetoxibenzilideno)-anabaseína, conhecido como GTS-21. Já foi descrito que o uso da nicotina causa inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 β , em macrófagos, e também está associado à inibição da expressão de moléculas de adesão, produção de citocinas e proliferação de células T (LIU et al., 2014; WANG et al., 2003). A GTS-21, por sua vez, apesar de ter sido desenvolvida principalmente para o tratamento da doença de Alzheimer (KOX et al., 2009), tem se mostrado também eficaz na atenuação das respostas inflamatórias, em modelos animais de pancreatite (VAN WESTERLOO et al., 2006), endotoxemia (PAVLOV et al., 2007), sepse (PAVLOV et al., 2007), lesão pulmonar aguda (SU et al., 2007) e lesão por isquemia-reperfusão (KOX et al., 2009). Além do grande potencial terapêutico da GTS-21 como estimulador da CAIP, usada no tratamento de condições inflamatórias, o uso dela é preferido em relação ao uso da nicotina, pois esta pode apresentar efeitos colaterais tóxicos e tem potencial para produzir dependência física (KOX et al., 2009).

A estimulação elétrica da CAIP, por sua vez, pode ser realizada de forma não invasiva e invasiva. Para realização da VNS não invasiva em camundongos, os animais recebem a estimulação do nervo vago de forma transcutânea por estimulação elétrica das conchas da orelha direita com um estimulador de pulso isolado (Modell 2100, A-M Systems, Carlsborg, WA, EUA) (HONG et al., 2019). Esta estimulação, porém, não é seletiva para fibras eferentes do nervo vago. Já a VNS invasiva, em modelos experimentais de camundongos, é realizada a partir da estimulação da via cervical do ramo esquerdo do nervo vago, a partir de um processo cirúrgico, no qual o ramo cervical esquerdo do nervo vago, que é adjacente à artéria carótida esquerda, é separado da artéria e sobreposto ao eletrodo de estimulação elétrica (Figuras 3 e 4) (CARAVACA et al., 2019; INOUE et al., 2016; SILVERMAN et al., 2018; ZHANG et al., 2021).

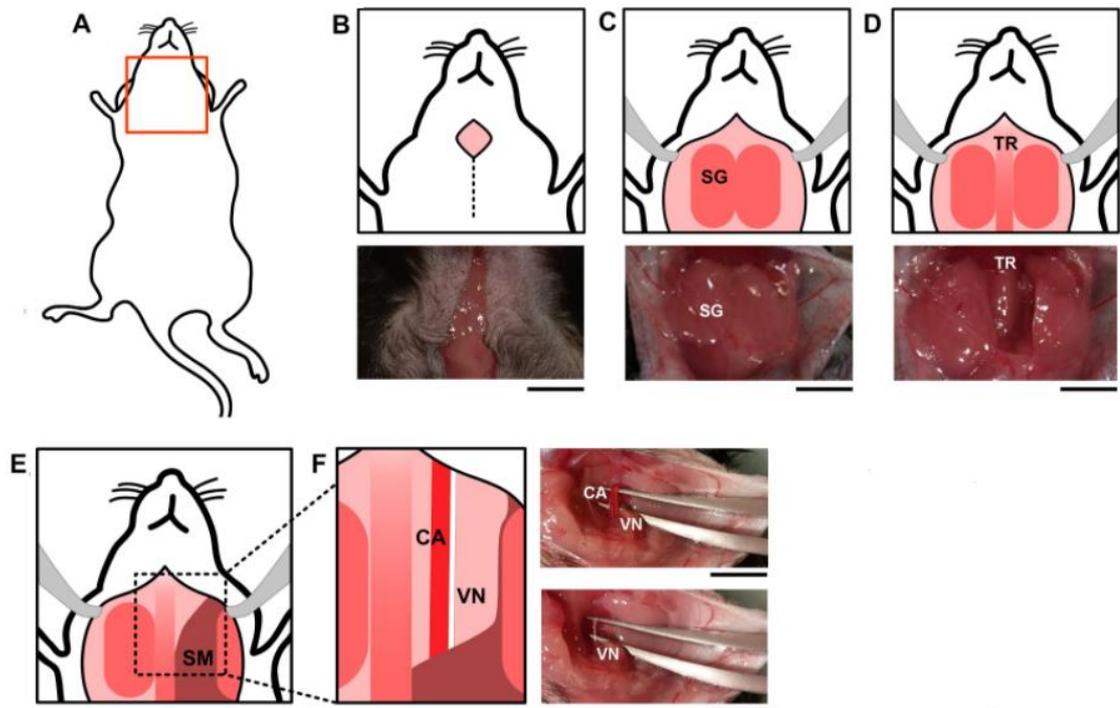


Figura 3. Isolamento cirúrgico do nervo vago para estimulação elétrica. (A) Indicação da área cervical do camundongo para antissepsia com iodo. (B) Incisão cervical mediana, expondo as (C) glândulas salivares (SG) e (D) a traqueia (TR). Os tecidos subcutâneos entre os músculos (E) esternomastóideo (SM) e esterno-hióideo ao longo da traqueia foram separados por dissecação para revelar a (F) artéria carótida comum (CA) e o nervo vago cervical. O nervo vago e a artéria carótida (F) estão localizados paralelos um ao outro e são separados por uma pinça curva com as pontas voltadas para cima (CARAVACA et al., 2019).



Figura 4. Dispositivo para VNS invasiva em camundongo. Estimulador AVS-T-1M-1C (AVS Projetos, São Paulo, Brasil).

Vários estudos têm demonstrado o efeito benéfico da VNS em modelos de doenças inflamatórias. Foi observado por exemplo, que a estimulação do nervo vago *in situ* inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias no fígado e no tecido cardíaco em animais submetidos à isquemia-reperfusão por pinçamento aórtico transitório (BERNIK et al., 2002; TRACEY, 2002). Estudos em modelos experimentais de insuficiência cardíaca também mostraram que a estimulação elétrica crônica do nervo vago exerce efeitos benéficos na função do ventrículo esquerdo e na sobrevivência dos animais (DE FERRARI; SCHWARTZ, 2011). Foi demonstrado ainda em modelos experimentais de colite e endotoxemia, que a VNS farmacológica suprime a atividade da mieloperoxidase (MPO) e diminui níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, e que o efeito anti-inflamatório da VNS farmacológica foi abolido em camundongos com neurectomia esplênica ou esplenectomia (JI et al., 2014a). A estimulação farmacológica da CAIP também leva a uma menor produção de mediadores pró-inflamatórios e maior sobrevivência em modelo de sepse em camundongos (WANG et al., 2004). Em um modelo padronizado de artrite murina experimental induzida pela aplicação de carragenina, a VNS farmacológica foi capaz de inibir a resposta inflamatória e suprimir o desenvolvimento do edema de pata,

indicando que a via anti-inflamatória colinérgica pode inibir também inflamações localizadas (BOROVIKOVA et al., 2000b; TRACEY, 2002).

Assim como demonstrado para camundongos, a estimulação do nervo vago pode ser aplicada em humanos de forma invasiva ou não invasiva através da pele. A VNS invasiva é realizada sob anestesia geral por um neurocirurgião. Um eletrodo é enrolado em torno do nervo vago cervical esquerdo no pescoço e conectado subcutaneamente por um cabo a um gerador de pulsos, localizado à esquerda da parede torácica (Figura 5). A VNS é classicamente realizada no ramo esquerdo do nervo vago, pois ele inerva o nó atrioventricular do coração, enquanto que o ramo direito do nervo vago inerva o nó sinoatrial, obtendo assim, uma influência mais fraca na frequência cardíaca. A VNS com estimulador implantável é segura e bem tolerada, mas há eventos adversos associados ao procedimento cirúrgico, porque apesar de ser um procedimento minimamente invasivo, é inerentemente arriscado devido ao local de implantação, com a colocação do eletrodo exigindo a dissecação do nervo vago da artéria carótida (YAP et al., 2020). Os eventos adversos cirúrgicos mais frequentes incluem infecção (em 3% a 6% dos pacientes, não ocasionando a troca do dispositivo na maioria dos casos), parestesia das cordas vocais e fraqueza facial inferior. Porém, com o aprimoramento da técnica cirúrgica, alterações permanentes da voz e fraqueza facial inferior tornaram-se raras. Os efeitos adversos cardíacos associados a dispositivos VNS implantáveis ocorrem principalmente na sala de cirurgia durante o teste inicial do dispositivo. Isso inclui bradicardia, assistolia ventricular e bloqueio cardíaco completo. Dependendo do tempo de uso, a substituição da bateria do gerador de estímulos deverá ser realizada por meio de uma cirurgia adicional (BEN-MENACHEM et al., 2015).

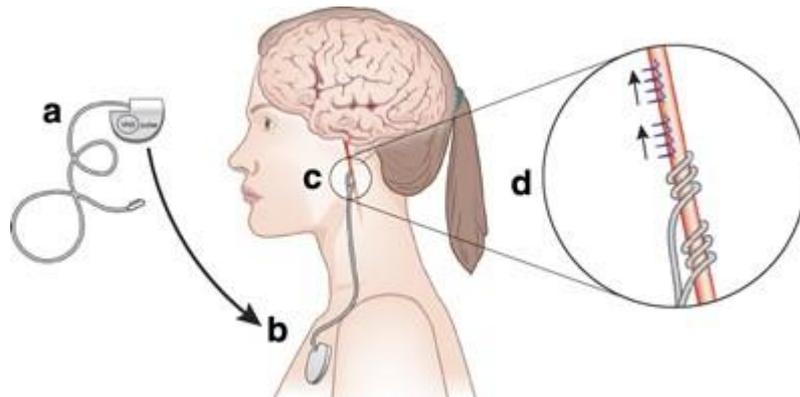


Figura 5. Estimulação elétrica invasiva do nervo vago. O gerador para a VNS (A) contém uma pequena bateria que gera impulsos elétricos. Um cirurgião implanta o gerador sobre o tórax (B) e anexa os eletrodos ao nervo vago esquerdo (C). Sinais intermitentes do dispositivo para VNS são conduzidos pelo nervo vago (D) e entram na medula (Adaptada de CLANCY et al.2014).

A VNS não invasiva não precisa de cirurgia de implantação e, portanto, apresenta melhorias na segurança e na tolerabilidade (BONAZ; SINNIGER; PELLISSIER, 2017b). Uma possível rota não invasiva para a VNS é a estimulação elétrica do ramo auricular do nervo vago, que é distribuído para a orelha externa. Esta estimulação pode ser realizada transcutaneamente, aplicando eletrodos de superfície. Estudos anatômicos da orelha sugerem que o trago, a concha e a concha címica são os locais do corpo humano onde há distribuições do nervo vago aferente (Figura 6). Acredita-se que a estimulação direta dessas fibras nervosas produz efeitos terapêuticos semelhantes aos da VNS invasiva. A estimulação do nervo vago cervical transcutânea é outro método que foi desenvolvido para estimular de forma não invasiva o nervo vago com eletrodos colocados sobre o músculo esternocleidomastóideo. Este é um local semelhante ao que os eletrodos para VNS invasiva são posicionados (Figura 7), no entanto, a localização do nervo vago dentro da bainha carotídea abaixo da pele, da fáscia superficial e do músculo esternocleidomastóideo (Seiden et al., 2013) pode tornar difícil a estimulação transcutânea seletiva das fibras do nervo vago, provavelmente estimulando indiscriminadamente as fibras aferentes e eferentes (CLANCY et al., 2014).



Figura 6. Regiões da orelha com inervação pelo ramo auricular cutâneo do nervo vago (Adaptada de YAP et al., 2020).

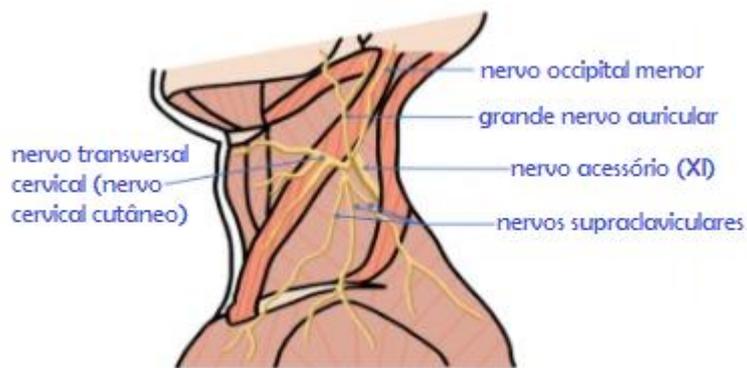


Figura 7. Ramo cervical do nervo vago (Adaptada de YAP et al., 2020).

Entre os dispositivos mais comumente comercializados para estimulação elétrica não invasiva, estão o gammaCore® e o NEMOS® Cerbomed. O gammaCore® (electroCore LLC, Basking Ridge, NJ, EUA) é um dispositivo portátil para VNS que consiste em um estimulador com bateria eletrônica de geração e amplificação de sinal e interface de usuário de controle digital que controla a amplitude do sinal. Dois discos redondos de aço inoxidável funcionam como superfícies de contato com a pele que fornecem um sinal elétrico de baixa voltagem para o nervo vago cervical (Figuras 8 e 9). Os efeitos adversos relacionados ao seu uso incluíram desconforto local e uma leve irritação da pele causada pelo gel condutor (BEN-MENACHEM et al., 2015). O NEMOS® é também um dispositivo portátil para VNS que estimula transcutaneamente o nervo vago por meio de eletrodos dentro de um fone de ouvido posicionado na orelha externa (conchas cómbicas) (Figuras 8 e 9). O produto é posicionado de

maneira semelhante a um reproduzidor de música com um fone de ouvido conectado a um cabo (Figura 9) (YAP et al., 2020). Quase sempre, o dispositivo gammaCore® electroCore é usado para estimulação local do pescoço, enquanto que o dispositivo NEMOS® Cerbomed é predominantemente usado para estimulação na orelha (BEN-MENACHEM et al., 2015) (Figura 9).

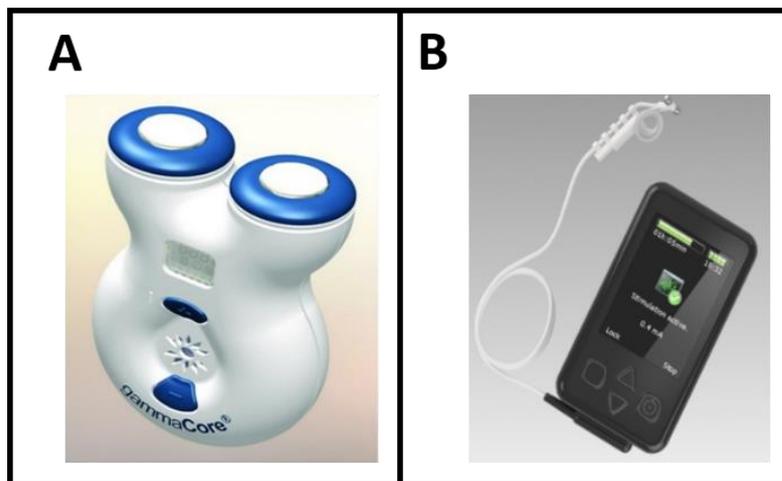


Figura 8. Dispositivos para VNS não invasiva. (A) gammaCore® e (B) Cerbomed NEMOS® (BEN-MENACHEM et al., 2015).

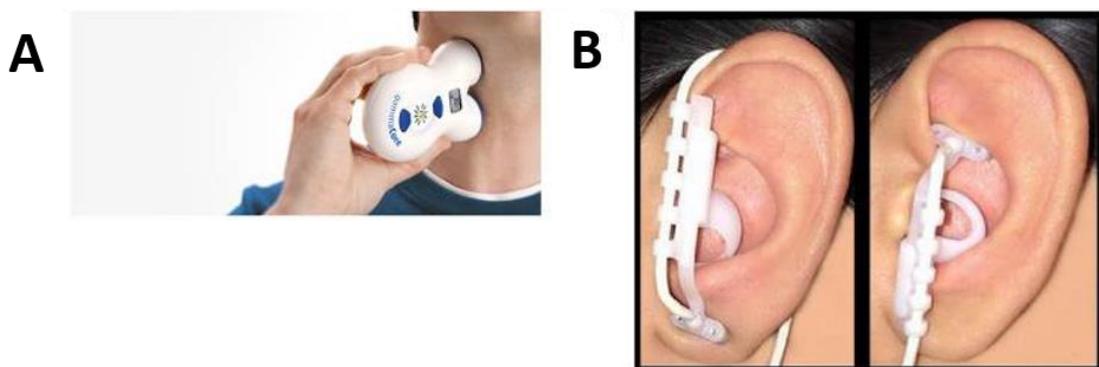


Figura 9. Posições do eletrodo de estimulação elétrica não invasiva. (A) Estimulação do pescoço usando um dispositivo gammaCore® (SILBERSTEIN et al., 2016) e (B) estimulação da concha címica da orelha usando eletrodos NEMOS® (FRANGOS; ELLRICH; KOMISARUK, 2015).

Em 2005, o FDA (U.S. Food and Drug Administration) aprovou o uso da VNS para o tratamento de depressão farmacorresistente e epilepsia refratária (BONAZ; SINNIGER;

PELLISSIER, 2017b; DE FERRARI; SCHWARTZ, 2011; LEI; DUAN, 2019). Atualmente, aproximadamente 100.000 pacientes já foram tratados com a estimulação elétrica do nervo vago para epilepsia e 5.000 para depressão (BONAZ; SINNIGER; PELLISSIER, 2017b). A VNS se mostrou também uma terapia potencial para o tratamento da inflamação gerada após cirurgia abdominal. Pacientes submetidos a esse procedimento sofrem de dificuldades na motilidade gastrointestinal, causadas pela inflamação gerada após a realização da cirurgia. A VNS invasiva nesses pacientes ativou a CAIP e mostrou efeito anti-inflamatório mediado pela ativação de macrófagos e redução da produção das citocinas IL-6 e IL-8 (LEI; DUAN, 2019; STAKENBORG et al., 2017).

Em um estudo piloto de VNS invasiva em pacientes com Doença de Crohn (DC), a VNS foi usada como uma alternativa ao tratamento com anti-TNF- α e foi capaz de induzir a remissão da doença nos pacientes com DC leve e DC ativa. Essa remissão foi observada por biópsias que mostraram significativa redução da inflamação nos tecidos do cólon. Além disso, foi observada melhora na percepção da dor abdominal e humor dos pacientes. Sendo assim, este estudo sugere que a VNS pode ser usada como uma alternativa ao uso do anti-TNF- α , já que a estimulação nervosa é mais barata do que essa terapia. Também não foram observados efeitos colaterais importantes, nenhum efeito cardíaco clinicamente relevante e o dispositivo foi bem tolerado (BONAZ et al., 2016; BONAZ; SINNIGER; PELLISSIER, 2017a).

Por último, foi realizado um estudo recente de coorte em pacientes com artrite reumatoide nos estágios iniciais da doença, que não respondiam à terapia com metotrexato (coorte 1) e pacientes em estágios avançados da doença, tendo falhado várias drogas antirreumáticas (coorte 2). Nesse estudo, a VNS invasiva melhorou os sinais clínicos da doença em ambas as coortes, e essas respostas clínicas foram acompanhadas por reduções significativas da liberação de TNF- α durante os períodos de remissão da doença. Os eventos adversos relatados foram leves a moderados, incluindo rouquidão transitória, rouquidão pós-operatória e bradicardia intraoperatória transitória durante a cirurgia, entretanto, nenhum dos pacientes desenvolveu infecção pós cirurgia. Portanto, os resultados obtidos nos estudos iniciais que usaram a VNS em humanos encorajam a busca de uma melhor compreensão dessa técnica como alternativa terapêutica para diversas doenças inflamatórias em que a CAIP possa estar envolvida.

Considerando a alta morbimortalidade observada e que somente 50% dos pacientes com GVHD conseguem responder ao tratamento convencional à base de glicocorticoides, faz-se necessário à busca por novas estratégias terapêuticas capazes de diminuir os sintomas, a

mortalidade e os danos aos órgãos-alvo associados à doença do enxerto-versus-hospedeiro. Tendo em vista a contribuição da estimulação da CAIP na regulação da inflamação em outros modelos e que ainda não há estudos associando essa estratégia terapêutica à GVHD, nos propusemos investigar o seu efeito na resposta inflamatória associada à doença.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Compreender o papel da via anti-inflamatória colinérgica na modulação da resposta inflamatória associada à doença do enxerto-versus-hospedeiro (GVHD).

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito da VNS elétrica na lesão intestinal e hepática em camundongos submetidos à GVHD;
2. Avaliar o efeito da VNS elétrica nos níveis de citocinas e quimiocinas intestinais, hepáticas e esplênicas em camundongos submetidos à GVHD;
3. Avaliar o efeito da VNS elétrica no perfil leucocitário do sangue em camundongos submetidos à GVHD;
4. Avaliar o efeito da VNS elétrica no acúmulo de neutrófilos e macrófagos no intestino, fígado e baço, por meio da expressão de NAG e MPO, em camundongos submetidos à GVHD;
5. Avaliar o efeito da VNS elétrica nos parâmetros morfológicos e fisiológicos do coração de camundongos submetidos à GVHD;
6. Avaliar o efeito da VNS elétrica na evolução dos aspectos clínicos e sobrevida em camundongos submetidos à GVHD.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos das linhagens C57BL/6J e Balb/c, ambos machos, com oito a doze semanas de vida e fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram acondicionados em ambiente com temperatura controlada e acesso livre à água e comida. Todos os procedimentos experimentais realizados na execução deste estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA-UFMG) através do protocolo 40/2018. Ressalta-se que em todos os ensaios os devidos cuidados foram tomados para minimizar o sofrimento dos camundongos.

3.2 Estimulação elétrica do nervo vago

Os camundongos receptores, C57BL/6J, foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p) de cetamina e xilazina. O ramo cervical esquerdo (RCE) do nervo vago, que é adjacente a artéria carótida esquerda, foi identificado, separado da artéria e sobreposto ao eletrodo de estimulação elétrica. Foi aplicado um pulso de onda com frequência de 5 Hz, largura de 0,1 ms e intensidade de corrente de 1 V, por 2 minutos conforme o protocolo já estabelecido por Fonseca et al.(2019). Em seguida, foi realizada sutura no local da cirurgia. Seis horas após a VNS, os camundongos foram submetidos à indução da GVHD.

3.3 Indução da GVHD aguda

Como regime de condicionamento, os camundongos receptores, C57BL/6J, foram irradiados letalmente com 9 Gy de radiação gama, divididos em duas doses de 4,5 Gy com intervalo de duas horas, utilizando fonte de CO60, no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN) da UFMG. No mesmo dia da irradiação, após 6hs da VNS, os camundongos dos grupos GVHD e GVHD+VNS, receberam 3×10^7 esplenócitos e 1×10^7 células da medula óssea do fêmur isoladas de camundongos doadores da linhagem Balb/c (transplante alogênico). O grupo controle do transplante foi constituído de camundongos C57BL/6J que receberam células de camundongos também C57BL/6J, e, portanto, não desenvolveram a GVHD (transplante singênico). Para a realização do transplante, uma suspensão de células foi preparada a partir de um “pool” de células do baço adicionadas a um “pool” de células da medula óssea femoral. O baço dos camundongos doadores foi retirado e gentilmente

desmanchado em uma placa de Petri com um auxílio de uma peneira de Nylon em 5 mL de meio RPMI incompleto gelado. Para isolamento das células da medula femoral, ambos os fêmures de cada camundongo foram retirados e suas cabeças cortadas com lâmina de bisturi, possibilitando a inserção de uma agulha 13x0,38 mm para lavagem da medula com 3 ml de meio RPMI incompleto gelado. Posteriormente, as células foram colocadas em tubos Falcons, identificados e separados para medula e baço. Os Falcons foram colocados na centrífuga Jouan B4i Multifunction Centrifuge (Thermo Electron Corporation) a 4 graus Celsius e 1500 rpm (406 g) por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 10 mL de meio RPMI incompleto para a contagem do número de células em câmara de Neubauer, utilizando-se o corante Tripán na diluição de 1:100. Esta contagem foi realizada para analisar a viabilidade e o número de células a serem injetadas no camundongo receptor. Todos os grupos experimentais receberam tratamento com antibiótico ciprofloxacino diluído em água filtrada (70 mg de antibiótico por litro de água filtrada ofertada na mamadeira dos camundongos). A água com o antibiótico foi trocada a cada 2 dias durante 15 dias após a irradiação para evitar doenças secundárias à imunossupressão gerada pela ablação total da medula.

3.4 Avaliação dos parâmetros clínicos e sobrevivência

Após a indução da GVHD, os camundongos foram avaliados de dois em dois dias para análise dos parâmetros clínicos da doença, utilizando uma escala clínica com pontuação de 0 a 12. Esta escala foi criada a partir de uma adaptação da escala utilizada em trabalhos anteriores do nosso grupo (BERNARDES et al., 2015; REZENDE et al., 2013). Os seguintes parâmetros clínicos foram acompanhados: variação do peso corporal, piloereção, atividade, postura em flexão do tronco, ocorrência de diarreia e presença de sangue oculto nas fezes. Cada parâmetro clínico recebeu uma pontuação de 0 (ausência) a 2 (presença) ou intensidade: leve (0,5)/moderada (1)/intensa (2). A soma desses 6 parâmetros clínicos atingiu dessa forma, o máximo de 12 pontos. O sangue oculto foi verificado através do kit diagnóstico da FECA-CULT (InLab), de acordo com as instruções do fabricante. O aspecto do pelo (pelo arrepiado) foi pontuado com 2 pontos quando apresentou alterações ao longo de toda extensão dorsal do camundongo, com 1 ponto se estava presente na região dorsal anterior (cabeça e pescoço) dos camundongos ou com 0 quando não foram observadas alterações. A pontuação da variação do peso corporal foi dada a partir da análise do percentual de peso perdido. Foi pontuado com 0 o animal que não teve perda de peso corporal; 0,5 se a perda foi de até 10% do peso corporal

inicial; 1 se a perda foi entre 10 a 20%; e 2 se a perda de peso corporal foi acima de 20%. A postura foi graduada de acordo com o grau de inclinação ou flexão do tronco. O animal recebeu pontuação 0 quando não apresentou nenhuma inclinação aparente; 0,5 para uma leve inclinação; 1 para uma inclinação moderada e 2 quando a inclinação se agravou, levando o camundongo a assumir uma flexão de tronco próxima do total com aproximação das patas dianteiras às traseiras. A atividade foi pontuada com 0 quando não tinha alterações, 0,5 quando foi observada uma apatia leve, 1 para apatia moderada e 2 para apatia grave (letargia). As fezes dos animais também foram avaliadas e pontuadas quanto à presença de diarreia em 0 (fezes sem alterações), 1 (fezes pastosas) e 2 (fezes líquidas) e quanto à presença ou não de sangue: 0 (ausência), 0,5 (pequena quantidade de sangue) 1 (moderada quantidade de sangue) e 2 (grande quantidade de sangue). Os camundongos também foram monitorados diariamente para a verificação da mortalidade. Os parâmetros clínicos foram analisados de 2 em 2 dias até que o grupo GVHD apresentasse 100% de mortalidade.

3.5 Confeção de lâminas histológicas

O jejuno e íleo do intestino delgado e o lobo direito do fígado, foram retirados dos camundongos dos grupos estudados no início da mortalidade para confecção das lâminas histológicas. Os intestinos foram retirados inteiros, lavados com PBS, estendidos em papel, e abertos pela borda anti-mesentérica. As porções do jejuno e íleo foram separadas e preparadas em forma de rocamboles, conforme descrito em Arantes e Nogueira (1997). Os rocamboles foram armazenados em formol tamponado 4% em PBS por 24 horas e, em seguida em álcool 70% até o seu processamento. Durante o seu processamento os tecidos sofreram desidratação, realizada através de passagens consecutivas em etanol em diferentes concentrações (80%, 90%, absoluto I, II e III – 30 minutos cada); diafanização com xilol (I e II - 20 minutos cada) e embebidos em parafina líquida (Paraplast Sigma) (I e II – 30 minutos cada). Os tecidos foram incluídos em fôrmas de papel contendo parafina líquida, onde permaneceram por 24 horas. Os blocos foram levados ao micrótomo e cortes dos tecidos (espessura de 5µm) foram realizados. As lâminas contendo os cortes foram então desparafinizadas (xilol I e II – 20 minutos e álcool absoluto I, II e III, 90%,80%, 70% - 2 minutos em cada) e coradas com hematoxilina (20 segundos) e eosina (50 segundos) (coloração H&E). Em seguida, as lâminas foram desidratadas e montadas com lamínulas e bálsamo do Canadá sintético. O lobo direito do fígado foi também retirado, armazenado em formol tamponado 4% PBS e foram confeccionadas lâminas histológicas conforme descrito acima.

3.6 Avaliação da graduação histopatológica

As camadas do epitélio, da lâmina própria, da muscular e da serosa do jejuno-íleo dos intestinos e o fígado foram analisadas no microscópio óptico Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) utilizando-se objetivas de 10x e 20x. A quantificação dos parâmetros histopatológicos da reação ocasionada pela GVHD foi realizada de acordo com uma adaptação de critérios utilizados por vários autores (BERNARDES et al., 2015; COLSON et al., 2004; REZENDE et al., 2013; THIELE et al., 1989). Atribuiu-se um valor numérico às alterações observadas nas três camadas do intestino de acordo com os critérios abaixo:

Epitélio:

- 0 = sem alterações;
- 1 = alterações reacionais discretas;
- 2 = alterações associadas com erosão ou perda da arquitetura da região das criptas ou da superfície do epitélio;
- 3 = alterações proliferativas nucleares e hiperplasia do epitélio das criptas ou epitélio de superfície, com ou sem evidências de ulceração e perda das células caliciformes.

Lâmina Própria:

- 0 = aspecto normal;
- 1 = discreto aumento de mononucleares na lamina própria;
- 2 = discreto a moderado aumento de células inflamatórias, edema e congestão;
- 3 = celularidade aumentada com alargamento das vilosidades, edema e congestão.

Muscular e Serosa:

- 0 = sem alterações;
- 1 = discreto infiltrado e edema da serosa;
- 2 = moderado infiltrado inflamatório da muscular e serosa, em focos;
- 3 = sinais de necrose isquêmica e intensas alterações inflamatórias da muscular e da serosa.

Utilizando estes critérios somados, a porção do intestino que obteve pontuação de 0 a 3, apresentava-se normal, ou com alterações discretas, 4 a 6 alterações moderadas e 7 a 9 alterações acentuadas. Exemplo: epitélio (3) + lâmina própria (3) + muscular e serosa (3) =

pontuação final 9 (alterações acentuadas nas três estruturas). Foram examinados no mínimo três animais por grupo, trabalhando-se com a média obtida por grupo.

No fígado, atribuiu-se um valor numérico às alterações degenerativas do parênquima de acordo com os critérios abaixo:

0 = normal;

1 = discreta vacuolização citoplasmática e eosinofilia focal;

2 = difusa vacuolização, alteração da forma do hepatócito, alterações nucleares acentuadas;

3 = necrose hepatocitária e vacuolização difusa, alteração da forma do hepatócito e alterações nucleares acentuadas.

Também foi avaliado o infiltrado inflamatório por meio da seguinte pontuação:

0 = nenhum ou raro;

1 = discreto infiltrado na área periportal;

2 = presença de infiltrado discreto ou moderado na área periportal e intralobular;

3 = presença de infiltrado acentuado na área periportal e intralobular;

Cada camundongo recebeu uma graduação gerada pela soma dos 2 critérios acima que poderia chegar a um índice máximo de 6 pontos.

3.7 Análise dos parâmetros fisiológicos do coração

A função cardíaca dos animais foi avaliada *in vivo* de forma não invasiva, utilizando um sistema de ecocardiografia transtorácica de alta resolução (EcoDopplercardiografia) 14 dias após a indução e 35 dias após a indução. Após anestesia com isoflurano, os camundongos foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma placa aquecida, equipada com eletrodos para registro de eletrocardiograma que permite o monitoramento constante da frequência cardíaca, e manutenção da temperatura corporal em 37°C. Foram avaliados: volumes diastólico e sistólico finais, fração de encurtamento, fração de ejeção, e débito cardíaco. A massa ventricular esquerda, espessura das paredes ventriculares posteriores e espessuras do septo intraventricular também foram avaliadas. Todos esses parâmetros foram calculados de forma automática pelo software do equipamento (VEVO 2100 VisualSonics, Toronto, Canadá).

3.8 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA

Para realização do ensaio de ELISA, a retirada do jejuno-íleo, fígado e baço ocorreu após eutanásia dos animais que alcançaram um escore clínico entre 9 a 12 pontos, pois nesse intervalo, a maioria dos sinais clínicos associados à GVHD atingiu sua pontuação máxima, indicando a instalação da forma grave da doença. Para aqueles animais que não atingiram essa pontuação de escore, os órgãos analisados foram retirados no dia de eutanásia do último animal do grupo GVHD. Os níveis de citocinas e quimiocinas foram medidos em homogenatos destes órgãos através de *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA). Cem miligramas/mL do jejuno-íleo (úmido), do lobo quadrado hepático e do baço foram homogeneizados com PBS contendo antiproteases (0,1 mM PMSF, 0,1 nM benzetonio clorídrico, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% de Tween20. As amostras foram colocadas na centrífuga Allegra X-30 (Beckman Coulter) por 10 minutos, a 10.000 rpm e 4°C. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio de ELISA com diluições de 1:2 para o jejuno-íleo e 1:3 para o fígado e baço. O ensaio de ELISA foi realizado conforme as instruções do fabricante (R&D System) e quantificado a partir do comprimento de onda de 492 nm adquirido em leitor de placas.

3.9 Confeção de lâminas de esfregaço sanguíneo

Um pequeno corte na extremidade da cauda dos camundongos foi realizado no 35º dia após a indução e uma pequena gota de sangue foi coletada diretamente da cauda e colocada próxima a uma das extremidades da lâmina de microscopia, já com a identificação do camundongo. Com o auxílio de outra lâmina (lâmina extensora), a gota de sangue foi colocada em contato com sua borda, e foi realizado um movimento para trás tocando a gota com o dorso em um ângulo de 45°. Em seguida, foi realizado um deslizamento uniforme e suave de uma lâmina sobre a outra, em direção oposta a extremidade em que estava a gota de sangue. Depois de completamente estendido, o sangue formou uma película sobre a lâmina de vidro. O esfregaço foi colocado em uma superfície limpa e deixado secar por 24 horas sem nenhuma interferência. A coloração foi feita utilizando-se o kit de panótico rápido (Laborclin). Foram preenchidos 4 recipientes (cubas de Coplin) com os respectivos reagentes do Kit e um com água destilada para retirada do excesso dos reagentes ao final do processo. As lâminas foram submergidas (com movimentos contínuos de cima para baixo) por 5 segundos em cada uma das soluções (5 imersões de 1 segundo cada, esperando escorrer bem entre as soluções). Ao final da coloração, as lâminas foram lavadas com água destilada e esperou-se secar por 24 horas

antes da leitura em microscópio. Posteriormente, as lâminas foram analisadas ao microscópio óptico Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) utilizando-se objetiva de 100x e óleo de imersão. Para contagem diferencial dos leucócitos foram percorridas diferentes regiões da lâmina até a contagem de 100 células. Esse procedimento foi realizado duas vezes e ao final foi feita uma média das duas contagens.

3.10 Quantificação do infiltrado de neutrófilos no tecido pelo método de atividade da mieloperoxidase (MPO)

Porções de 100 mg/ml do baço, fígado ou intestino dos animais foram ressuspensas em solução de Na_3PO_4 0,05M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio a 3,5% p/v (BUFFER 2). Em seguida, esta solução foi homogeneizada em vórtex, congelada e descongelada em nitrogênio líquido por 3 vezes e centrifugada a 4° por 15 minutos na centrífuga Allegra X-30 (Beckman Coulter) a 10.000 rpm. Os sobrenadantes foram imediatamente recolhidos e utilizados para o ensaio de MPO. A reação foi iniciada após a adição de 25 μL do sobrenadante recolhido após centrifugação e pela adição de 25 μL de TMB (3,3,5,5 – tetrametilbenzidina), diluído em BUFFER 2 em placas de 96 poços. A reação se processou a 37°C por 30 minutos. Posteriormente foi adicionado 100 μL de H_2O_2 (0,002%) a cada poço e a placa foi novamente incubada a 37°C por 20 minutos. A reação foi finalizada ao serem adicionados 100 μL de H_2SO_4 (1M) a cada poço. As placas de 96 poços foram lidas em leitor de ELISA (Emax, Molecular Devices) a 450 nm. Os resultados foram expressos como mudanças na absorbância O.D. por miligrama de tecido.

3.11 Quantificação do infiltrado de macrófagos no tecido pelo método de atividade da n-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG)

Porções de 100 mg/ml do baço, fígado ou intestino, foram ressuspensas em solução salina 0,9% (4° C) contendo 0,15 v/v de Triton X-100 (Merck). Em seguida, essa solução foi homogeneizada em vórtex e centrifugada a 4° por 10 minutos a 10.000 rpm na centrífuga Allegra X-30 (Beckman Coulter). Os sobrenadantes foram imediatamente recolhidos e utilizados para o ensaio de NAG com diluição de 1:2 para intestino e 1:3 para fígado e baço. A reação foi iniciada após a adição de 100 μL do sobrenadante retirado após centrifugação e pela adição de 100 μL de p-nitrofenil-Nacetil- β -D-glicosaminidina (Sigma), diluído em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1M; Na_2HPO_4 0,1 M; pH 4,5) na concentração final de 2,24mM.

A reação se processou a 37°C por 30 minutos, em placas de 96 poços. O término da reação foi dado pela adição de 100 µL de tampão glicina 0,2M. (Ph 10,6). As placas de 96 poços foram lidas em leitor de ELISA (Emax, Molecular Devices) a 405 nm. O número de macrófagos foi calculado a partir de uma curva padrão da atividade de NAG expressa em aumento de absorbância a partir de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos estimulados com tioglicolato 3%, conforme descrito no estudo de Barcelos et al. 2004. Os resultados foram expressos como mudanças na absorbância O.D. por miligrama de tecido.

3.12 Análises estatísticas

Os dados de escore histopatológico foram analisados estatisticamente por análise de variância (One-way ANOVA), seguida do teste Newman-Keuls e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0.05$. Os demais dados foram analisados estatisticamente por teste t de Student e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0.05$. Os dados foram expressos como média \pm SEM. As análises estatísticas e os gráficos foram elaborados utilizando-se o *software* GraphPad Prism 8.0.1.

4. RESULTADOS

4.1 A VNS reduz lesão intestinal e hepática associadas à GVHD

Inicialmente, buscamos compreender a influência da VNS em lesões do intestino e fígado, já que esses órgãos são comumente afetados pela GVHD aguda (MATSUKUMA et al., 2016; NEUMANN et al., 2007). Para isso, avaliamos o efeito da estimulação elétrica do nervo vago, 6 horas antes da indução da doença, na graduação histopatológica do jejuno-íleo e fígado de animais submetidos à GVHD. Foi observado que camundongos do grupo GVHD apresentaram lesões graves nesses órgãos. A análise histológica do intestino mostrou perda parcial da arquitetura do órgão, aumento da celularidade, edema e congestão. Alterações degenerativas graves, ulcerações da mucosa e áreas de necrose focal nas camadas musculares e serosas também foram observadas quando comparados com os animais do grupo controle (Figura 10A-B). O grupo GVHD+VNS apresentou uma menor graduação histopatológica global, apresentando preservação da arquitetura do tecido intestinal (Figura 10C e 10G). No fígado, destacou-se um infiltrado inflamatório moderado no parênquima lobular e mais acentuado ao redor do espaço-porta no grupo GVHD (Figura 10E). Foi observada ainda, uma fibrose moderada ao redor dos ductos biliares. O grupo GVHD+VNS, por sua vez, apresentou uma redução desse infiltrado e poucas áreas apresentaram fibrose leve ao redor dos ductos biliares, que culminaram na menor graduação histopatológica observada nesse grupo (Figura 10F e 10H). Estes resultados destacam a importância da estimulação da CAIP na redução da lesão de órgãos alvo da GVHD.

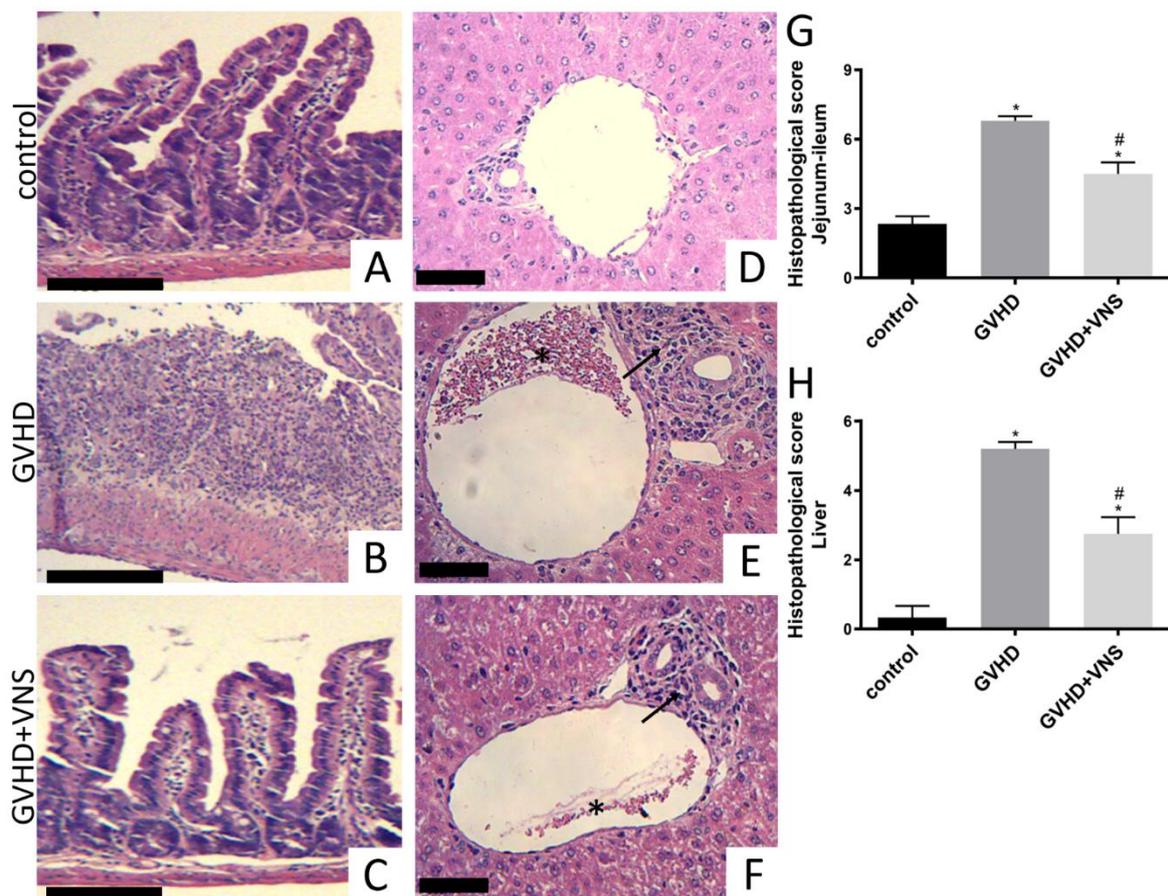


Figura 10. A VNS reduz lesão intestinal e hepática associadas à GVHD. A GVHD foi induzida pelo transplante de esplenócitos e células da medula óssea de camundongos doadores Balb/c para camundongos C57BL/6J. Camundongos que receberam células singênicas não desenvolveram a doença e foram denominados grupo controle. Após a indução da GVHD os camundongos foram eutanasiados no 35º dia (início da mortalidade) e foram coletadas amostras do jejuno-íleo (A, B e C) e do fígado (D, E e F) para análise histopatológica. Aspectos histopatológicos de seções do intestino (A, B e C) e fígado (D, E e F) coradas com H&E. * representa área com congestão e a seta preta aponta área com infiltrado inflamatório. Foi usada escala de barra de 100 µm para os painéis do intestino e 50 µm para os painéis do fígado. Os resultados da graduação histopatológica (G e H) são apresentados como média ± SEM (n = 5). * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo controle e ao grupo GVHD, respectivamente.

4.2 A VNS aumenta a concentração intestinal de IL-10, TNF- α e CCL2 e reduz a concentração hepática de CCL2, CCL5 e TNF- α em animais submetidos à GVHD

Sabe-se que os danos teciduais no trato gastrointestinal (TGI) resultantes do regime de condicionamento pré-transplante (irradiação e/ou quimioterapia) favorecem a ocorrência de GVHD ao promoverem a liberação de citocinas pró-inflamatórias que desempenham papel importante na fisiopatologia da doença, tais como TNF- α e IFN- γ , (BLAZAR; MURPHY; ABEDI, 2012). Nesse contexto, realizamos um ensaio de ELISA para detecção das principais citocinas e quimiocinas associadas ao desenvolvimento da doença no intestino e no fígado.

O grupo GVHD+VNS apresentou aumento na concentração intestinal de IL-10, TNF- α e CCL2 quando comparado ao grupo GVHD (Figura 11B-D). Não foi observada diferença nas concentrações de IFN- γ , CCL3 e CCL5 entre os grupos GVHD e GVHD+VNS (Figura 11A e 11E-F).

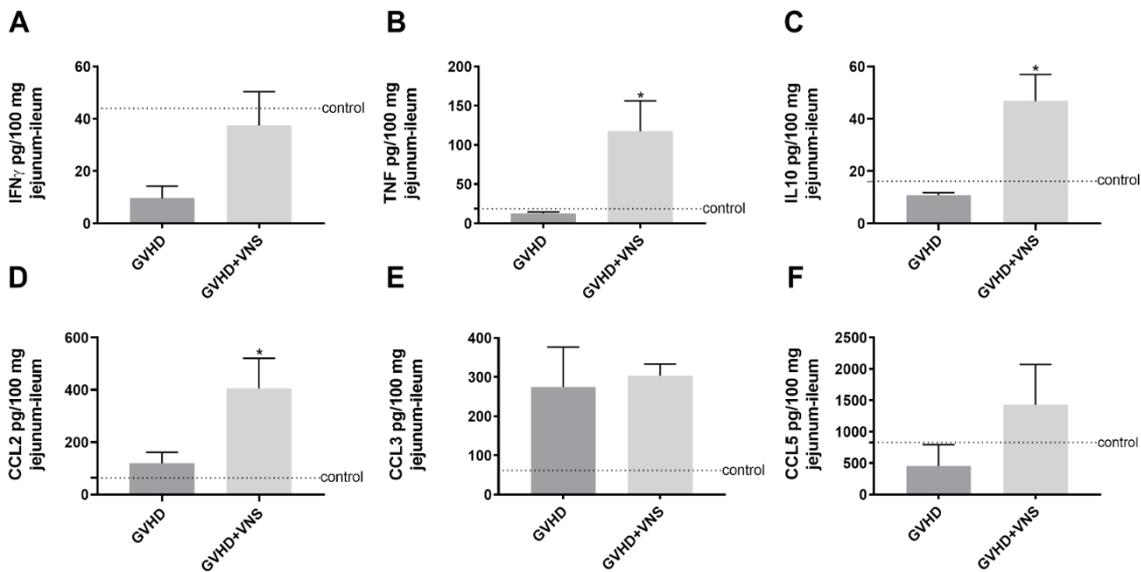


Figura 11. A VNS aumenta a concentração de IL-10, TNF- α e CCL2 no intestino de animais submetidos à GVHD. A GVHD foi induzida pelo transplante de esplenócitos e células da medula óssea de camundongos doadores Balb/c para camundongos C57BL/6J. Camundongos que receberam células singênicas não desenvolveram a doença e foram denominados grupo controle. Após a indução da GVHD os camundongos foram eutanasiados quando o escore clínico atingiu entre 9 a 12 pontos e as concentrações de IFN- γ (A), TNF- α (B), IL-10 (C), CCL2 (D), CCL3 (E) e CCL5 (F) foram avaliadas em homogenatos do jejuno-íleo pelo ensaio de ELISA. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n = 5). *P < 0.05 quando comparados ao grupo GVHD.

No fígado, a VNS reduziu as concentrações de CCL2, CCL5 e TNF- α nos animais submetidos à GVHD (Figura 12B-C e 12E). Não houve diferença nas concentrações de IFN- γ , CCL3 e IL-10 entre os grupos GVHD e GVHD+VNS (Figura 12A, 12D e 12F).

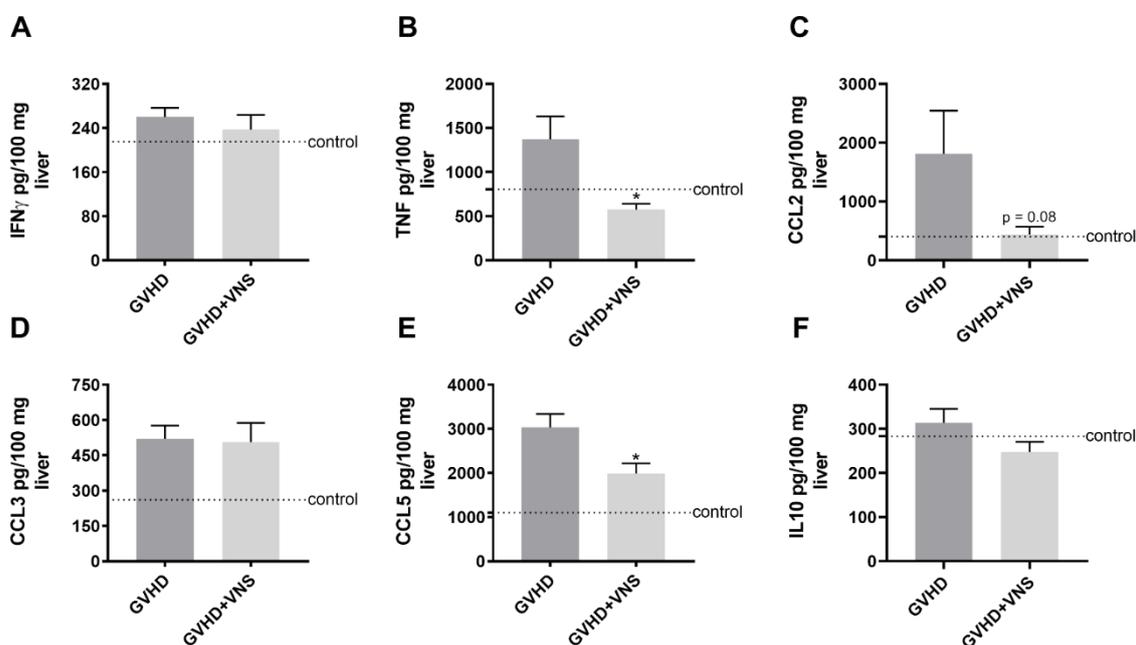
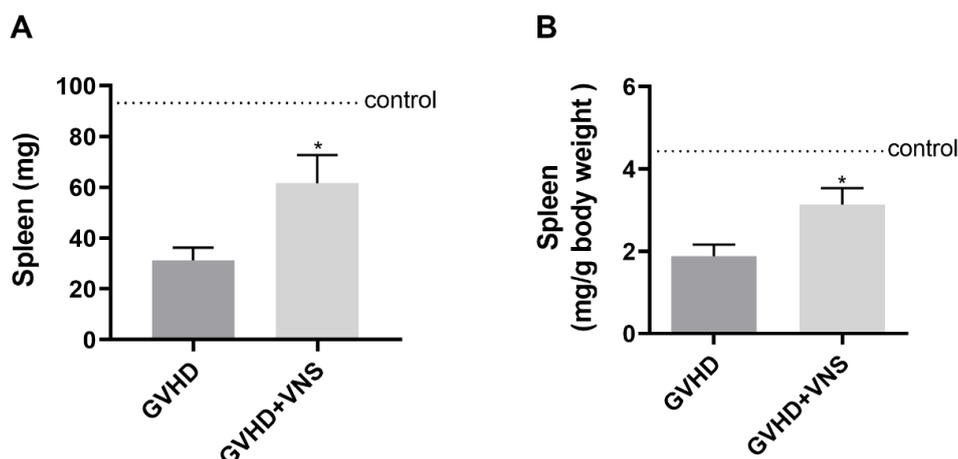


Figura 12. A VNS diminui a concentração hepática de CCL2, CCL5 e TNF- α em animais submetidos à GVHD. A GVHD foi induzida pelo transplante de esplenócitos e células da medula óssea de camundongos doadores Balb/c para camundongos C57BL/6J. Camundongos que receberam células singênicas não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. Após a indução da GVHD os camundongos foram eutanasiados quando o escore clínico atingiu entre 9 a 12 pontos e as concentrações de IFN- γ (A), TNF (B), CCL2 (C), CCL3 (D), CCL5 (E) e IL-10 (F) foram avaliadas em homogenatos do fígado pelo ensaio de ELISA. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n = 5). *P < 0.05 quando comparados ao grupo GVHD.

4.3 A VNS inibe a atrofia esplênica associada à GVHD

O baço é um órgão fundamental para a organização e montagem da resposta imune associada à GVHD, além de participar da via anti-inflamatória colinérgica (BEILHACK et al., 2005; KANASHIRO et al., 2017). Nesse sentido, realizamos uma análise mais detalhada desse órgão, a partir da avaliação da atrofia esplênica e ensaios de ELISA para detecção das citocinas e quimiocinas associadas ao desenvolvimento da GVHD. A indução da GVHD causa atrofia esplênica, o que não foi observado no grupo GVHD+VNS (Figura 13A e B). Não foi observada diferença entre os grupos em nenhuma das citocinas e quimiocinas analisadas (Figura 14).

Figura 13. A VNS inibe a atrofia



esplênica associada à GVHD. A GVHD foi induzida pelo transplante de esplenócitos e células da medula óssea de camundongos doadores Balb/c para camundongos C57BL/6J. Camundongos que receberam células singênicas não desenvolveram a doença e foram denominados grupo controle. Após a indução da GVHD, os camundongos foram eutanasiados quando o escore clínico atingiu entre 9 a 12 pontos e os baços foram coletados e pesados. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n = 5). *P < 0.05 quando comparados ao grupo GVHD.

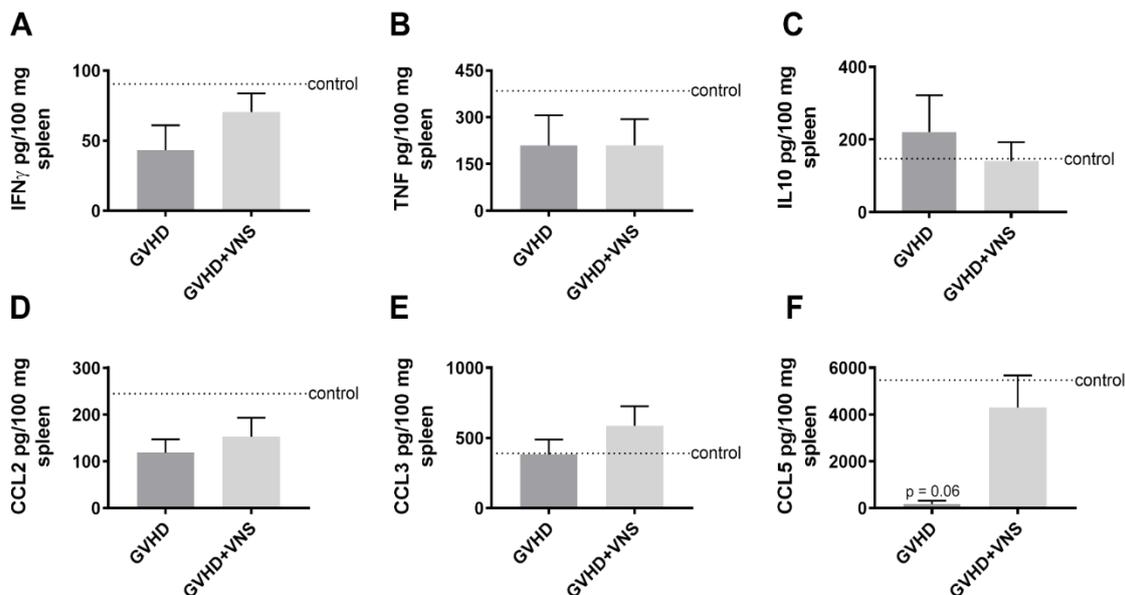


Figura 14. Efeito da VNS nas citocinas e quimiocinas no baço. A GVHD foi induzida pelo transplante de esplenócitos e células da medula óssea de camundongos doadores Balb/c para camundongos C57BL/6J. Camundongos que receberam células singênicas não desenvolveram a doença e foram denominados grupo controle. Após a indução da GVHD os camundongos foram eutanasiados quando o escore clínico atingiu entre 9 a 12 pontos e as concentrações de IFN γ (A), TNF (B), IL-10 (C), CCL2 (D), CCL3 (E) e CCL5 (F) foram avaliadas em homogenatos do baço pelo ensaio de ELISA. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n = 5). *P < 0.05 quando comparados ao grupo GVHD.

4.4 A VNS previne a linfopenia e neutrofilia associadas à GVHD

Durante o desenvolvimento da GVHD podem ser observados quadros de linfopenia, assim como um aumento na densidade de neutrófilos. A ocorrência de ambos os casos está associada à prognósticos desfavoráveis da doença (AVERSA et al., 1998; KEEVER et al., 1989; NOEL et al., 1978; ROSS et al., 2013; GOLOB et al., 2017; HÜLSDÜNKER et al., 2018; MARTIN, 2018; ZEISER, 2019). Nosso próximo passo foi então avaliar a porcentagem desses leucócitos no sangue por meio do esfregaço sanguíneo de animais dos diferentes grupos estudados. Observamos que a VNS preveniu a leucopenia (Figura 15A) e neutrofilia (Figura 15B) relacionadas à GVHD.

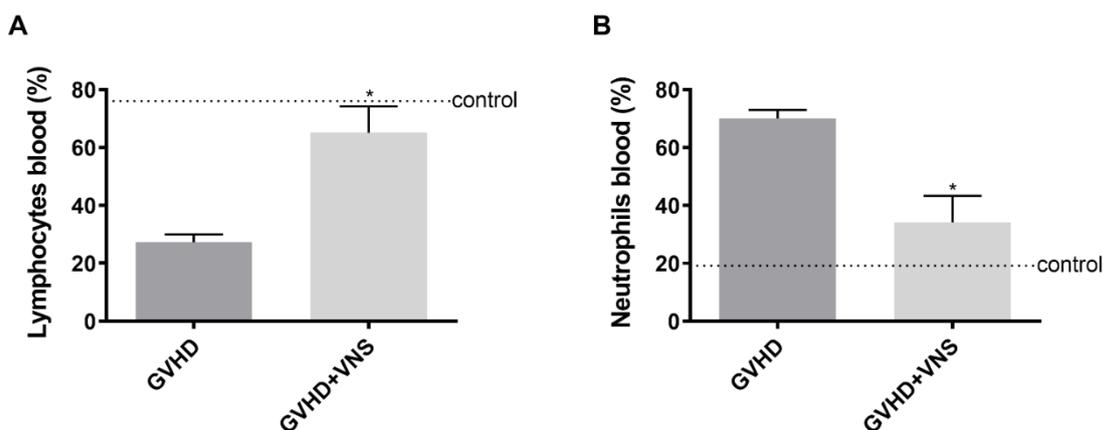


Figura 15. A VNS previne a leucopenia e neutrofilia associadas à GVHD. A GVHD foi induzida pelo transplante de esplenócitos e células da medula óssea de camundongos doadores Balb/c para camundongos C57BL/6J. Camundongos que receberam células singênicas não desenvolveram a doença e foram denominados grupo controle. No dia 35 após a indução da GVHD amostras sanguíneas foram coletadas para realização de esfregaço e contagem diferencial de leucócitos. (A) Porcentagem de linfócitos e (B) Porcentagem de neutrófilos no sangue. Os resultados são apresentados como média \pm SEM ($n = 5$). * $P < 0.05$ quando comparados ao grupo GVHD.

4.5 A VNS reduz o acúmulo de neutrófilos no baço e macrófagos no fígado de animais submetidos à GVHD

Neutrófilos e macrófagos podem ser ativados pelo regime de condicionamento e isto contribui para a patogênese da GVHD (HÜLSDÜNKER et al., 2018; WU et al., 2020). Sendo assim, com o objetivo de analisar a presença de neutrófilos e macrófagos nos principais órgãos alvo da doença, foram realizados ensaios de MPO, que quantifica indiretamente a presença de neutrófilos e NAG, que quantifica indiretamente a presença de macrófagos. Foi observada uma

redução de neutrófilos no baço (Figura 16C) e uma redução de macrófagos no fígado de camundongos submetidos à VNS (Figura 16E) em comparação ao grupo GVHD.

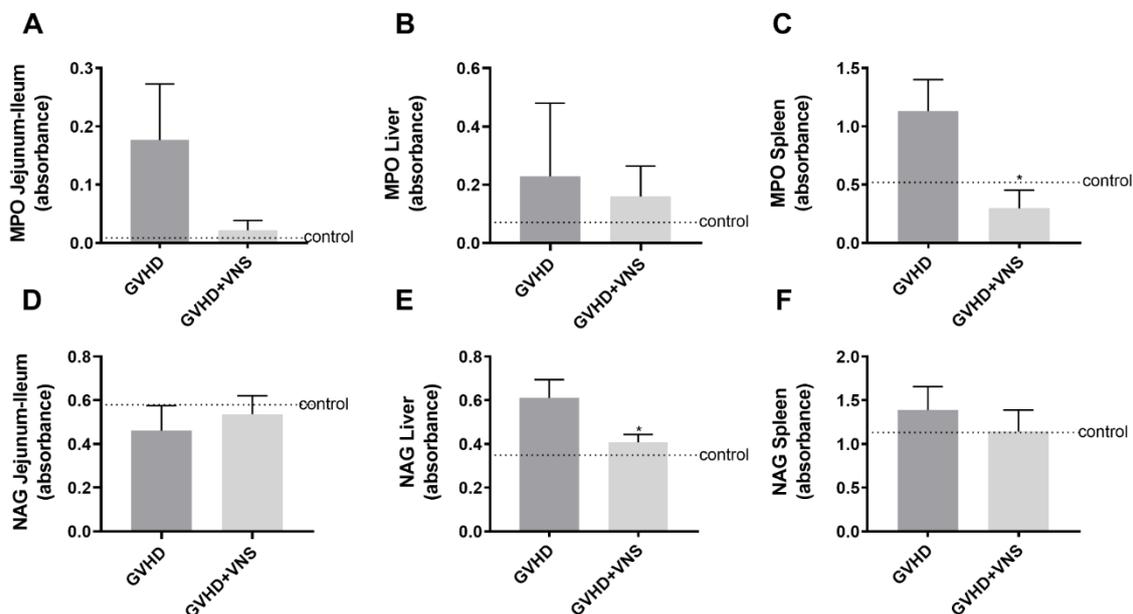


Figura 16. A VNS reduz o acúmulo de neutrófilos no baço e macrófagos no fígado de animais submetidos à GVHD. A GVHD foi induzida pelo transplante de esplenócitos e células da medula óssea de camundongos doadores Balb/c para camundongos C57BL/6J. Camundongos que receberam células singênicas não desenvolveram a doença e foram denominados grupo controle. Após a indução da GVHD os camundongos foram eutanasiados quando o escore clínico atingiu entre 9 a 12 pontos e as concentrações de MPO (A-C) e NAG (D-F) foram avaliadas em homogenatos do intestino, fígado e baço. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n = 5). *P < 0.05 quando comparados ao grupo GVHD.

4.6 A VNS previne danos cardíacos associados à GVHD

Tendo em vista a participação do nervo vago no controle da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) (ARDELL et al., 2015) e que, em alguns casos, a GVHD pode causar alterações cardíacas em pacientes pediátricos e adultos jovens (ROBERTS et al., 2006), avaliamos o efeito da VNS nos parâmetros fisiológicos do coração, de forma a garantir sua segurança terapêutica e o seu efeito nos possíveis danos cardíacos relacionados à GVHD. A partir da realização de um ecocardiograma, observamos que a VNS foi associada à manutenção do débito cardíaco (Figura 17A) e fração de ejeção (Figura 17B) no início dos sinais da doença,

assim como preveniu a redução da espessura do septo intraventricular observada no grupo GVHD (Figura 17C) no início da mortalidade.

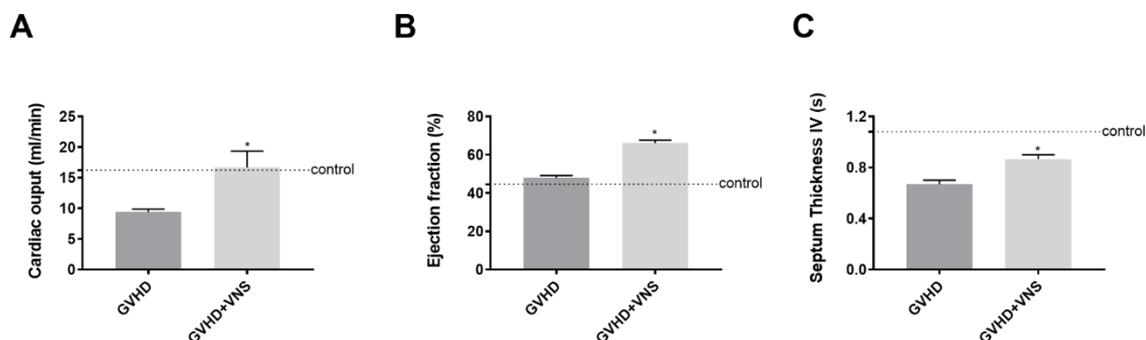


Figura 17. A VNS previne danos cardíacos associados à GVHD. A GVHD foi induzida pelo transplante de esplenócitos e células da medula óssea de camundongos doadores Balb/c para camundongos C57BL/6. Camundongos que receberam células singênicas não desenvolveram a doença e foram denominados grupo controle. No início dos sinais da doença (14 dias após a indução) e no início da mortalidade (35 dias após a indução), os camundongos foram submetidos à ecocardiografia transtorácica de alta resolução (EcoDopplercardiografia). Após a indução anestésica com isoflurano, os camundongos foram mantidos em uma temperatura corporal de 37°C e posicionados para registro do eletrocardiograma que permite o monitoramento constante da frequência cardíaca. Todos os parâmetros foram calculados de forma automática pelo software VEVO 2100 VisualSonics. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n = 5). *P < 0.05 quando comparados ao grupo GVHD.

4.7 A VNS reduz a morbidade e a mortalidade associadas à GVHD

Por último, após observarmos que a estimulação elétrica do nervo vago reduziu as lesões nos órgãos alvo da GVHD e melhorou diversos parâmetros inflamatórios associados à doença, buscamos compreender se a estimulação elétrica da CAIP seria capaz de reduzir a morbidade e a mortalidade associadas à GVHD. Nós observamos que o grupo GVHD apresentou alta morbidade (Figura 18A) e elevada taxa de mortalidade (Figura 18B). De maneira relevante, uma única sessão de VNS reduziu os sinais clínicos (Figura 18A) e a mortalidade associadas à GVHD (Figura 18B).

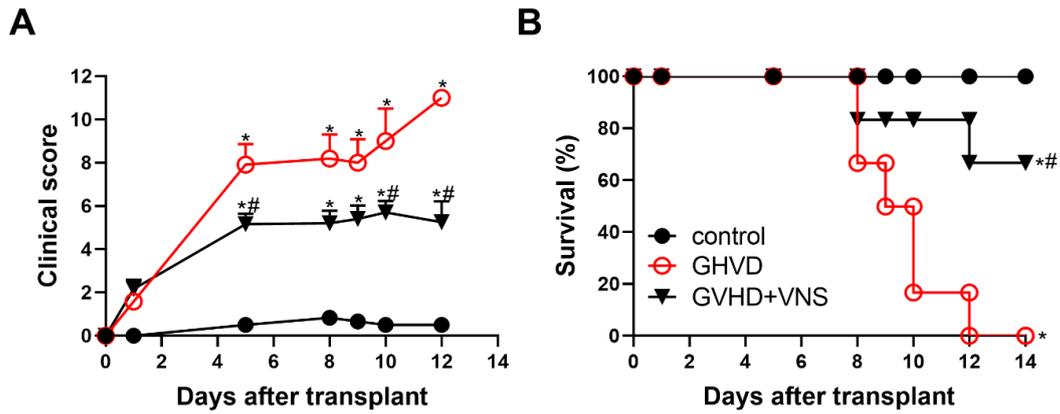


Figura 18. A VNS reduz a morbidade e mortalidade associadas à GVHD. A GVHD foi induzida pelo transplante de esplenócitos e células da medula óssea de camundongos doadores Balb/c para camundongos C57BL/6J. Camundongos que receberam células singênicas não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. Após a indução da GVHD os camundongos foram avaliados de dois em dois dias para análise dos parâmetros clínicos relacionados a doença e eutanasiados quando o escore clínico desses animais atingiu entre 9 a 12 pontos (A) e sobrevivência (B). Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n = 5). * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo controle e ao grupo GVHD, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

O transplante alogênico de células hematopoéticas é um tratamento cada vez mais utilizado para doenças malignas hematológicas. Nos últimos anos, melhorias na profilaxia, monitoramento de infecções, estratégias imunossupressoras e medidas de cuidados e suporte melhoraram os resultados após este procedimento. Apesar desses avanços, a GVHD permanece uma barreira significativa para o uso mais difundido do TCTH alogênico devido à alta morbidade e mortalidade dessa doença e às complicações resultantes da sua prevenção e tratamento (ALI; DIPERSIO; SCHROEDER, 2016; FERRARA, 2007; LEVINE, 2011; MESSINA et al., 2008).

Uma vez que ocorre uma inflamação sistêmica na GVHD, o uso de imunossupressores a base de esteroides é a terapia de primeira linha, porém, além da imunossupressão sistêmica em altas doses causar também alta morbimortalidade, 50% dos pacientes não respondem a ela e desenvolvem a GVHD refratária a esteroides, o que está relacionado a um prognóstico desfavorável (ALI; DIPERSIO; SCHROEDER, 2016). Numerosas estratégias para tratar esses pacientes com terapias de segunda e terceira linhas têm sido empreendidas, entretanto, no geral, ocorrem baixas taxas de resposta associadas ainda à alta mortalidade (ALI; DIPERSIO; SCHROEDER, 2016; GHIMIRE et al., 2017; MESSINA et al., 2008; QIAN; WU; SHEN, 2013). Diante disso, o estudo de estratégias terapêuticas que visam reduzir a inflamação sistêmica observada na doença é muito relevante.

Recentemente, o papel anti-inflamatório do nervo vago foi descoberto a partir da ativação da via anti-inflamatória colinérgica, caracterizada como um circuito neuromodulador, que atua inibindo a inflamação e faz a interface do sistema nervoso com o sistema imunológico (BOROVIKOVA et al., 2000a, 2000b; EDWIN BLALOCK, 2002; PAVLOV et al., 2003; TRACEY; CZURA; IVANOVA, 2001). Neste trabalho nós demonstramos, pela primeira vez, que uma única sessão de estimulação elétrica do nervo vago, realizada 6 horas antes da indução da GVHD experimental, diminuiu a lesão intestinal e hepática, aumentou as concentrações de IL-10, TNF- α e CCL2 no intestino e reduziu as concentrações de TNF- α , CCL2 e CCL5 no fígado. A VNS preveniu também a atrofia esplênica, a linfopenia e neutropenia associadas à GVHD e reduziu o infiltrado de neutrófilos no baço e de macrófagos no fígado. Quanto à função cardíaca, além de a VNS ter se mostrado segura, foi capaz de prevenir o dano cardíaco observado em animais submetidos à doença do enxerto-versus-hospedeiro. Estes fenômenos, em conjunto, foram responsáveis pela redução dos sinais clínicos e da mortalidade associada à

GVHD em animais estimulados eletricamente, o que confirma a importância da CAIP para a regulação da resposta inflamatória na doença e destaca o potencial da VNS como uma terapia futura para pacientes com a doença do enxerto-versus-hospedeiro.

O trato gastrointestinal (TGI) e o fígado são frequentemente afetados pela GVHD aguda. A GVHD intestinal é caracterizada por sintomas como dor, náuseas, vômitos e diarreia (CASTILLA-LLORENTE et al., 2014; NEUMANN et al., 2007; SNOVER et al., 1985). O intestino delgado, particularmente o íleo, é a parte mais envolvida, na qual as análises histológicas mostram edema da mucosa, apoptose, lise e perda focal de células epiteliais da cripta, áreas necróticas, morfologia da cripta destruída com erosões e ulcerações e infiltrado de linfócitos (NEUMANN et al., 2007; PONEC; HACKMAN; MCDONALD, 1999). O papel da VNS em reduzir lesões intestinais vem sendo estudado em diferentes modelos. Costantini e colaboradores (2010) mostraram que a VNS elétrica preveniu danos na barreira intestinal causados por queimadura. A VNS elétrica também limitou os danos teciduais em modelos de lesão intestinal por laparotomia (LANGNESS et al., 2017) e de íleo pós-operatório (MURAKAMI et al., 2019). Além disso, a VNS induzida farmacologicamente foi capaz de atenuar a inflamação intestinal em modelo de colite experimental (GHIA et al., 2006). Corroborando esses estudos, em nosso trabalho, uma única sessão de estimulação elétrica do nervo vago também foi capaz de diminuir os danos e manter a preservação da arquitetura tecidual do jejuno-íleo. Este dado é relevante, uma vez que a GVHD gastrointestinal grave tem difícil tratamento e o envolvimento do TGI é relatado em quase todos os casos de GVHD aguda fatal (CASTILLA-LLORENTE et al., 2014; NEUMANN et al., 2007; SNOVER et al., 1985).

No intestino, observamos também um aumento da expressão de TNF- α e CCL2 nos animais do grupo GVHD+VNS. A expressão de CCL2 é desencadeada pela exposição a estímulos inflamatórios, como IL-1 β , TNF- α e IL-6 e foi descoberta pela primeira vez como um quimioatraente para monócitos, mas também atrai células T, células NK, macrófagos, células dendríticas, e de maneira interessante, também é um agente quimioatrativo de células supressoras de linhagem mieloide ou *myeloid-derived suppressor cell* (MDSCs) (CHANG et al., 2016; GSCHWANDTNER; DERLER; MIDWOOD, 2019). As MDSCs representam uma população heterogênea de células mieloides imaturas que exibem notável capacidade de imunossupressão e atividades tumorigênicas. Essa capacidade imunossupressora está relacionada com a produção de IL-10 e TGF- β que atuam inibindo as funções das células T efetoras (UMANSKY et al., 2016; RAFEI et al., 2008). No contexto da GVHD, as MDSCs, atuam diminuindo a gravidade da doença ao inibir a função das células T citotóxicas via

arginase-1, além de desviarem o equilíbrio Th1/Th2 em direção a Th2, diminuindo os efeitos da GVHD aguda em murinos e em modelo humanizado. Além disso, estudos anteriores em outros modelos de doença já demonstraram a modulação dessas células no contexto da estimulação do nervo vago (MOHAMMADPOUR et al., 2020; ZHENG et al., 2021). Um estudo em modelo de colite demonstrou que a estimulação farmacológica da CAIP, por meio da infusão local de ACh, reduziu os sinais clínicos da colite, melhorando a inflamação intestinal em camundongos via modulação de MDSCs, que ao secretarem IL-10, foram capazes de suprimir a resposta imune mediada por células T (ZHENG et al., 2021). Nós também observamos um aumento na expressão da IL-10 intestinal. Esta citocina regula negativamente a resposta imune por inibição da ativação e proliferação de células T inflamatórias e por sua ação na geração, manutenção e função das células T regulatórias que atuam controlando as respostas inflamatórias (GROUX et al., 1996; TSENG et al., 2009). Assim, a expressão de IL-10 está relacionada à melhor tolerância ao transplante alogênico (FERRARA et al., 2017; GROUX et al., 1996).

Os macrófagos, uma importante fonte de citocinas durante a GVHD, podem ser classificados, a princípio, em M1 (classicamente ativado, pró-inflamatório) e M2 (alternativamente ativado, anti-inflamatório). O fenótipo M1 é caracterizado pelo aumento da expressão de citocinas, como IL-1 β , IL-6 e IL-12, bem como pela produção de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio. Por outro lado, a polarização M2 mostra maior expressão de IL-10 e arginase-1. O papel de uma série de quimiocinas na polarização de macrófagos em condições inflamatórias já foi descrito, incluindo a CCL2. Foi evidenciado que o impacto da CCL2 na polarização dos macrófagos nos tipos M1 e M2 parece ser dependente do ambiente inflamatório em que essas células se encontram, o que inclui a expressão de citocinas e o estado de ativação e polarização das células ali presentes. Logo, a influência da CCL2 em favorecer um determinado estado de polarização é altamente dependente do contexto (GSCHWANDTNER; DERLER; MIDWOOD, 2019). Hipotetizamos, então, que o aumento observado de CCL2, em concomitância com o aumento de IL-10 no intestino, está relacionado com seu papel quimioatraente de MDSCs e macrófagos, sugerindo ainda que esses macrófagos, devido ao contexto que estão inseridos, expressam características fenotípicas do tipo M2. O TNF- α , por sua vez, além de atuar na estimulação das MDSCs (ZHAO et al., 2012) ainda poderia estar envolvido no aumento da produção de CCL2 pelas células intestinais. Porém, são necessários experimentos adicionais para análise do perfil leucocitário intestinal, buscando a marcação de MDSCs e macrófagos M1 e M2 para confirmarmos essa hipótese.

A apresentação clínica da GVHD hepática, por sua vez, pode variar de leve icterícia e elevação das enzimas hepáticas à síndrome colestática e hepatite fulminante. Histologicamente, o fígado do paciente com GVHD pode apresentar danos ao epitélio do ducto biliar, com alterações epiteliais incluindo pleomorfismo, perda de polaridade e sobreposição nucleares, vacuolização citoplasmática e apoptose. O infiltrado de linfócitos, áreas de necrose, dutopenia e fibrose periportal, também podem ser observados (MATSUKUMA et al., 2016; SALOMAO et al., 2016; SHULMAN et al., 1988; SNOVER et al., 1984). Recentemente, foi demonstrado que a VNS elétrica foi capaz de reduzir o dano hepático em modelo de lesão hepática por isquemia-reperfusão. Essa redução foi causada pelo aumento da produção de glutathione, que exerce função antioxidante e também pela redução dos níveis séricos de AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase) e LDH (lactato desidrogenase), enzimas da função hepática, o que diminuiu os prejuízos às células hepáticas (XIA et al., 2020; ZHANG et al., 2019). Nesse mesmo modelo, a VNS farmacológica foi capaz de reduzir o infiltrado de células inflamatórias, inibir a expressão de HMGB1 e suprimir a produção de citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , por meio da inibição da ativação de NF-kB (LI et al., 2013, 2014; PARK; KANG; LEE, 2013). Além disso, a vagotomia cervical esquerda ou a administração de inibidores da via anti-inflamatória colinérgica levaram à produção exagerada de citocinas inflamatórias, piorando o quadro de hepatite induzida por LPS e a denervação do nervo vago hepático piorou também a hepatite fulminante induzida por Fas (HIRAMOTO et al., 2008; LI et al., 2014). Corroborando esses dados, em nosso modelo de GVHD, a VNS causou uma redução do infiltrado celular no fígado e da fibrose nos ductos biliares, atenuando a GVHD hepática.

Embora a GVHD aguda seja uma doença sistêmica, a resposta inflamatória associada a ela difere muito de acordo com o órgão envolvido. Na GVHD hepática aguda, por exemplo, há mecanismos diferentes envolvidos na resposta inflamatória observada, além daqueles que envolvem o intestino (ARAI et al., 2016). Assim, espera-se que o controle da resposta inflamatória também seja diferente nesse órgão. Durante o desenvolvimento da GVHD, a expressão de quimiocinas como CCL2, CCL3 e CCL5 é regulada positivamente no fígado, sendo essas moléculas necessárias para o recrutamento de células efetoras para esse órgão (GAVIN et al., 2002; HASEGAWA et al., 2008; ICHIBA et al., 2003; MAPARA et al., 2006). Estudos também já demonstraram que o bloqueio do TNF- α foi capaz de diminuir o infiltrado de linfócitos e reduzir a proliferação de células T CD8⁺ no fígado, controlando a inflamação e diminuindo os danos hepáticos (COOKE et al., 1998; COURIEL et al., 2004; EL-HAYEK;

ROGERS; BROWN, 2005; HOLLER et al., 1990; TESHIMA et al., 2002). Assim, a redução na expressão de CCL2, CCL5 e TNF- α , observada nos animais submetidos à VNS, parece estar relacionada à diminuição dos parâmetros inflamatórios e danos observados no fígado desses animais. Lai e colegas (2019) apresentaram em um estudo anterior, achados semelhantes em modelo de lesão hepática por isquemia-reperfusão renal, onde os níveis de TNF- α no fígado foram significativamente reduzidos no grupo VNS em comparação com o grupo doente, o que contribuiu para os efeitos protetores da VNS elétrica. Em modelo de endotoxemia letal em ratos, a estimulação elétrica do nervo vago também inibiu a síntese de TNF- α no fígado, impedindo o choque (BOROVIKOVA et al., 2000a). Já em modelo de esteatohepatite induzida pela dieta, a denervação vago hepática agravou a doença pela regulação positiva da expressão de mediadores pró-inflamatórios, incluindo TNF- α , IL-12 e CCL2 (NISHIO et al., 2017). Em conjunto, esses dados demonstram a importância da VNS no controle da inflamação e redução dos danos nos principais órgãos afetados pela doença do enxerto-versus-hospedeiro aguda.

Além do fígado e intestino, o baço desempenha um papel central na patogênese da GVHD. Esse órgão contribui para o desenvolvimento e a disseminação periférica de células efetoras, sendo ele o maior reservatório de células imunes presente no tecido linfóide secundário. Ele também é importante para o fornecimento de células reguladoras (CLOUTHIER; FERRARA; TESHIMA, 2002; DEMETRAKOPOULOS; TSOKOS; LEVINE, 1982). Apesar da atrofia esplênica em relação a GVHD aguda não ser descrita de forma extensa na literatura, um estudo de Glazier e colaboradores (1983), mostrou atrofia nos tecidos linfóides do timo, nódulos linfáticos e baço em ratos que desenvolveram GVHD após 20 dias do transplante. A atrofia desse órgão também é descrita em pacientes com GVHD crônica, o que pode levar a infecções com risco de vida (GLAZIER et al., 1983; PICARDI; SELLERI; ROTOLI, 1999). Com relação a CAIP, já foi descoberto que o baço é necessário para a regulação das citocinas como efeito da estimulação do nervo vago. Em um estudo com modelo de endotoxemia foi visto, por exemplo, que a retirada cirúrgica do baço, inibe o efeito supressor da VNS nos macrófagos, favorecendo a produção de TNF- α (ROSAS-BALLINA et al., 2008). O baço, portanto, desempenha um papel duplo, pois apesar de contribuir para a patogênese da GVHD, é também necessário para as ações anti-inflamatórias observadas após a estimulação vagal (MARTELLI; MCKINLEY; MCALLEN, 2014). Dessa forma, a atrofia esplênica relacionada à GVHD observada em nosso trabalho pode ter comprometido a ativação da CAIP, contribuindo assim, para o agravamento da doença. Experimentos futuros deverão ser realizados para confirmação dessa hipótese.

Nós observamos também que a VNS preveniu a linfopenia associada à GVHD, uma condição que torna ainda mais crítico o estado de saúde de pacientes com a doença. Como consequência dos regimes de condicionamento empregados e os tratamentos que buscam a supressão do processo inflamatório associado à doença, a capacidade de reconstituição dos linfócitos pode ser afetada (AVERSA et al., 1998; KEEVER et al., 1989; MOUTUOU et al., 2018; NOEL et al., 1978; ROSS et al., 2013). A linfopenia que pode ocorrer após o TCTH alogênico pode perdurar por vários meses e é tipicamente mais grave em pacientes com GVHD. Porém, as opções clínicas para acelerar a reconstituição de linfócitos, no caso desses pacientes, são praticamente inexistentes devido ao risco de agravar a doença (MOUTUOU et al., 2018; SINHA et al., 2002). Como resultado da linfopenia, os pacientes ficam altamente suscetíveis à infecção por uma ampla variedade de organismos bacterianos, virais e fúngicos, sendo a infecção causada pelo citomegalovírus a mais preocupante, normalmente ocorrendo entre 30 a 100 dias após o transplante (LAPP et al., 1985; NOEL et al., 1978; ROSS et al., 2013). Dessa forma, a prevenção da linfopenia nos animais eletricamente estimulados se torna muito relevante.

Além da redução na linfopenia, nossos dados de esfregaço sanguíneo apontam para uma redução da neutrofilia no grupo GVHD+VNS. Vários trabalhos já evidenciaram o papel dos neutrófilos na doença do enxerto-versus-hospedeiro. Estudos iniciais mostraram que altas frequências desses granulócitos estavam relacionadas a um resultado desfavorável após o TCTH alogênico nos pacientes (GOLOB et al., 2017; HÜLSDÜNKER et al., 2018; MARTIN, 2018; SCHWAB et al., 2014; ZEISER, 2019). Um estudo que usou uma abordagem de depleção de neutrófilos baseada em anticorpos anti-Ly6G mostrou que o tratamento com este anticorpo reduziu os números relativos e absolutos de neutrófilos circulantes e, conseqüentemente, melhorou a sobrevivência de animais com GVHD (SCHWAB et al., 2014). A ativação e recrutamento dos neutrófilos são causados normalmente pelo regime de condicionamento que gera danos ao epitélio intestinal e leva à translocação de bactérias. Mais recentemente, foi demonstrado que os neutrófilos não somente causam danos aos tecidos após migrarem, mas também podem se direcionar para os linfonodos mesentéricos, onde estão envolvidos na apresentação de antígenos a linfócitos T (HÜLSDÜNKER et al., 2018; SCHWAB et al., 2014). Dessa forma, nossos dados demonstram que a terapia com a estimulação elétrica do nervo vago foi capaz de alterar a porcentagem de células no sangue que estão relacionadas ao desenvolvimento e piores prognósticos para a GVHD, além de indicarem uma possível translocação bacteriana que deverá ser confirmada em experimentos posteriores.

Uma vez observadas as diferenças na expressão de citocinas e quimiocinas no fígado e intestino, inibição da atrofia esplênica e diferenças no perfil celular no sangue de animais submetidos à estimulação elétrica do nervo vago, nos perguntamos se também haveriam diferenças no perfil celular dos principais órgãos atingidos pela GVHD. A mieloperoxidase (MPO), uma enzima restrita aos grânulos azurófilos dos neutrófilos, tem sido amplamente utilizada como um marcador do acúmulo de leucócitos polimorfonucleares em amostras de tecido, assim como a N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG), presente nos lisossomos, tem sido empregada para detectar o acúmulo/ativação de macrófagos em uma variedade de tecidos animais e humanos (DA SILVA et al., 2014; LAMAITA et al., 2012). Ao realizarmos análises de NAG e MPO no intestino, fígado e baço, percebemos uma redução dessas enzimas no fígado e baço de animais submetidos à GVHD e estimulados eletricamente. Além da importância já mencionada dos neutrófilos no desenvolvimento da GVHD, estudos recentes observaram, especificamente, o papel dos neutrófilos esplênicos durante os processos inflamatórios. Langereis e colaboradores (2017), demonstraram que durante a inflamação aguda induzida pela administração de LPS em voluntários saudáveis (endotoxemia humana experimental), diferentes subconjuntos de neutrófilos são mobilizados para a circulação, inclusive neutrófilos esplênicos. Essas células em conjunto com monócitos, macrófagos e linfócitos T CD8⁺ esplênicos, foram as principais fontes de IFN- γ durante a endotoxemia (LANGEREIS et al., 2017). Recentemente, Chorny e colaboradores (2016), também relataram que os neutrófilos perifoliculares esplênicos aumentam as respostas das células B da zona marginal do baço a antígenos (CHORNY et al., 2016). Assim sendo, o menor acúmulo de neutrófilos no baço dos animais estimulados pode estar relacionado ao controle da resposta inflamatória observada nesse mesmo grupo.

Além dos neutrófilos, outra célula muito importante para o desenvolvimento da GVHD é o macrófago. Macrófagos hepáticos e células dendríticas são importantes para mediar o recrutamento de células T alogênicas (ICHIKI et al., 2006). O infiltrado de macrófagos já é considerado um biomarcador para a ocorrência e desenvolvimento da GVHD, já que estudos recentes indicaram que um infiltrado macrofágico mais intenso está correlacionado a uma maior gravidade da GVHD cutânea. Ademais, biópsias de fígado de pacientes com GVHD letal mostraram uma preponderância de macrófagos CD68⁺ no infiltrado inflamatório (HONG; WAN; LI, 2020; PIÉRARD et al., 2013; TERAOKURA et al., 2015). Com relação a ativação da CAIP no fígado, já foi demonstrado que o α 7nAChR é expresso por macrófagos residentes (Células de Kupffer) desse órgão, atuando como o principal componente celular da regulação

colinérgica da inflamação hepática (METZ; PAVLOV, 2018). Em um modelo murino de lesão hepática aguda, a sinalização colinérgica aumentada foi relacionada a efeitos hepatoprotetores, a partir da modulação de macrófagos residentes hepáticos (METZ; PAVLOV, 2018). Além disso, em modelo hepático de lesão por isquemia-perfusão, a estimulação farmacológica da CAIP resultou na diminuição do infiltrado de células inflamatórias no fígado, reduzindo os danos causados pela lesão. Em outro estudo de esteatohepatite não alcoólica, a VNS farmacológica também se mostrou eficaz em promover a diminuição da ativação das células de Kupffer e menor infiltrado de células F4/80⁺ no fígado, o que contribuiu para a supressão da progressão da doença em sua fase inicial (NISHIO et al., 2017; PARK; KANG; LEE, 2013). Portanto, a inibição do acúmulo de macrófagos no fígado dos animais do grupo GVHD+VNS provavelmente está relacionada com a melhora histológica observada nesse órgão.

O nervo vago tem importantes funções fisiológicas e homeostáticas, além de suas funções imunomoduladoras. A frequência cardíaca, por exemplo, é controlada por potenciais de ação transmitidos através do nervo vago para o nó sinoatrial do coração, onde há a liberação de acetilcolina (HUSTON; TRACEY, 2011). Além disso, já foram relatados na literatura alguns casos de GVHD aguda clinicamente significativa envolvendo o coração (ROBERTS et al., 2006). Os casos relatados incluem pacientes com bloqueio cardíaco completo, miocardite, doença arterial coronariana, cardiomiólise e insuficiência cardíaca aguda (PLATZBECKER et al., 2001; RACKLEY et al., 2005; ROBERTS et al., 2006). Portanto, apesar de já ter sido descrito que é possível ativar a via anti-inflamatória colinérgica sem alterar significativamente a frequência e as funções cardíacas (HUSTON; TRACEY, 2011), buscamos analisar os componentes envolvidos com o funcionamento cardíaco, afim de garantir a segurança da VNS como potencial terapia para a GVHD. Nós observamos então que, além desse método terapêutico não causar nocividade, a VNS foi capaz de prevenir os danos cardíacos associados à GVHD. A estimulação da CAIP, por intermédio da VNS elétrica, apresentou efeitos protetores cardiovasculares também em modelos animais de infarto do miocárdio e lesão miocárdica por isquemia-reperfusão, por meio da redução da inflamação e melhora da função cardíaca, a partir da promoção da angiogênese e arteriogênese no coração, reforçando a ação da estimulação elétrica em reduzir a lesão cardíaca em diferentes modelos (LV et al., 2018; NUNTAPHUM et al., 2018).

Por último, estudos anteriores realizados por nosso grupo já demonstraram que o controle da resposta inflamatória resulta na redução da morbidade e mortalidade associadas à GVHD. Como, por exemplo, os tratamentos com a alga *Lithothamnion muelleri* ou com o inibidor da

5-lipoxigenase, zileuton, foram capazes de reduzir a produção de mediadores inflamatórios, incluindo TNF- α , CCL2 e CCL5 e diminuir as lesões intestinais e hepáticas, o que resultou na redução das taxas de letalidade e sinais clínicos associados à GVHD (REZENDE et al., 2013., REZENDE et al., 2017). Assim sendo, nos perguntamos se a mudança em diversos parâmetros relacionados ao controle da resposta inflamatória no grupo de animais estimulados eletricamente causaria também uma melhora na morbimortalidade associada à GVHD. Observamos então, que apenas uma sessão de estimulação foi suficiente para causar uma melhora nos parâmetros clínicos, assim como maior sobrevida dos animais estimulados. Dessa forma, acreditamos que a estimulação elétrica do nervo vago se mostra uma potencial terapia para controle da resposta inflamatória associada à doença do enxerto-versus-hospedeiro, contribuindo para redução da sua morbimortalidade.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou a atuação da via anti-inflamatória colinérgica no controle da resposta inflamatória associada à doença do enxerto-versus-hospedeiro. Nos camundongos que foram submetidos à estimulação elétrica do nervo vago 6 horas antes da indução da GVHD, observamos uma menor lesão intestinal e hepática, somada com a inibição da atrofia esplênica relacionada à GVHD. Observamos também mudanças na expressão de moléculas importantes na regulação da resposta inflamatória, assim como mudanças no perfil celular sanguíneo, hepático e esplênico dos animais estimulados. Os animais estimulados apresentaram ainda menor escore clínico, assim como aumento da sobrevida. Dessa forma, acreditamos que a estimulação elétrica do nervo vago pode ser uma potencial estratégia terapêutica usada no tratamento da GVHD.

7. PERSPECTIVAS

1. Avaliar o efeito da VNS elétrica no acúmulo e perfil de leucócitos no intestino, fígado, baço e medula óssea por citometria de fluxo em animais submetidos à GVHD;
2. Avaliar o efeito da VNS elétrica na expressão intestinal, hepática e esplênica do mRNA da enzima colina-O-acetiltransferase (ChAT) em animais submetidos à GVHD;
3. Avaliar o efeito da VNS elétrica na expressão intestinal de $\alpha 7$ nAChR por microscopia confocal em animais submetidos à GVHD;
4. Avaliar o efeito da VNS elétrica na resposta do enxerto-versus-leucemia (GVL) em animais submetidos à GVHD;
5. Avaliar o efeito da VNS elétrica na reconstituição da medula óssea em camundongos submetidos à GVHD;
6. Avaliar o efeito da VNS farmacológica na GVHD a partir da avaliação da sobrevida, sinais clínicos e lesão intestinal e hepática associada à doença, em camundongos tratados com GTS-21 e mecamilamina, agonista e antagonista seletivos do receptor $\alpha 7$ nAChR, respectivamente.

8. REFERÊNCIAS

ABU-SBEIH, Hamzah; ALI, Faisal S.; WANG, Yinghong. **Clinical Review on the Utility of Fecal Microbiota Transplantation in Immunocompromised Patients** *Current Gastroenterology Reports*, 2019. DOI: 10.1007/s11894-019-0677-6.

ALI, Alaa M.; DIPERSIO, John F.; SCHROEDER, Mark A. **The Role of Biomarkers in the Diagnosis and Risk Stratification of Acute Graft-versus-Host Disease: A Systematic Review** *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2016. DOI: 10.1016/j.bbmt.2016.04.022.

ARAI, Y. et al. Risk factors and prognosis of hepatic acute GvHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, [S. l.], 2016. DOI: 10.1038/bmt.2015.205.

ARANTES, R. M. E.; NOGUEIRA, A. M. M. F. Distribution of enteroglucagon- and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. **Cell and Tissue Research**, [S. l.], 1997. DOI: 10.1007/s004410050908.

ARDELL, Jeffrey L.; RAJENDRAN, Pradeep S.; NIER, Heath A.; KENKNIGHT, Bruce H.; ANDREW ARMOUR, J. Central-peripheral neural network interactions evoked by vagus nerve stimulation: Functional consequences on control of cardiac function. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, [S. l.], 2015. DOI: 10.1152/ajpheart.00557.2015.

AVERSA, Franco et al. Treatment of High-Risk Acute Leukemia with T-Cell–Depleted Stem Cells from Related Donors with One Fully Mismatched HLA Haplotype. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], 1998. DOI: 10.1056/nejm199810223391702.

BARON, Frédéric; STORB, Rainer. **Allogeneic hematopoietic cell transplantation as treatment for hematological malignancies: A review** *Springer Seminars in Immunopathology*, 2004. DOI: 10.1007/s00281-004-0165-3.

BARRETT, A. J.; SAVANI, B. N. Stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning regimens: A review of ten years experience with new transplant concepts and new therapeutic agents. **Leukemia**, [S. l.], 2006. DOI: 10.1038/sj.leu.2404334.

BASSI, Gabriel S.; KANASHIRO, Alexandre; COIMBRA, Norberto C.; TERRANDO,

Niccolò; MAIXNER, William; ULLOA, Luis. **Anatomical and clinical implications of vagal modulation of the spleen***Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2020. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2020.02.011.

BEILHACK, Andreas et al. In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets. **Blood**, [S. l.], 2005. DOI: 10.1182/blood-2005-02-0509.

BEN-MENACHEM, E.; REVESZ, D.; SIMON, B. J.; SILBERSTEIN, S. **Surgically implanted and non-invasive vagus nerve stimulation: A review of efficacy, safety and tolerability***European Journal of Neurology*, 2015. DOI: 10.1111/ene.12629.

BERNARDES, Priscila T. T. et al. Nanocomposite treatment reduces disease and lethality in a murine model of acute graft-versus-host disease and preserves anti-tumor effects. **PLoS ONE**, [S. l.], 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0123004.

BERNIK, Thomas R. et al. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], 2002. DOI: 10.1084/jem.20011714.

BERTHOUD, H. R.; CARLSON, N. R.; POWLEY, T. L. Topography of efferent vagal innervation of the rat gastrointestinal tract. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, [S. l.], 1991. DOI: 10.1152/ajpregu.1991.260.1.r200.

BERTHOUD, Hans-Rudolf -R; JEDRZEJEWSKA, Agnes; POWLEY, Terry L. Simultaneous labeling of vagal innervation of the gut and afferent projections from the visceral forebrain with Dil injected into the dorsal vagal complex in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, [S. l.], 1990. DOI: 10.1002/cne.903010107.

BILLINGHAM, R. E. The biology of graft-versus-host reactions. **Harvey lectures**, [S. l.], 1966.

BLAZAR, Bruce R.; MURPHY, William J.; ABEDI, Mehrdad. **Advances in graft-versus-host disease biology and therapy***Nature Reviews Immunology*, 2012. DOI: 10.1038/nri3212.

BONAZ, B. et al. Chronic vagus nerve stimulation in Crohn's disease: A 6-month follow-up pilot study. **Neurogastroenterology and Motility**, [S. l.], 2016. DOI: 10.1111/nmo.12792.

BONAZ, B.; SINNIGER, V.; PELLISSIER, S. Vagus nerve stimulation: a new promising therapeutic tool in inflammatory bowel disease. **Journal of Internal Medicine**, [S. l.], 2017. a. DOI: 10.1111/joim.12611.

BONAZ, Bruno; SINNIGER, Valérie; PELLISSIER, Sonia. **The vagus nerve in the neuro-immune axis: Implications in the pathology of the gastrointestinal tract** **Frontiers in Immunology**, 2017. b. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01452.

BOROVIKOVA, Lyudmila V. et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, [S. l.], 2000. a. DOI: 10.1038/35013070.

BOROVIKOVA, Lyudmila V.; IVANOVA, Svetlana; NARDI, Dominic; ZHANG, Minghuang; YANG, Huan; OMBRELLINO, Michael; TRACEY, Kevin J. Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. *In: AUTONOMIC NEUROSCIENCE: BASIC AND CLINICAL 2000b*, **Anais** [...]. [s.l.: s.n.] DOI: 10.1016/S1566-0702(00)00233-2.

CAILOTTO, C.; COSTES, L. M. M.; VAN DER VLIET, J.; VAN BREE, S. H. W.; VAN HEERIKHUIZE, J. J.; BUIJS, R. M.; BOECKXSTAENS, G. E. Neuroanatomical evidence demonstrating the existence of the vagal anti-inflammatory reflex in the intestine. **Neurogastroenterology and Motility**, [S. l.], 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2982.2011.01824.x.

CARAVACA, April S.; GALLINA, Alessandro L.; TARNAWSKI, Laura; TRACEY, Kevin J.; PAVLOV, Valentin A.; LEVINE, Yaakov A.; OLOFSSON, Peder S. An effective method for acute vagus nerve stimulation in experimental inflammation. **Frontiers in Neuroscience**, [S. l.], 2019. DOI: 10.3389/fnins.2019.00877.

CARNITI, Cristiana; GIMONDI, Silvia; VENDRAMIN, Antonio; RECORDATI, Camilla; CONFALONIERI, Davide; BERMEMA, Anisa; CORRADINI, Paolo; MARIOTTI, Jacopo. Pharmacologic inhibition of JAK1/JAK2 signaling reduces Experimental murine acute GVHD while preserving GVT effects. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], 2015. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2758.

CASTILLA-LLORENTE, C. et al. Prognostic factors and outcomes of severe gastrointestinal GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, [S. l.], 2014. DOI: 10.1038/bmt.2014.69.

CASTOR, Marina G. M.; PINHO, Vanessa; TEIXEIRA, Mauro M. The role of chemokines in

mediating graft versus host disease: Opportunities for novel therapeutics. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], 2012. DOI: 10.3389/fphar.2012.00023.

CHAKRAVERTY, Ronjon et al. Limiting transplantation-related mortality following unrelated donor stem cell transplantation by using a nonmyeloablative conditioning regimen. **Blood**, [S. l.], 2002. DOI: 10.1182/blood.V99.3.1071.

CHANG, Alan L. et al. CCL2 produced by the glioma microenvironment is essential for the recruitment of regulatory t cells and myeloid-derived suppressor cells. **Cancer Research**, [S. l.], 2016. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0144.

CHEUK, Daniel KL. Optimal stem cell source for allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. **World Journal of Transplantation**, [S. l.], 2013. DOI: 10.5500/wjt.v3.i4.99.

CHEUNG, Jonah; RUDOLPH, Michael J.; BURSHTEYN, Fiana; CASSIDY, Michael S.; GARY, Ebony N.; LOVE, James; FRANKLIN, Matthew C.; HEIGHT, Jude J. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], 2012. DOI: 10.1021/jm300871x.

CHOI, Sung Won; REDDY, Pavan. **Current and emerging strategies for the prevention of graft-versus-host disease** *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2014. DOI: 10.1038/nrclinonc.2014.102.

CHORNY, Alejo et al. The soluble pattern recognition receptor PTX3 links humoral innate and adaptive immune responses by helping marginal zone B cells. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], 2016. DOI: 10.1084/jem.20150282.

CLANCY, Jennifer A.; MARY, David A.; WITTE, Klaus K.; GREENWOOD, John P.; DEUCHARS, Susan A.; DEUCHARS, Jim. Non-invasive Vagus nerve stimulation in healthy humans reduces sympathetic nerve activity. **Brain Stimulation**, [S. l.], 2014. DOI: 10.1016/j.brs.2014.07.031.

CLOUTHIER, Shawn G.; FERRARA, James L. M.; TESHIMA, Takanori. Graft-versus-host disease in the absence of the spleen after allogeneic bone marrow transplantation. **Transplantation**, [S. l.], 2002. DOI: 10.1097/00007890-200205270-00027.

COGHILL, James M.; SARANTOPOULOS, Stefanie; MORAN, Timothy P.; MURPHY,

William J.; BLAZAR, Bruce R.; SERODY, Jonathan S. **Effector CD4+ T cells, the cytokines they generate, and GVHD: Something old and something new***Blood*, 2011. DOI: 10.1182/blood-2010-12-290403.

COLSON, Yolonda L.; CHRISTOPHER, Kenneth; GLICKMAN, Jonathan; TAYLOR, Kendra N.; WRIGHT, Renee; PERKINS, David L. Absence of clinical GVHD and the in vivo induction of regulatory T cells after transplantation of facilitating cells. **Blood**, [S. l.], 2004. DOI: 10.1182/blood-2004-01-0393.

COOKE, Kenneth R.; HILL, Geoffrey R.; CRAWFORD, James M.; BUNGARD, David; BRINSON, Yani S.; DELMONTE, John; FERRARA, James L. M. Tumor necrosis factor- α production to lipopolysaccharide stimulation by donor cells predicts the severity of experimental acute graft-versus-host disease. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], 1998. DOI: 10.1172/JCI4285.

COPELAN, Edward A. **Hematopoietic stem-cell transplantation***New England Journal of Medicine*, 2006. DOI: 10.1056/NEJMra052638.

COURIEL, Daniel et al. Tumor necrosis factor- α blockade for the treatment of acute GVHD. **Blood**, [S. l.], 2004. DOI: 10.1182/blood-2003-12-4241.

COUTURIER, Sabine; BERTRAND, Daniel; MATTER, Jean Marc; HERNANDEZ, Maria Clemencia; BERTRAND, Sonia; MILLAR, Neil; VALERA, Soledad; BARKAS, Thomas; BALLIVET, Marc. A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit ($\alpha 7$) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by α -BTX. **Neuron**, [S. l.], 1990. DOI: 10.1016/0896-6273(90)90344-F.

DA SILVA, Cláudia Maria; VILAÇA BELO, Andrezza; PASSOS ANDRADE, Sílvia; PEIXOTO CAMPOS, Paula; CRISTINA FRANÇA FERREIRA, Márcia; LOPES DA SILVA-FILHO, Agnaldo; MENDONÇA CARNEIRO, Márcia. Identification of local angiogenic and inflammatory markers in the menstrual blood of women with endometriosis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], 2014. DOI: 10.1016/j.biopha.2014.08.005.

DE FERRARI, Gaetano M.; SCHWARTZ, Peter J. Vagus nerve stimulation: From pre-clinical to clinical application: Challenges and future directions. **Heart Failure Reviews**, [S. l.], 2011. DOI: 10.1007/s10741-010-9216-0.

DE JONGE, Wouter J. et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation

by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. **Nature Immunology**, [S. l.], 2005. DOI: 10.1038/ni1229.

DEFILIPP, Zachariah et al. Third-party fecal microbiota transplantation following allo-HCT reconstitutes microbiome diversity. **Blood Advances**, [S. l.], 2018. DOI: 10.1182/bloodadvances.2018017731.

DEMETRAKOPOULOS, George E. V.; TSOKOS, George C.; LEVINE, Arthur S. Recovery of splenic function after gvhd-associated functional asplenia. **American Journal of Hematology**, [S. l.], 1982. DOI: 10.1002/ajh.2830120112.

EDWIN BLALOCK, J. **Harnessing a neural-immune circuit to control inflammation and shock****Journal of Experimental Medicine**, 2002. DOI: 10.1084/jem.20020602.

EL-HAYEK, Jihad M.; ROGERS, Thomas E.; BROWN, Geri R. The role of TNF in hepatic histopathological manifestations and hepatic CD8+ T cell alloresponses in murine MHC class I disparate GVHD. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], 2005. DOI: 10.1189/jlb.1204730.

FELDER, Christian C. Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. **The FASEB Journal**, [S. l.], 1995. DOI: 10.1096/fasebj.9.8.7768353.

FERRARA, James L. M. **Novel strategies for the treatment and diagnosis of graft-versus-host-disease****Best Practice and Research: Clinical Haematology**, 2007. DOI: 10.1016/j.beha.2006.11.004.

FERRARA, James L. M.; SMITH, Christopher M.; SHEETS, Julia; REDDY, Pavan; SERODY, Jonathan S. **Altered homeostatic regulation of innate and adaptive immunity in lower gastrointestinal tract GVHD pathogenesis****Journal of Clinical Investigation**, 2017. DOI: 10.1172/JCI90592.

FONSECA, Roberta Cristelli et al. Vagus nerve regulates the phagocytic and secretory activity of resident macrophages in the liver. **Brain, Behavior, and Immunity**, [S. l.], 2019. DOI: 10.1016/j.bbi.2019.06.041.

FRANGOS, Eleni; ELLRICH, Jens; KOMISARUK, Barry R. Non-invasive access to the vagus nerve central projections via electrical stimulation of the external ear: FMRI evidence in humans. **Brain Stimulation**, [S. l.], 2015. DOI: 10.1016/j.brs.2014.11.018.

FUJII, T.; TSUCHIYA, T.; YAMADA, S.; FUJIMOTO, K.; SUZUKI, T.; KASAHARA, T.;

KAWASHIMA, K. Localization and synthesis of acetylcholine in human leukemic T cell lines. **Journal of Neuroscience Research**, [S. l.], 1996. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4547(19960401)44:1<66::AID-JNR9>3.0.CO;2-G.

GALITOVSKIY, Valentin; QIAN, Jing; CHERNYAVSKY, Alexander I.; MARCHENKO, Steve; GINDI, Vivian; EDWARDS, Robert A.; GRANDO, Sergei A. Cytokine-Induced Alterations of $\alpha 7$ Nicotinic Receptor in Colonic CD4 T Cells Mediate Dichotomous Response to Nicotine in Murine Models of Th1/Th17- versus Th2-Mediated Colitis. **The Journal of Immunology**, [S. l.], 2011. DOI: 10.4049/jimmunol.1002711.

GALLOWITSCH-PUERTA, Margot; PAVLOV, Valentin A. Neuro-immune interactions via the cholinergic anti-inflammatory pathway. **Life Sciences**, [S. l.], 2007. DOI: 10.1016/j.lfs.2007.01.002.

GAVIN, Marc A.; CLARKE, Sally R.; NEGROU, Ella; GALLEGOS, Alena; RUDENSKY, Alexander. Homeostasis and anergy of CD4+CD25+ suppressor T cells in vivo. **Nature Immunology**, [S. l.], 2002. DOI: 10.1038/ni743.

GERSHON-COHEN, J.; HERMEL, M. B.; GRIFFITH, J. Q. Protective effect of small lead shields during repeated whole-body x-ray irradiation of rats. **Radiology**, [S. l.], 1952. DOI: 10.1148/58.3.383.

GHIA, Jean Eric; BLENNERHASSETT, Patricia; KUMAR-ONDIVEERAN, Harry; VERDU, Elena F.; COLLINS, Stephen M. The Vagus Nerve: A Tonic Inhibitory Influence Associated With Inflammatory Bowel Disease in a Murine Model. **Gastroenterology**, [S. l.], 2006. DOI: 10.1053/j.gastro.2006.08.016.

GHIMIRE, Sakhila; WEBER, Daniela; MAVIN, Emily; WANG, Xiao Nong; DICKINSON, Anne Mary; HOLLER, Ernst. **Pathophysiology of GvHD and other HSCT-related major complications** *Frontiers in Immunology*, 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00079.

GIACCONE, L.; MARTIN, P.; CARPENTER, P.; MORAVEC, C.; HOOPER, H.; FUNKE, V. A. M.; STORB, R.; FLOWERS, M. E. D. Safety and potential efficacy of low-dose methotrexate for treatment of chronic graft-versus-host disease. **Bone Marrow Transplantation**, [S. l.], 2005. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705022.

GIGLIOTTI, Joseph C.; OKUSA, Mark D. The spleen: The forgotten organ in acute kidney injury of critical illness. *In: NEPHRON - CLINICAL PRACTICE 2014*, **Anais** [...]. [s.l.: s.n.]

DOI: 10.1159/000363255.

GLAZIER, Arnold; TUTSCHKA, Peter J.; FARMER, Evan R.; SANTOS, George W. Graft-versus-host disease in cyclosporin a-treated rats after syngeneic and autologous bone marrow reconstitution. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], 1983. DOI: 10.1084/jem.158.1.1.

GOLOB, Jonathan L. et al. Stool Microbiota at Neutrophil Recovery Is Predictive for Severe Acute Graft vs Host Disease after Hematopoietic Cell Transplantation. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], 2017. DOI: 10.1093/cid/cix699.

GONÇALVES, Thissiane L.; BENVEGNÙ, Dalila M.; BONFANTI, Gabriela. Specific factors influence the success of autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], 2009. DOI: 10.4161/oxim.2.2.8355.

GOVERSE, Gera; STAKENBORG, Michelle; MATTEOLI, Gianluca. **The intestinal cholinergic anti-inflammatory pathway** **Journal of Physiology**, 2016. DOI: 10.1113/JP271537.

GROUX, Hervé; BIGLER, Mike; DE VRIES, Jan E.; RONCAROLO, Maria Grazia. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], 1996. DOI: 10.1084/jem.184.1.19.

GSCHWANDTNER, Martha; DERLER, Rupert; MIDWOOD, Kim S. **More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis** **Frontiers in Immunology**, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02759.

GYURKOCZA, Boglarka; REZVANI, Andrew; STORB, Rainer F. **Allogeneic hematopoietic cell transplantation: The state of the art** **Expert Review of Hematology**, 2010. DOI: 10.1586/ehm.10.21.

HAMILTON, Betty Ky. Current approaches to prevent and treat GVHD after allogeneic stem cell transplantation. **Hematology (United States)**, [S. l.], 2018. DOI: 10.1182/asheducation-2018.1.228.

HARRIS, Andrew C.; FERRARA, James L. M.; LEVINE, John E. **Advances in predicting acute GVHD** **British Journal of Haematology**, 2013. DOI: 10.1111/bjh.12142.

HASEGAWA, H.; INOUE, A.; KOHNO, M.; LEI, J.; MIYAZAKI, T.; YOSHIE, O.; NOSE, M.; YASUKAWA, M. Therapeutic effect of CXCR3-expressing regulatory T cells on liver,

lung and intestinal damages in a murine acute GVHD model. **Gene Therapy**, [S. l.], 2008. DOI: 10.1038/sj.gt.3303051.

HIRAMOTO, Tetsuya; CHIDA, Yoichi; SONODA, Junko; YOSHIHARA, Kazufumi; SUDO, Nobuyuki; KUBO, Chiharu. The Hepatic Vagus Nerve Attenuates Fas-Induced Apoptosis in the Mouse Liver via $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor. **Gastroenterology**, [S. l.], 2008. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.03.005.

HOLLER, E. et al. Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation [see comments]. **Blood**, [S. l.], 1990. DOI: 10.1182/blood.v75.4.1011.1011.

HOLTICK, Udo; ALBRECHT, Melanie; CHEMNITZ, Jens M.; THEURICH, Sebastian; SKOETZ, Nicole; SCHEID, Christof; VON BERGWELT-BAILDON, Michael. **Bone marrow versus peripheral blood allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for haematological malignancies in adults** **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2014. DOI: 10.1002/14651858.CD010189.pub2.

HONG, Gun Soo; ZILLEKENS, Anne; SCHNEIKER, Bianca; PANTELIS, Dimitrios; DE JONGE, Wouter J.; SCHAEFER, Nico; KALFF, Joerg C.; WEHNER, Sven. Non-invasive transcutaneous auricular vagus nerve stimulation prevents postoperative ileus and endotoxemia in mice. **Neurogastroenterology and Motility**, [S. l.], 2019. DOI: 10.1111/nmo.13501.

HONG, Ya Qun; WAN, Bo; LI, Xiao Fan. **Macrophage regulation of graft-vs-host disease** **World Journal of Clinical Cases**, 2020. DOI: 10.12998/wjcc.v8.i10.1793.

HÜLSDÜNKER, Jan et al. Neutrophils provide cellular communication between ileum and mesenteric lymph nodes at graft-versus-host disease onset. **Blood**, [S. l.], 2018. DOI: 10.1182/blood-2017-10-812891.

HUSTON, J. M.; TRACEY, K. J. The pulse of inflammation: Heart rate variability, the cholinergic anti-inflammatory pathway and implications for therapy. In: JOURNAL OF INTERNAL MEDICINE 2011, **Anais** [...]. [s.l: s.n.] DOI: 10.1111/j.1365-2796.2010.02321.x.

ICHIBA, Tamotsu et al. Early changes in gene expression profiles of hepatic GVHD uncovered by oligonucleotide microarrays. **Blood**, [S. l.], 2003. DOI: 10.1182/blood-2002-09-2748.

ICHIKI, Yasunori; BOWLUS, Christopher L.; SHIMODA, Shinji; ISHIBASHI, Hiromi;

VIERLING, John M.; GERSHWIN, M. Eric. **T cell immunity and graft-versus-host disease (GVHD) Autoimmunity Reviews**, 2006. DOI: 10.1016/j.autrev.2005.02.006.

INOUE, Tsuyoshi et al. Vagus nerve stimulation mediates protection from kidney ischemia-reperfusion injury through $\alpha 7$ nAChR+ splenocytes. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], 2016. DOI: 10.1172/JCI83658.

JACOBSON, L. O.; SIMMONS, E. L.; MARKS, E. K.; ELDREDGE, J. H. Recovery from radiation injury. **Science**, [S. l.], 1951. DOI: 10.1126/science.113.2940.510.

JAGASIA, Madan et al. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. **Blood**, [S. l.], 2012. DOI: 10.1182/blood-2011-06-364265.

JAMES, Lisa; GEORGOPOULOS, Apostolos. Persistent Antigens Hypothesis: The Human Leukocyte Antigen (HLA) Connection. **Journal of Neurology & Neuromedicine**, [S. l.], 2018. DOI: 10.29245/2572.942x/2018/6.1235.

JI, H.; RABBI, M. F.; LABIS, B.; PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J.; GHIA, J. E. Central cholinergic activation of a vagus nerve-to-spleen circuit alleviates experimental colitis. **Mucosal Immunology**, [S. l.], 2014. a. DOI: 10.1038/mi.2013.52.

JI, H.; RABBI, M. F.; LABIS, B.; PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J.; GHIA, J. E. Central cholinergic activation of a vagus nerve-to-spleen circuit alleviates experimental colitis. **Mucosal Immunology**, [S. l.], 2014. b. DOI: 10.1038/mi.2013.52.

KANASHIRO, Alexandre et al. **Therapeutic potential and limitations of cholinergic anti-inflammatory pathway in sepsis Pharmacological Research**, 2017. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.12.014.

KAWASHIMA, Koichiro; FUJII, Takeshi; MORIWAKI, Yasuhiro; MISAWA, Hidemi. Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. *In: LIFE SCIENCES 2012, Anais [...].* [s.l.: s.n.] DOI: 10.1016/j.lfs.2012.05.006.

KEEVER, C. A. et al. Immune reconstitution following bone marrow transplantation: Comparison of recipients of T-cell depleted marrow with recipients of conventional marrow grafts. **Blood**, [S. l.], 1989. DOI: 10.1182/blood.v73.5.1340.bloodjournal7351340.

KOX, Matthijs; VAN VELZEN, Jeroen F.; POMPE, Jan C.; HOEDEMAEKERS, Cornelia W.;

VAN DER HOEVEN, Johannes G.; PICKKERS, Peter. GTS-21 inhibits pro-inflammatory cytokine release independent of the Toll-like receptor stimulated via a transcriptional mechanism involving JAK2 activation. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], 2009. DOI: 10.1016/j.bcp.2009.06.096.

KUMAR, Sandeep; MOHAMMADPOUR, Hemn; CAO, Xuefang. Targeting Cytokines in GVHD Therapy. **Journal of immunology research and therapy**, [S. l.], 2017.

LAMAITA, Rívia Mara; PONTES, Anaglória; BELO, Andrezza V.; CAETANO, João Pedro; ANDRADE, Sílvia P.; CÂNDIDO, Eduardo B.; CARNEIRO, Márcia Mendonça; SILVA-FILHO, Agnaldo L. Evaluation of N-acetilglucosaminidase and myeloperoxidase activity in patients with endometriosis-related infertility undergoing intracytoplasmic sperm injection. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, [S. l.], 2012. DOI: 10.1111/j.1447-0756.2011.01805.x.

LANGEREIS, Jeroen D.; PICKKERS, Peter; DE KLEIJN, Stan; GERRETSEN, Jelle; DE JONGE, Marien I.; KOX, Matthijs. Spleen-derived IFN- γ induces generation of PD-L1 + - suppressive neutrophils during endotoxemia . **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], 2017. DOI: 10.1189/jlb.3a0217-051rr.

LANGNESS, Simone; KOJIMA, Mitsuaki; COIMBRA, Raul; ELICEIRI, Brian P.; COSTANTINI, Todd W. Enteric glia cells are critical to limiting the intestinal inflammatory response after injury. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, [S. l.], 2017. DOI: 10.1152/ajpgi.00371.2016.

LAPP, Wayne S.; GHAYUR, Tariq; MENDES, Mariza; SEDDIK, Mona; SEEMAYER, Thomas A. The Functional and Histological Basis for Graft-versus-Host-Induced Immunosuppression. **Immunological Reviews**, [S. l.], 1985. DOI: 10.1111/j.1600-065X.1985.tb01155.x.

LEI, Wei; DUAN, Zhijun. **Advances in the Treatment of Cholinergic Anti-Inflammatory Pathways in Gastrointestinal Diseases by Electrical Stimulation of Vagus Nerve** *Digestion*, 2019. DOI: 10.1159/000504474.

LEVINE, John E. **Implications of TNF- α in the pathogenesis and management of GVHD.** *International journal of hematology*, 2011. DOI: 10.1007/s12185-011-0803-1.

LI, Fujing et al. The protective effect of PNU-282987, a selective $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine

receptor agonist, on the hepatic ischemia-reperfusion injury is associated with the inhibition of high-mobility group box 1 protein expression and nuclear factor κ b activation in . **Shock**, [S. l.], 2013. DOI: 10.1097/SHK.0b013e31827aa1f6.

LI, Jun; SEMPLE, Kenrick; SUH, Woong Kyung; LIU, Chen; CHEN, Fangping; BLAZAR, Bruce R.; YU, Xue Zhong. Roles of CD28, CTLA4, and inducible costimulator in acute graft-versus-host disease in mice. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, [S. l.], 2011. DOI: 10.1016/j.bbmt.2011.01.018.

LI, Y.; XU, Z.; YU, Y.; YUAN, H.; XU, H.; ZHU, Q.; WANG, C.; SHI, X. The vagus nerve attenuates fulminant hepatitis by activating the src kinase in kuppfer cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, [S. l.], 2014. DOI: 10.1111/sji.12141.

LIU, Zhigang; HAN, Bo; LI, Peijie; WANG, Zie; FAN, Qing. Activation of α 7nAChR by nicotine reduced the Th17 response in CD4+T lymphocytes. **Immunological Investigations**, [S. l.], 2014. DOI: 10.3109/08820139.2014.914532.

LORENZ, Egon; UPHOFF, Delta; REID, T. R.; SHELTON, Emma. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. **Journal of the National Cancer Institute**, [S. l.], 1951. DOI: 10.1093/jnci/12.1.197.

LV, Yan Xia et al. VEGF-A and VEGF-B Coordinate the Arteriogenesis to Repair the Infarcted Heart with Vagus Nerve Stimulation. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [S. l.], 2018. DOI: 10.1159/000491775.

MACDONALD, Kelli P. A.; HILL, Geoffrey R.; BLAZAR, Bruce R. **Chronic graft-versus-host disease: Biological insights from preclinical and clinical studies***Blood*, 2017. DOI: 10.1182/blood-2016-06-686618.

MAJHAIL, Navneet S. et al. Indications for Autologous and Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Guidelines from the American Society for Blood and Marrow Transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, [S. l.], 2015. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.07.032.

MALARD, Florent; HUANG, Xiao Jun; SIM, Joycelyn P. Y. **Treatment and unmet needs in steroid-refractory acute graft-versus-host disease***Leukemia*, 2020. DOI: 10.1038/s41375-020-0804-2.

MAPARA, Markus Y.; LENG, Corinna; KIM, Yong Mi; BRONSON, Roderick; LOKSHIN, Anna; LUSTER, Andrew; SYKES, Megan. Expression of Chemokines in GVHD Target Organs Is Influenced by Conditioning and Genetic Factors and Amplified by GVHR. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, [S. l.], 2006. DOI: 10.1016/j.bbmt.2006.02.005.

MARTELLI, D.; MCKINLEY, M. J.; MCALLEN, R. M. The cholinergic anti-inflammatory pathway: A critical review. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, [S. l.], 2014. DOI: 10.1016/j.autneu.2013.12.007.

MARTIN, Paul J. **Pathogenic neutrophils in acute GVHD***Blood*, 2018. DOI: 10.1182/blood-2018-03-836353.

MARTÍNEZ, Carmen; URBANO-ISPIZUA, Álvaro. **Graft-versus-host disease therapy: Something else beyond glucocorticoids?***Haematologica*, 2011. DOI: 10.3324/haematol.2011.050534.

MARTINO, Rodrigo et al. Retrospective comparison of reduced-intensity conditioning and conventional high-dose conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using HLA-identical sibling donors in myelodysplastic syndromes. **Blood**, [S. l.], 2006. DOI: 10.1182/blood-2005-11-4503.

MATSUKUMA, Karen E.; WEI, Dongguang; SUN, Kai; RAMSAMOOJ, Rajendra; CHEN, Mingyi. **Diagnosis and differential diagnosis of hepatic graft versus host disease (GVHD)***Journal of Gastrointestinal Oncology*, 2016. DOI: 10.3978/j.issn.2078-6891.2015.036.

MATTEOLI, Gianluca; BOECKXSTAENS, Guy E. The vagal innervation of the gut and immune homeostasis. **Gut**, [S. l.], 2013. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-302550.

MESSINA, C.; FARACI, M.; DE FAZIO, V.; DINI, G.; CALÒ, M. P.; CALORE, E. Prevention and treatment of acute GvHD. **Bone Marrow Transplantation**, [S. l.], 2008. DOI: 10.1038/bmt.2008.57.

METZ, Christine N.; PAVLOV, Valentin A. **Vagus nerve cholinergic circuitry to the liver and the gastrointestinal tract in the neuroimmune communicatome***American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2018. DOI: 10.1152/ajpgi.00195.2018.

MOHAMMADPOUR, Hemn et al. β 2-Adrenergic receptor activation on donor cells

ameliorates acute GvHD. **JCI Insight**, [S. l.], 2020. DOI: 10.1172/jci.insight.137788.

MOUTUOU, Moutuaata M.; PAGÉ, Gabriel; ZAID, Intesar; LESAGE, Sylvie; GUIMOND, Martin. **Restoring T cell homeostasis after allogeneic stem cell transplantation; Principal limitations and future challenges** **Frontiers in Immunology**, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01237.

MURAKAMI, Haruaki; LI, Shiyong; FOREMAN, Robert; YIN, Jieyun; HIRAI, Toshihiro; CHEN, Jiande D. Z. Intraoperative Vagus Nerve Stimulation Accelerates Postoperative Recovery in Rats. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, [S. l.], 2019. DOI: 10.1007/s11605-018-3969-5.

NEUMANN, Susanne; SCHOPPMAYER, Konrad; LANGE, Thoralf; WIEDMANN, Marcus; GOLSONG, Johannes; TANNAPFEL, Andrea; MOSSNER, Joachim; NIEDERWIESER, Dietger; CACA, Karel. Wireless capsule endoscopy for diagnosis of acute intestinal graft-versus-host disease. **Gastrointestinal Endoscopy**, [S. l.], 2007. DOI: 10.1016/j.gie.2005.10.042.

NISHIO, Takahiro et al. Hepatic vagus nerve regulates Kupffer cell activation via $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in nonalcoholic steatohepatitis. **Journal of Gastroenterology**, [S. l.], 2017. DOI: 10.1007/s00535-016-1304-z.

NOEL, D. R. et al. Does Graft-Versus-Host disease influence the tempo of immunologic recovery after allogeneic human marrow transplantation? An observation on 56 long-term survivors. **Blood**, [S. l.], 1978. DOI: 10.1182/blood.v51.6.1087.bloodjournal5161087.

NUNTAPHUM, Watthana et al. Vagus nerve stimulation exerts cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury predominantly through its efferent vagal fibers. **Basic Research in Cardiology**, [S. l.], 2018. DOI: 10.1007/s00395-018-0683-0.

PARK, Juhyun; KANG, Jung Woo; LEE, Sun Mee. Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway by nicotine attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury via heme oxygenase-1 induction. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], 2013. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.03.026.

PAVLOV, V. A. et al. GALANTAMINE IMPROVES SURVIVAL IN LETHAL ENDOTOXEMIA. **Shock**, [S. l.], 2006. a. DOI: 10.1097/00024382-200606001-00198.

PAVLOV, Valentin A. et al. Selective $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis. **Critical Care Medicine**, [S. l.], 2007. DOI: 10.1097/01.CCM.0000259381.56526.96.

PAVLOV, Valentin A.; OCHANI, Mahendar; GALLOWITSCH-PUERTA, Margot; OCHANI, Kanta; HUSTON, Jared M.; CZURA, Christopher J.; AL-ABED, Yousef; TRACEY, Kevin J. Central muscarinic cholinergic regulation of the systemic inflammatory response during endotoxemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], 2006. b. DOI: 10.1073/pnas.0600506103.

PAVLOV, Valentin A.; WANG, Hong; CZURA, Christopher J.; FRIEDMAN, Steven G.; TRACEY, Kevin J. **The Cholinergic Anti-inflammatory Pathway: A Missing Link in Neuroimmunomodulation** **Molecular Medicine**, 2003. DOI: 10.1007/bf03402177.

PELED, Jonathan U.; HANASH, Alan M.; JENQ, Robert R. **Role of the intestinal mucosa in acute gastrointestinal GVHD** **Blood**, 2016. DOI: 10.1182/blood-2016-06-716738.

PICARDI, M.; SELLERI, C.; ROTOLI, B. Spleen sizing by ultrasound scan and risk of pneumococcal infection in patients with chronic GVHD: Preliminary observations. **Bone Marrow Transplantation**, [S. l.], 1999. DOI: 10.1038/sj.bmt.1701861.

PIÉRARD, G. E.; HERMANNNS-LÊ, T.; PAQUET, P.; ROUSSEAU, A. F.; DELVENNE, P.; PIÉRARD-FRANCHIMONT, C. Toxic Epidermal Necrolysis and Graft-versus-Host Reaction: Revisiting a Puzzling Similarity. **ISRN Dermatology**, [S. l.], 2013. DOI: 10.1155/2013/651590.

PLATZBECKER, U.; KLINGEL, K.; THIEDE, C.; FREIBERG-RICHTER, J.; SCHUH, D.; EHNINGER, G.; KANDOLF, R.; BORNHÄUSER, M. Acute heart failure after allogeneic blood stem cell transplantation due to massive myocardial infiltration by cytotoxic T cells of donor origin. **Bone Marrow Transplantation**, [S. l.], 2001. DOI: 10.1038/sj.bmt.1702744.

POHANKA, Miroslav. **Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor is a target in pharmacology and toxicology** **International Journal of Molecular Sciences**, 2012. DOI: 10.3390/ijms13022219.

PONEC, R. J.; HACKMAN, R. C.; MCDONALD, G. B. Endoscopic and histologic diagnosis of intestinal graft-versus-host disease after marrow transplantation. **Gastrointestinal Endoscopy**, [S. l.], 1999. DOI: 10.1016/S0016-5107(99)70390-1.

QIAN, Liren; WU, Zhengcheng; SHEN, Jianliang. Advances in the treatment of acute graft-versus-host disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [S. l.], 2013. DOI: 10.1111/jcmm.12093.

RACKLEY, Cynthia; SCHULTZ, Kirk R.; GOLDMAN, Frederick D.; CHAN, Ka Wah; SERRANO, Amy; HULSE, James E.; GILMAN, Andrew L. Cardiac manifestations of graft-versus-host disease. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, [S. l.], 2005. DOI: 10.1016/j.bbmt.2005.07.002.

RAFEI, Moutih et al. Mesenchymal stromal cell derived CCL2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via STAT3 inactivation and PAX5 induction. **Blood**, [S. l.], 2008. DOI: 10.1182/blood-2008-07-166892.

RAMADAN, Abdulraouf; PACZESNY, Sophie. **Various forms of tissue damage and danger signals following hematopoietic stem-cell transplantation** *Frontiers in Immunology*, 2015. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00014.

REDDY, Pavan et al. Histone deacetylase inhibition modulates indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent DC functions and regulates experimental graft-versus-host disease in mice. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], 2008. DOI: 10.1172/JC134712.

REZENDE, Barbara M.; BERNARDES, Priscila T. T.; RESENDE, Carolina B.; ARANTES, Rosa M. E.; SOUZA, Danielle G.; BRAGA, Fernão C.; CASTOR, Marina G. M.; TEIXEIRA, Mauro M.; PINHO, Vanessa. Lithothamnion muelleri controls inflammatory responses, target organ injury and lethality associated with graft-versus-host disease in mice. **Marine Drugs**, [S. l.], 2013. DOI: 10.3390/md11072595.

REZENDE, Barbara Maximino et al. Inhibition of 5-lipoxygenase alleviates graft-versus-host disease. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], 2017. DOI: 10.1084/jem.20170261.

ROBERTS, Stephen S.; LEEBORG, Nicky; LORIAUX, Marc; JOHNSON, F. Leonard; HUANG, Meei Li; STENZEL, Peter; THIEDE, Christian; GODDER, Kamar T. Acute graft-versus-host disease of the heart. **Pediatric Blood and Cancer**, [S. l.], 2006. DOI: 10.1002/pbc.20621.

ROSAS-BALLINA, Mauricio et al. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. **Science**, [S. l.], 2011. DOI: 10.1126/science.1209985.

ROSAS-BALLINA, Mauricio; OCHANI, Mahendar; PARRISH, William R.; OCHANI, Kanta; HARRIS, Yael T.; HUSTON, Jared M.; CHAVAN, Sangeeta; TRACEY, Kevin J. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], 2008. DOI: 10.1073/pnas.0803237105.

ROSS, Duncan; JONES, Monica; KOMANDURI, Krishna; LEVY, Robert B. Antigen and lymphopenia-driven donor T cells are differentially diminished by post-transplantation administration of cyclophosphamide after hematopoietic cell transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, [S. l.], 2013. DOI: 10.1016/j.bbmt.2013.06.019.

SALOMAO, Marcela; DORRITIE, Kathleen; MAPARA, Markus Y.; SEPULVEDA, Antonia. **Histopathology of graft-vs-host disease of gastrointestinal tract and liver: An update** **American Journal of Clinical Pathology**, 2016. DOI: 10.1093/AJCP/AQW050.

SCHWAB, Lukas et al. Neutrophil granulocytes recruited upon translocation of intestinal bacteria enhance graft-versus-host disease via tissue damage. **Nature Medicine**, [S. l.], 2014. DOI: 10.1038/nm.3517.

SHIFRIN, Helena; NADLER-MILBAUER, Mirela; SHOHAM, Shai; WEINSTOCK, Marta. Rivastigmine Alleviates Experimentally Induced Colitis in Mice and Rats by Acting at Central and Peripheral Sites to Modulate Immune Responses. **PLoS ONE**, [S. l.], 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0057668.

SHULMAN, Howard M.; SHARMA, Pankaj; AMOS, Deborah; FENSTER, L. Frederick; MCDONALD, George B. A coded histologic study of hepatic graft-versus-host disease after human bone marrow transplantation. **Hepatology**, [S. l.], 1988. DOI: 10.1002/hep.1840080305.

SILBERSTEIN, Stephen D.; MECHTLER, Laszlo L.; KUDROW, David B.; CALHOUN, Anne H.; MCCLURE, Candace; SAPER, Joel R.; LIEBLER, Eric J.; RUBENSTEIN ENGEL, Emily; TEPPER, Stewart J. Non-Invasive Vagus Nerve Stimulation for the ACute Treatment of Cluster Headache: Findings From the Randomized, Double-Blind, Sham-Controlled ACT1 Study. **Headache**, [S. l.], 2016. DOI: 10.1111/head.12896.

SILVERMAN, Harold A. et al. Standardization of methods to record Vagus nerve activity in mice. **Bioelectronic Medicine**, [S. l.], 2018. DOI: 10.1186/s42234-018-0002-y.

SINGH, Anurag K.; MCGUIRK, Joseph P. **Allogeneic stem cell transplantation: A historical and scientific overview***Cancer Research*, 2016. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1311.

SINHA, Manoj L.; FRY, Terry J.; FOWLER, Daniel H.; MILLER, Georgina; MACKALL, Crystal L. Interleukin 7 worsens graft-versus-host disease. **Blood**, [S. l.], 2002. DOI: 10.1182/blood-2002-04-1082.

SISTIGU, Antonella; VIAUD, Sophie; CHAPUT, Nathalie; BRACCI, Laura; PROIETTI, Enrico; ZITVOGEL, Laurence. **Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design**.*Seminars in immunopathology*, 2011. DOI: 10.1007/s00281-011-0245-0.

SMITH, L. H. Radiation Chimaeras. D. W. van Bekkum and M. J. de Vries. Academic Press, New York, 1967. x + 277 pp., illus. \$20. **Science**, [S. l.], 1968. DOI: 10.1126/science.159.3812.294.

SNOVER, Dale C.; WEISDORF, Sally A.; RAMSAY, Norma K.; MCGLAVE, Philip; KERSEY, John H. Hepatic Graft Versus Host Disease: A Study of the Predictive Value of Liver Biopsy in Diagnosis. **Hepatology**, [S. l.], 1984. DOI: 10.1002/hep.1840040122.

SNOVER, Dale C.; WEISDORF, Sally A.; VERCELLOTTI, Gregory M.; RANK, Brian; HUTTON, Scot; MCGLAVE, Philip. A histopathologic study of gastric and small intestinal graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. **Human Pathology**, [S. l.], 1985. DOI: 10.1016/S0046-8177(85)80232-X.

SOUZA, Danielle G.; SOARES, Adriana C.; PINHO, Vanessa; TORLONI, Humberto; REIS, Luiz F. L.; MARTINS, Mauro T.; DIAS, Adriana A. M. Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. **American Journal of Pathology**, [S. l.], 2002. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)61122-4.

STAKENBORG, N. et al. Abdominal vagus nerve stimulation as a new therapeutic approach to prevent postoperative ileus. **Neurogastroenterology and Motility**, [S. l.], 2017. DOI: 10.1111/nmo.13075.

SU, Xiao; JAE, Woo Lee; MATTHAY, Zachary A.; MEDNICK, Gabe; UCHIDA, Tokujiro; FANG, Xiaohui; GUPTA, Naveen; MATTHAY, Michael A. Activation of the $\alpha 7$ nAChR reduces acid-induced acute lung injury in mice and rats. **American Journal of Respiratory**

Cell and Molecular Biology, [S. l.], 2007. DOI: 10.1165/rcmb.2006-0240OC.

TERAKURA, S.; MARTIN, P. J.; SHULMAN, H. M.; STORER, B. E. **Cutaneous macrophage infiltration in acute GvHDBone Marrow Transplantation**, 2015. DOI: 10.1038/bmt.2015.114.

TESHIMA, Takanori; ORDEMANN, Rainer; REDDY, Pavan; GAGIN, Svetlana; LIU, Chen; COOKE, Kenneth R.; FERRARA, James L. M. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. **Nature Medicine**, [S. l.], 2002. DOI: 10.1038/nm0602-575.

TESHIMA, Takanori; REDDY, Pavan; ZEISER, Robert. **Acute Graft-versus-Host Disease: Novel Biological InsightsBiology of Blood and Marrow Transplantation**, 2016. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.10.001.

THE, F. O.; CAILOTTO, C.; VAN DER VLIET, J.; DE JONGE, W. J.; BENNINK, R. J.; BUIJS, R. M.; BOECKXSTAENS, G. E. Central activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway reduces surgical inflammation in experimental post-operative ileus. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], 2011. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01296.x.

THIELE, D. L.; EIGENBRODT, M. L.; BRYDE, S. E.; EIGENBRODT, E. H.; LIPSKY, P. E. Intestinal graft-versus-host disease is initiated by donor T cells distinct from classic cytotoxic T lymphocytes. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], 1989. DOI: 10.1172/JCI114383.

THOMAS, E. D.; STORB, R.; CLIFT, R. A.; FEFER, A.; JOHNSON, L.; NEIMAN, P. E.; LERNER, K. G.; GLUCKSBERG, H.; BUCKNER, C. D. Bone-marrow transplantation (Second of two parts). **New England Journal of Medicine**, [S. l.], 1975. a.

THOMAS, E. Donnall; LOCHTE, Harry L.; LU, Wan Ching; FERREBEE, Joseph W. Intravenous Infusion of Bone Marrow in Patients Receiving Radiation and Chemotherapy. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], 1957. DOI: 10.1056/nejm195709122571102.

THOMAS, E.; STORB, R.; CLIFT, R. A.; FEFER, A.; JOHNSON, F. L.; NEIMAN, P. E.; LERNER, K. G.; GLUCKSBERG, H.; BUCKNER, C. D. Bone-marrow transplantation (first of two parts). **The New England journal of medicine**, [S. l.], 1975. b. DOI: 10.1056/NEJM197504172921605.

TRACEY, Kevin J. **The inflammatory reflexNature**, 2002. DOI: 10.1038/nature01321.

TRACEY, Kevin J.; CZURA, Christopher J.; IVANOVA, Svetlana. Mind over immunity. **The FASEB Journal**, [S. l.], 2001. DOI: 10.1096/fj.01-0148hyp.

TRANSPLANTES, REGISTRO BRASILEIRO DE. **Dados Numéricos da doação de órgãos e transplantes realizados por estado e instituição no período Janeiro a Setembro de 2020**. São Paulo.

TSENG, Li Hui et al. IL10 and IL10 Receptor Gene Variation and Outcomes After Unrelated and Related Hematopoietic Cell Transplantation. **Transplantation**, [S. l.], 2009. DOI: 10.1097/TP.0b013e318195c474.

TUGUES, Sonia et al. Graft-versus-host disease, but not graft-versus-leukemia immunity, is mediated by GM-CSF-licensed myeloid cells. **Science Translational Medicine**, [S. l.], 2018. DOI: 10.1126/scitranslmed.aat8410.

UMANSKY, Viktor; BLATTNER, Carolin; GEBHARDT, Christoffer; UTIKAL, Jochen. **The role of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in cancer progression** *Vaccines*, 2016. DOI: 10.3390/vaccines4040036.

VAN LIER, Yannouck F. et al. Donor fecal microbiota transplantation ameliorates intestinal graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. **Science Translational Medicine**, [S. l.], 2020. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaz8926.

VAN MAANEN, Marjolein A.; LEBRE, Maria C.; VAN DER POLL, Tom; LAROSA, Gregory J.; ELBAUM, Daniel; VERVOORDELDONK, Margriet J.; TAK, Paul P. Stimulation of nicotinic acetylcholine receptors attenuates collagen-induced arthritis in mice. **Arthritis and Rheumatism**, [S. l.], 2009. DOI: 10.1002/art.24177.

VAN WESTERLOO, David J.; GIEBELEN, Ilona A.; FLORQUIN, Sandrine; BRUNO, Marco J.; LAROSA, Gregory J.; ULLOA, Luis; TRACEY, Kevin J.; VAN DER POLL, T. The Vagus Nerve and Nicotinic Receptors Modulate Experimental Pancreatitis Severity in Mice. **Gastroenterology**, [S. l.], 2006. DOI: 10.1053/j.gastro.2006.02.022.

VAN WESTERLOO, David J.; GIEBELEN, Ilona A. J.; FLORQUIN, Sandrine; DAALHUISEN, Joost; BRUNO, Marco J.; DE VOS, Alex F.; TRACEY, Kevin J.; VAN DER POLL, Tom. The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis. **Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], 2005. DOI: 10.1086/430323.

VILLA, Nancy Y.; MCFADDEN, Grant. **Virotherapy as Potential Adjunct Therapy for Graft-Vs-Host Disease***Current Pathobiology Reports*, 2018. DOI: 10.1007/s40139-018-0186-6.

VOGELSANG, Georgia B.; LEE, Linda; BENSEN-KENNEDY, Debra M. Pathogenesis and Treatment of Graft-Versus-Host Disease After Bone Marrow Transplant. **Annual Review of Medicine**, [S. l.], 2003. DOI: 10.1146/annurev.med.54.101601.152339.

VRIESENDORP, Huib M.; HEIDT, Peter J. **History of graft-versus-host disease***Experimental Hematology*, 2016. DOI: 10.1016/j.exphem.2016.05.011.

WANG, Hong et al. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature**, [S. l.], 2003. DOI: 10.1038/nature01339.

WANG, Hong et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. **Nature Medicine**, [S. l.], 2004. DOI: 10.1038/nm1124.

WEBB, B. J.; BRUNNER, A.; FORD, C. D.; GAZDIK, M. A.; PETERSEN, F. B.; HODA, D. Fecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection in hematopoietic stem cell transplant recipients. **Transplant Infectious Disease**, [S. l.], 2016. DOI: 10.1111/tid.12550.

WESS, Jürgen. **Mutational analysis of muscarinic acetylcholine receptors: Structural basis of ligand/receptor/g protein interactions***Life Sciences*, 1993. DOI: 10.1016/0024-3205(93)90618-D.

WESS, Jürgen; DUTTARROY, Alokesh; GOMEZA, Jesus; ZHANG, Weilie; YAMADA, Masahisa; FELDER, Christian C.; BERNARDINI, Nadia; REEH, Peter W. **Muscarinic receptor subtypes mediating central and peripheral antinociception studied with muscarinic receptor knockout mice: A review***Life Sciences*, 2003. DOI: 10.1016/S0024-3205(03)00082-1.

WESTIN, Jason R. et al. Steroid-refractory acute GVHD: Predictors and outcomes. **Advances in Hematology**, [S. l.], 2011. DOI: 10.1155/2011/601953.

WU, Kunpeng et al. The gut microbial metabolite trimethylamine N-oxide aggravates GVHD by inducing M1 macrophage polarization in mice. **Blood**, [S. l.], 2020. DOI: 10.1182/BLOOD.2019003990.

XIA, Haoyang; LIU, Zhongzhong; LIANG, Wenjin; ZENG, Xianpeng; YANG, Yi; CHEN, Pu; ZHONG, Zibiao; YE, Qifa. Vagus Nerve Stimulation Alleviates Hepatic Ischemia and Reperfusion Injury by Regulating Glutathione Production and Transformation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], 2020. DOI: 10.1155/2020/1079129.

YAP, Jonathan Y. Y.; KEATCH, Charlotte; LAMBERT, Elisabeth; WOODS, Will; STODDART, Paul R.; KAMENEVA, Tatiana. **Critical Review of Transcutaneous Vagus Nerve Stimulation: Challenges for Translation to Clinical Practice** *Frontiers in Neuroscience*, 2020. DOI: 10.3389/fnins.2020.00284.

ZDANOWSKI, Robert; KRZYZOWSKA, Małgorzata; UJAZDOWSKA, Dominika; LEWICKA, Aneta; LEWICKI, Sławomir. **Role of $\alpha 7$ nicotinic receptor in the immune system and intracellular signaling pathways** *Central European Journal of Immunology*, 2015. DOI: 10.5114/ceji.2015.54602.

ZEISER, Robert. **Advances in understanding the pathogenesis of graft-versus-host disease** *British Journal of Haematology*, 2019. DOI: 10.1111/bjh.16190.

ZEISER, Robert; BLAZAR, Bruce R. **Acute graft-versus-host disease - Biologic process, prevention, and therapy** *New England Journal of Medicine*, 2017. DOI: 10.1056/NEJMra1609337.

ZHANG, Luyao; WU, Zhiyang; TONG, Zhihui; YAO, Qi; WANG, Ziyu; LI, Weiqin. Vagus Nerve Stimulation Decreases Pancreatitis Severity in Mice. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2020.595957.

ZHANG, Qianqian et al. Vagus nerve stimulation attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury via the Nrf2/HO-1 pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], 2019. DOI: 10.1155/2019/9549506.

ZHAO, Xueqiang et al. TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], 2012. DOI: 10.1172/JCI64115.

ZHENG, Wanwei et al. Acetylcholine ameliorates colitis by promoting IL-10 secretion of monocytic myeloid-derived suppressor cells through the nAChR/ERK pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], 2021. DOI: 10.1073/pnas.2017762118.

