

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

**PARTICIPAÇÃO DA VIA DE 5-LIPOXIGENASE NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA
DO ENXERTO-VERSUS-HOSPEDEIRO (GVHD) EM CAMUNDONGOS: NOVAS
POSSIBILIDADES TERAPÊUTICAS**

Belo Horizonte
2016

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

**PARTICIPAÇÃO DA VIA DE 5-LIPOXIGENASE NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA
DO ENXERTO-VERSUS-HOSPEDEIRO (GVHD) EM CAMUNDONGOS: NOVAS
POSSIBILIDADES TERAPÊUTICAS**

Barbara Maximino Rezende Gonçalves

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Pinho da Silva - *Professora Adjunto do Departamento de
Morfologia-ICB/UFMG*

Co-orientadora: Profa. Dra. Fabiana Simão Machado – *Professora Adjunto do Departamento de
Bioquímica e Imunologia – ICB/UFMG*

“É preciso força para sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê...”
Marcelo Camelo

*Dedico este trabalho aos meus pais, exemplos de vida.
Às minhas irmãs, minhas melhores amigas.*

Ao William, meu amor maior.

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar os meus passos e por ter me presenteado com uma família repleta de amor e cuidado, fundamental para que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais e irmãs por acreditarem no meu trabalho e me apoiarem incondicionalmente! É maravilhoso tê-los por perto sempre!

Ao meu marido pelo apoio emocional, carinho e cuidado de sempre e pela parceria de bancada e colaboração direta neste trabalho! É um prazer enorme poder discutir ciência com você!

À Vanessa por esses quase 10 anos de orientação! Obrigada por ter me ajudado a descobrir que fazer ciência é o que quero para o resto da vida, ainda que seja um caminho bem árduo em alguns momentos... fico feliz em perceber o quanto amadurecemos nesse tempo: eu, iniciação científica para quase doutora e você, professora e pesquisadora recém-concursada para membro da Academia Brasileira de Ciências! Quanto orgulho!

À Fabiana pela co-orientação e pelas conversas agradáveis também fora do ambiente de trabalho. Foi um prazer ter a oportunidade de conviver e aprender com você!

À Marina por me ensinar muito do que sei sobre as mais variadas técnicas de laboratório e pelo apoio intelectual de sempre!

A todos os meus amigos do nosso laboratório, o LARRI! Que nós sempre estejamos em busca de nos mantermos como um grupo de excelência! Agradeço especialmente à Pri, pela amizade e trabalho árduo na primeira fase deste trabalho e à Carol, Rayssa e Denise pela grande parceria e suporte experimental e emocional nessa fase final! A colaboração de todas vocês foi fundamental! Ao Albená, pela alegria contagiante! Você torna o dia-a-dia do laboratório mais divertido!

Ao Professor Mauro Martins Teixeira: Quando eu “crescer”, quero ser igual a você! Me impressiona até hoje tamanho conhecimento presente em uma única pessoa!

À professora Landa por guiar os meus primeiros passos na ciência, quando eu era ainda iniciação científica.

Ao LIMHO, e em especial ao Daniel Cisalpino pelos ensaios de PCR, ao Caio pelas fantásticas discussões científicas e à Prof. Dani pela receptividade de sempre!

Ao Laboratório de Imunofarmacologia, e em especial ao Prof. Flávio pela gestão dos animais KO e pela disposição em sempre me ajudar a discutir meus resultados e à Frank por contribuir de forma ímpar para a obtenção de meus dados de citometria de fluxo.

Ao Laboratório de Imunorregulação de Doenças Infecciosas, e em especial à Lisita pela amizade, pelas gargalhadas e pelos “ensinamentos” de FACS e à Fatinha pelo “help” no citômetro sempre que precisei!

Ao Prof. Thiago Cunha pelo suporte experimental e intelectual e à Gil, técnica de seu laboratório na USP de Ribeirão Preto pelas dosagens do leucotrieno B4.

À equipe do CDTN pelas irradiações dos camundongos.

Ao Pedro, ao Hermes e à Ilda pela gestão do biotério e à Ilma, pela gestão das compras do laboratório.

Aos agentes financiadores deste projeto: CAPES, FAPEMIG e CNPq.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Doença do enxerto-versus-hospedeiro (GVHD)	13
1.2 Estratégias terapêuticas para prevenção ou tratamento da GVHD.....	18
1.3 Reação do enxerto-versus-leucemia (GVL)	20
1.4 Mediadores lipídicos derivados da via de 5-lipoxigenase.....	20
1.5 Participação de LTB4 em doenças inflamatórias	22
1.6 Zileuton: Inibidor de 5-lipoxigenase	23
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral.....	24
2.2 Objetivos Específicos:	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Animais	25
3.2 Indução da doença do enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) aguda	25
3.3 Inibição farmacológica de 5-LO	27
3.4 Quantificação dos parâmetros histopatológicos da reação inflamatória ocasionada pela GVHD.....	27
3.4.1 Confeção de lâminas histológicas.....	27
3.4.2 Avaliação da graduação histopatológica.....	28
3.5 Análise do acúmulo de leucócitos por citometria de fluxo	29
3.5.1 Isolamento de células do baço e da medula óssea	29
3.5.2 Isolamento de células do jejuno-íleo.....	30
3.5.3 Isolamento de células do fígado	30
3.5.4 Marcação das células com anticorpos para leitura no citômetro	31
3.6 Quantificação do infiltrado de macrófagos no tecido pelo método de atividade da n-acetil-β- D-glicosaminidase (NAG)	32
3.7 Análise do recrutamento celular por microscopia intravital	32
3.8 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA.....	33
3.9 Extração e expressão de mRNA de 5-LO por Real Time PCR	33
3.10 Dosagem de leucotrieno B4.....	34
3.11 Avaliação dos parâmetros clínicos e sobrevivência	34
3.12 Análise da reconstituição da medula óssea por citometria de fluxo.....	36
3.13 Indução da reação do GVL.....	37
3.14 Análises estatísticas.....	37
4 RESULTADOS	38

4.1 Transplante de células deficientes em 5-LO reduz lesão intestinal e hepática em camundongos submetidos à GVHD.....	38
4.2 Transplante de células deficientes em 5-LO diminui o acúmulo de leucócitos em órgãos alvo da GVHD.....	40
4.2.1 Acúmulo de células no baço e na medula	40
4.2.2 Acúmulo de células no intestino e no fígado	44
4.3 Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO reduz a concentração de citocinas e quimiocinas em órgãos alvo da GVHD.....	50
4.4 Inibição farmacológica de 5-lipoxigenase com zileuton protege os órgãos alvo da GVHD	52
4.5 Tratamento com zileuton controla a resposta inflamatória associada à doença do enxerto-versus-hospedeiro	54
4.5.1 Acúmulo de leucócitos em órgãos linfoides.....	54
4.5.2 Acúmulo de leucócitos em órgãos alvo	54
4.5.3 Recrutamento e adesão de leucócitos em vênulas mesentéricas.....	55
4.5.4 Redução dos níveis de quimiocinas e citocinas em órgãos alvo da GVHD.....	58
4.6 Expressão de mRNA de 5-LO e produção de LTB4 em camundongos submetidos à GVHD.....	60
4.7 Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou tratamento com zileuton reduz os sinais clínicos e a mortalidade em camundongos submetidos à GVHD.....	64
4.8 Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou tratamento com zileuton controla a GVHD sem interferir na reconstituição da medula óssea	66
4.9 Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou tratamento com zileuton mantém a resposta benéfica do GVL.....	68
5. DISCUSSÃO.....	70
6. CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS	80
PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Patogênese da GVHD aguda.	17
Figura 2. Produção de LTB4 através da via da enzima 5-lipoxigenase.	21
Figura 3. Protocolo de indução da GVHD.	27
Figura 4. Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO diminui a lesão de órgãos alvo associada à GVHD no início da mortalidade.	39
Figura 5. Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO reduz o acúmulo de LT CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ em órgãos linfóides associados à GVHD.	41
Figura 6. Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO reduz o acúmulo de macrófagos em órgãos linfóides associados à GVHD.	42
Figura 7. Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou tratamento com zileuton reduz o acúmulo de LT CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ no jejuno-íleo.	45
Figura 8. Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou tratamento com zileuton reduz o acúmulo de macrófagos e mantém o número de células dendríticas e Treg no jejuno-íleo.	46
Figura 9. Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou tratamento com zileuton reduz o acúmulo de LT CD8 e macrófagos no fígado.	49
Figura 10. Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO reduz a concentração intestinal de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias envolvidas na GVHD.	51
Figura 11. Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO mantém o nível da citocina anti-inflamatória IL-10 semelhante ao grupo controle.	52
Figura 12. Tratamento com zileuton diminui a lesão de órgãos alvo da GVHD e reduz o acúmulo de macrófagos para o intestino e para o fígado de camundongos submetidos à doença.	53
Figura 13. Tratamento com zileuton diminui o rolamento e a adesão de leucócitos na microvasculatura mesentérica de camundongos submetidos à GVHD.	57
Figura 14. Tratamento com zileuton reduz quimiocinas intestinais e hepáticas em camundongos submetidos à GVHD.	58
Figura 15. Tratamento com zileuton reduz citocinas intestinais e hepáticas em camundongos submetidos à GVHD.	59
Figura 16. Expressão da enzima 5-LO e produção de LTB4 em camundongos submetidos à GVHD.	62
Figura 17. Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou tratamento com zileuton está associado à redução da mortalidade, controle da perda de peso corporal e melhora dos sinais clínicos da GVHD.	65
Figura 18. Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou tratamento com zileuton não altera a reconstituição de células doadas nos órgãos hematopoiéticos.	67
Figura 19. Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou tratamento com zileuton mantém a resposta benéfica do GVL.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Escala clínica.	36
Tabela 2: Perfil de leucócitos nos órgãos linfoides associados à GVHD.....	43
Tabela 3: Perfil de leucócitos no jejuno-íleo de camundongos submetidos à GVHD.....	47
Tabela 4: Perfil de leucócitos no fígado de camundongos submetidos à GVHD.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

APC: célula apresentadora de antígenos

ATB: antibiótico

ATG: globulina anti-timócito

CMC: carboximetilcelulose

Co60: cobalto 60

DAMPs: padrões moleculares associados a dano celular

FLAP: proteína ativadora de 5-lipoxigenase

GVHD: *Graft-versus-Host Disease* ou doença do enxerto-versus-hospedeiro

HLA: antígenos de histocompatibilidade principal

i.v: intravenoso

LMC: leucemia mieloide crônica

LPS: lipossacarídeos

LT: linfócito T

LTA4: leucotrieno A4

LTB4: leucotrieno B4

MTX: Metotrexato

MHC: complexo de histocompatibilidade maior

MiHag(minor histocompatibility antigen): antígenos de histocompatibilidade menor

NAG: n- acetilglicosaminidase

NK: células natural killer

PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos

PBS: phosphate buffer saline ou Tampão de salina fosfatado

PLA2: fosfolipase A2

ST2: supressor de tumorigenicidade 2

TC1: linfócito T citotóxico 1

TC17: linfócito T citotóxico 17

Th1: linfócito T helper 1

Th17: linfócito T helper 17

5-LO: 5-lipoxigenase

RESUMO

A doença do enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) ainda é a principal limitação do sucesso do transplante de medula óssea que é realizado para tratar doenças hematológicas malignas e não-malignas. A terapia imunossupressora utilizando corticoides é o tratamento padrão e de primeira escolha para evitar o desenvolvimento da GVHD. Entretanto, a toxicidade dos esteroides, a resposta limitada dessas drogas, os pacientes que desenvolvem GVHD refratária a esteroides e a interferência no efeito enxerto-versus-tumor são os grandes desafios dessas terapias. Dessa forma, o estudo de mecanismos de desencadeamento da doença e a proposta de novas estratégias terapêuticas são de extrema importância. O leucotrieno B₄ (LTB₄), produzido a partir do metabolismo do ácido araquidônico pela ação catalítica da 5-lipoxigenase (5-LO), é um mediador pró-inflamatório e está associado com o desenvolvimento de várias doenças inflamatórias, incluindo a GVHD intestinal em humanos. Entretanto, o papel de LTB₄ na fisiopatologia da GVHD permanece pouco compreendido. Neste trabalho, nós avaliamos a participação do eixo 5-LO/LTB₄ na fisiopatologia da GVHD por meio do transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou a inibição farmacológica da via pelo tratamento com zileuton, uma droga comumente utilizada para o tratamento de pacientes asmáticos. Para verificar a nossa hipótese de que 5-LO participa da GVHD, nós induzimos a doença pelo transplante de 1×10^7 células de medula óssea e 3×10^7 esplenócitos isolados de camundongos selvagens ou de camundongos deficientes em 5-LO para camundongos receptores B6D2F1. Camundongos que receberam células da medula óssea e esplenócitos de camundongos singênicos (B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram considerados o grupo controle. Para inibição farmacológica de 5-LO, a GVHD foi induzida e os camundongos receptores foram tratados com zileuton (30mg/kg, oralmente, de 12h/12h a partir do dia do transplante). Os camundongos foram monitorados a cada 2 dias para verificação da sobrevivência e sinais clínicos da GVHD. Em experimentos diferentes, o fígado, o intestino e os órgãos linfoides dos animais foram retirados e processados para análise histopatológica, quantificação de citocinas e quimiocinas e acúmulo de leucócitos. O recrutamento e a adesão de leucócitos foram avaliados por microscopia intravital nas vênulas mesentéricas. A expressão intestinal e hepática do mRNA de 5-LO também foi avaliada no início da mortalidade por PCR em tempo real. Os níveis de LTB₄ foram avaliados no sangue, no fígado e no intestino de camundongos submetidos à GVHD por ensaio imunoenzimático. Além disso, avaliamos a proporção de células H2^{B+} e H2^{B+2^{D+}} nos animais receptores e o fenômeno do enxerto-versus-leucemia (GVL) por citometria de fluxo. Embora não tenha sido observado um aumento na expressão do mRNA de 5-LO no jejuno-íleo e no fígado de camundongos submetidos à GVHD no início da mortalidade, o transplante de esplenócitos semi-alogênicos deficientes em 5-LO reduziu os níveis séricos e hepáticos de LTB₄ e a lesão no intestino e no fígado. Estes resultados foram associados à inibição de leucócitos pró-inflamatórios e à diminuição dos níveis de citocinas e quimiocinas. O tratamento com zileuton também reduziu os parâmetros inflamatórios associados à GVHD. Além disso, o transplante de células deficientes em 5-LO ou o tratamento com zileuton não interferiu na reconstituição da medula óssea e no efeito GVL e reduziu os sinais clínicos da doença, aumentando a taxa de sobrevivência nos animais submetidos à GVHD. Estes dados em conjunto, evidenciam a participação do eixo 5-LO/LTB₄ no desenvolvimento da doença do enxerto-versus-hospedeiro, sugerindo potencial aplicação terapêutica de zileuton para o tratamento da doença em pacientes submetidos ao transplante de medula óssea.

ABSTRACT

Unfortunately, graft-versus-host disease (GVHD) remains the major limitation of bone marrow transplant to treat patient with malignant and non-malignant hematological diseases. The first-line treatment for GVHD are steroids such as methylprednisolone or prednisone because of the broad anti-inflammatory and lymphocytotoxic effects of these drugs. However, steroid-refractory GVHD patients are at high risk of related complications from the disease or death and there is no standard treatment strategy for these patients. Thus, new therapies are necessary. The leukotriene B₄ (LTB₄) is a pro-inflammatory mediator produced from arachidonic acid metabolism by 5-lipoxygenase (5-LO) catalytic action and is associated with the development of various inflammatory diseases including intestinal GVHD in humans. However, the role of LTB₄ in the GVHD pathophysiology is incompletely understood. In this report we evaluated the participation of the 5-LO/LTB₄ axis in pathogenesis of GVHD by transplant of 5-LO deficient leukocytes and the effect of its pharmacological inhibition by zileuton, a drug usually employed to treat asthmatic patients. To test our hypothesis that 5-LO participates to GVHD, we induced the disease in mice by the transplant of 1×10^7 bone marrow cells plus 3×10^7 splenocytes from WT or 5LO^{-/-} mice to B6D2F1 mice. Mice that received syngeneic (B6D2F1) bone marrow cells and splenocytes not develop disease and were considered the control group. After transplant, intestinal and hepatic mRNA expression of 5-LO was evaluated by Real Time PCR. The levels of LTB₄ were evaluated in the blood, liver and intestine by enzymatic immune assay. To pharmacological inhibition of 5-LO, GVHD was induced and recipient mice treated by zileuton (30mg/kg, orally, 12h/12h). Mice were monitored every 2 days for survival and GVHD clinical signs. The liver and intestine were also subjected to histopathology analysis, ELISA, NAG and flow cytometry. The leukocytes recruitment and adhesion were assessed by intravital of mesenteric venules. The chimerism, the accumulation of inflammatory cells in the lymphoid organs and the GVL reaction were evaluated by FACS analysis in the spleen and bone marrow. Although we did not observe an increase of 5-LO mRNA in the jejunum ileum and liver in mice subjected to GVHD at onset mortality, the transplant of semi-allogenic 5-LO deficient splenocytes reduced the serum and hepatic level of LTB₄ and the intestinal and liver injury. These results were associated with inhibition of proinflammatory leukocytes and decreased levels of cytokines and chemokines. In addition, treatment with zileuton also effectively ameliorates the disease by reduction of liver and serum LTB₄ and diminution of the inflammatory response in the intestine and liver. Importantly, mice that received 5LO-deficient cells or zileuton-treated mice had prolonged survival and reduced GVHD clinical scores. Moreover, the transplant of 5LO^{-/-} leukocytes or zileuton-treated mice did not interfere in the chimerism or in the GVL response. Taken together, these data provide evidence that 5-LO/LTB₄ axis orchestrates the GVHD development, describing a potential therapeutic application of zileuton to GVHD treatment.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença do enxerto-versus-hospedeiro (GVHD)

O transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas é uma terapia comumente utilizada no tratamento de doenças hematológicas e não hematológicas, imunodeficiências e tumores sólidos, tais como leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfomas, mielomas múltiplos, câncer testicular, neuroblastoma, talassemia, entre outras (KRENGER, 1997; FERRARA et al., 2009; PASQUINI, 2010; QIAN et al., 2013). Contudo, o sucesso desta terapia é limitado por toxicidade associada ao transplante, que está relacionada ao regime de condicionamento pelo qual o paciente é submetido (radioterapia e/ou quimioterapia) e à resposta imunológica observada após o reconhecimento de aloantígenos do receptor por células T do doador, culminando no desenvolvimento da doença do enxerto-versus-hospedeiro ou *graft-versus-host disease* (GVHD).

A primeira descrição da GVHD foi realizada na década de 50, quando Dick van Bekkum, médico e pesquisador holandês, iniciou seus estudos que buscavam compreender os efeitos biológicos da irradiação corporal total, motivado pela morte de milhares de cidadãos que foram expostos à bomba de Hiroshima e Nagasaki e desenvolveram uma doença desconhecida chamada de "síndrome da radiação" (WILL; WYNN, 2006; VRIESENDORP; HEIDT, 2016). Na tentativa de estabelecer opções terapêuticas para indivíduos expostos a esta irradiação corporal total, van Bekkum e um grupo de pesquisadores iniciaram em 1956, experimentos de transplante de medula óssea em camundongos e compararam a sobrevivência dos camundongos que receberam apenas a irradiação corporal total com camundongos que receberam além da irradiação, o transplante de medula óssea isogênico ou alogênico. Camundongos que receberam apenas a irradiação morreram até o 20º dia após o procedimento devido à aplasia medular, também chamada de doença primária ou síndrome da medula óssea. Camundongos que receberam o transplante isogênico de medula sobreviveram. Já os camundongos que receberam o transplante alogênico morreram 20 dias após a irradiação, porém de uma síndrome denominada de síndrome secundária, uma vez que eles foram capazes de reconstituir o sistema hematopoiético mas desenvolveram falência de múltiplos órgãos e lesão grave na pele, no intestino, no fígado e nos tecidos linfoides. O termo doença secundária foi substituído pelo termo *graft-versus-host disease* ou doença do enxerto-versus-hospedeiro a partir de 1962 (van BEKKUM; de VRIES, 1967; van BEKKUM, 1985; VRIESENDORP; HEIDT, 2016). O primeiro transplante de medula óssea em humanos foi realizado na Sérvia, em 1958. No Brasil, o primeiro transplante de medula só foi realizado vinte e um anos mais tarde, em 1979 (VRIESENDORP; HEIDT, 2016). Desde então, a doença do enxerto-versus-hospedeiro

vem sendo estudada e novas estratégias terapêuticas estão sendo desenvolvidas para que o transplante de medula óssea ocorra sem complicações.

A GVHD é uma desordem imunológica observada em cerca de 40% a 60% dos pacientes que recebem transplante de medula óssea e causa alta morbidade, sendo responsável pela morte de 15 a 40% dos pacientes transplantados (FERRARA et al., 2009; PASQUINI, 2010; CHOI; REDDY, 2014; RAMADAN; PACZESNY, 2015). O risco para desenvolvimento da doença está relacionado a diferentes fatores, que incluem a compatibilidade e a diferença de sexo entre doador e receptor, a idade do paciente, o regime de condicionamento pré-transplante e a fonte de células doadas (FERRARA et al., 2009; PASQUINI, 2010; RAMADAN; PACZESNY, 2015). Dos fatores etiológicos relacionados ao doador e ao receptor, o mais importante é a diferença entre os antígenos de histocompatibilidade maior (HLA) e menor (miHag). Dessa forma, quanto maior for o grau de compatibilidade entre o doador e o receptor menor é o risco de desenvolver GVHD (FERRARA et al., 2005; FERRARA et al., 2007). A compatibilidade entre as moléculas apresentadoras de antígenos ou antígenos de histocompatibilidade (denominados MHC em camundongos ou HLA em humanos) do indivíduo doador e receptor é fundamental para redução do risco de desenvolver a doença. Entretanto, apenas um terço dos indivíduos que necessitam de transplante de medula possuem um irmão ou outro familiar doador compatível (BALLEN et al., 2012). Dessa forma, ainda que o doador apresente a maior similaridade antigênica possível com o receptor do transplante, a interação entre linfócitos T (LT) doados e células apresentadoras de antígeno (APCs) do receptor leva ao reconhecimento de disparidades antigênicas e isto ocasiona uma resposta inflamatória sistêmica em diferentes órgãos como a pele, o fígado e o intestino, sendo estes órgãos denominados como órgãos alvo da doença (BALL et al., 2008; GOKER et al., 2001; FERRARA et al., 2009; ROBB; HILL, 2012; VILLA et al., 2016). A diferença de sexo entre doador e receptor é também um fator relevante devido às diferenças entre o complexo de histocompatibilidade menor entre o homem e a mulher (FERRARA et al., 2005). A idade do receptor é outra variável que contribui para o aparecimento da doença. Quanto maior é a idade do indivíduo transplantado, maior é o risco de desenvolvimento da GVHD. Cerca de 20% dos indivíduos de até 20 anos submetidos ao transplante de medula óssea apresentam GVHD aguda e indivíduos com mais de 50 anos têm 80% de chance de desenvolvê-la (FERRARA et al., 2005; FERRARA et al., 2007; BLAZAR et al., 2012). Já o regime de condicionamento pré-transplante favorece a ocorrência de GVHD porque é o desencadeador de lesão nos órgãos alvo e promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias que desempenham papel importante na fisiopatologia da doença (JAKSCH; MATTSSON, 2005; MAPARA et al., 2006; KITTAN; HILDELBRANDT, 2010; BLAZAR et al., 2012). O uso de drogas imunossupressoras na profilaxia da GVHD, que consiste geralmente na administração endovenosa de ciclosporina A associada ou não ao metrotexato e à prednisona (drogas

imunossupressoras), no dia anterior ao transplante e mantida por até 3 meses, também tem influência no risco para o desenvolvimento da doença. A utilização de baixas doses destes imunossupressores associa-se à maior incidência da GVHD, porque permite o aparecimento de sintomas brandos da doença que podem progredir conseqüentemente para a sua forma grave (BLAZAR et al., 2012). Em relação à fonte do enxerto hematopoiético, células derivadas do cordão umbilical, que são imaturas e menos funcionais, estão associadas a um menor desenvolvimento da GVHD em comparação a células tronco do sangue (FERRARA et al., 2005; BLAZAR et al., 2012).

Quanto ao período de aparecimento da doença, a GVHD pode ser classificada em crônica e aguda (WILL; WYNN, 2006; FERRARA et al., 2007). A GVHD crônica ocorre após cem dias do transplante e é semelhante a uma doença auto-imune, com produção de auto-anticorpos e alteração da atividade de linfócitos B e T reguladores. Ela é caracterizada por fibrose e atrofia dos órgãos alvo, podendo afetar também os pulmões (SHLOMCHIK, 2007; JAMIL; MINEISHI, 2015). Já a GVHD aguda ocorre até cem dias após o transplante, sendo mais comum a sua ocorrência no período de duas a seis semanas após o transplante e caracteriza-se por morte de células epiteliais do trato gastrointestinal, da pele e do fígado. As lesões nestes órgãos trazem manifestações clínicas como exantema, diarreia, icterícia e hemorragia do trato gastrointestinal (WILL; WYNN, 2006, FERRARA et al., 2007; SHLOMCHIK, 2007).

Com relação à resposta imunológica, a GVHD aguda pode ser dividida em três diferentes fases. Na fase inicial, o regime de condicionamento, realizado através da quimioterapia e/ou radioterapia com o objetivo de imunossuprimir o receptor, eliminar células tumorais e evitar a rejeição do enxerto, causa destruição tecidual e ativação de células apresentadoras de antígeno (MAPARA et al., 2006). Uma vez ativadas, estas células aumentam a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade maior e moléculas co-estimulatórias, potencializando a sua função imunológica (SERODY et al., 2000; JAKSCH; MATTSSON, 2005, FERRARA et al., 2009; BLAZAR et al., 2012). Células do sistema imune inato são também ativadas devido à translocação de bactérias a partir do intestino lesado e reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), padrões moleculares associados a dano celular (DAMPs) e, também, por quimiocinas, o que contribui para um maior dano tecidual e grande liberação de citocinas, caracterizando a primeira fase da doença (HILL et al., 1997; COOKE et al., 2001; MURAI et al., 2003; BLAZAR et al., 2012; RAMADAN; PACZESNY, 2015). A segunda fase da GVHD ou fase de ativação inicia-se quando ocorre a interação das células T doadas com as células apresentadoras de antígenos (APCs) do hospedeiro, promovendo uma liberação ainda maior de citocinas que intensificam a apresentação de antígenos e levam à ativação e diferenciação das células T em células T citotóxicas efectoras (JAKSCH; MATTSSON, 2005; BLAZAR et al., 2012;

RAMADAN; PACZESNY, 2015). Na fase final, conhecida como fase efetora, estas células T ativadas utilizam de mecanismos mediados por perforinas, granzimas e FasL (moléculas indutoras de apoptose) e liberam uma grande quantidade de mediadores inflamatórios que agem principalmente no recrutamento de leucócitos para os órgãos alvo. A inflamação exacerbada causada por estes mediadores pode levar o paciente à morte caso não sejam utilizadas terapias eficazes de controle dessa resposta inflamatória (SERODY et al., 2000; WYSOCKI et al., 2005; BLAZAR et al., 2012; RAMADAN; PACZESNY, 2015). A GVHD é caracterizada ainda por um desequilíbrio entre células T efectoras e células T regulatórias (T regs). Em todas as fases da doença, a cascata inflamatória e os diferentes tipos de lesão tecidual levam à liberação de biomarcadores da GVHD que podem ser detectados por testes sanguíneos. A elafin, por exemplo, é um biomarcador específico para GVHD de pele, REG3 α , para GVHD intestinal e o supressor de tumorigenicidade 2 (ST2), que é um membro da família de receptores IL-1 e ligante de IL-33, pode indicar um quadro de GVHD refratária à terapia com corticosteroides (Figura 1) (RAMADAN; PACZESNY, 2015).

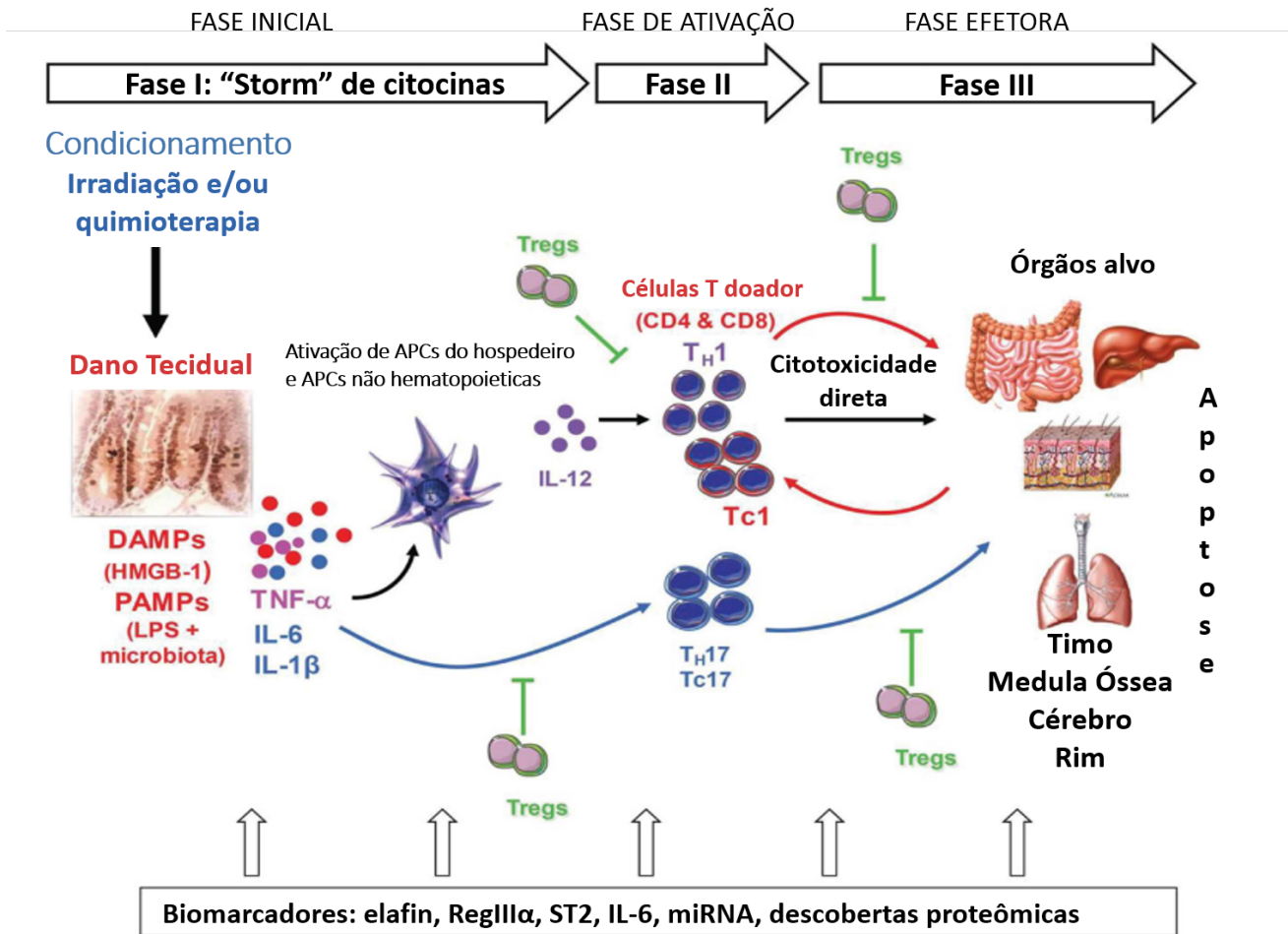


Figura 1. Patogênese da GVHD aguda. Diferentes fases da doença do enxerto-versus-hospedeiro podem ser observadas. Na primeira fase, o regime de condicionamento, realizado através de radiação e/ou quimioterapia causa lesão tecidual inicial. Tecidos lesados e células inflamatórias liberam DAMPs e PAMPs da microbiota intestinal, bem como citocinas inflamatórias que contribuem para o "storm" de citocinas. Isto leva à segunda fase da doença, caracterizada por ativação de APCs do hospedeiro, as quais ativam e polarizam células T do doador em T helper 1 (Th1) e T helper 17 (Th17) (através de células T CD4) e em T citotóxico 1 (TC1) e T citotóxico 17 (TC17) (através de células T CD8). Na terceira fase da doença, células T patogênicas ativadas migram para os órgãos alvo (trato gastrointestinal, fígado, pele) e amplificam a destruição tecidual local. A presença de células Treg contribui para a redução da gravidade da GVHD através da inibição da ativação e/ou expansão de células patogênicas, tanto na fase inicial, quanto na fase tardia da doença. Muitos DAMPs e PAMPs como elafin (específica de pele), REG3 α (específica de intestino) e ST2 têm sido considerados biomarcadores séricos da GVHD (modificada de RAMADAN; PACZESNY, 2015).

Embora existam diferenças entre a GVHD em humanos e a GVHD experimental, modelos da doença em animais vêm sendo utilizados desde a década de 70 e são úteis para o entendimento dos mecanismos envolvidos na reação inflamatória associada à doença e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o seu controle (HOWARD; WOODRUFF, 1961; van BEKKUM; de VRIES, 1967; van BEKKUM, 1985; VRIESENDORP; HEIDT, 2016). Um dos modelos animais propostos para o estudo da GVHD consiste no transplante de esplenócitos e células de medula óssea do camundongo SV129 H-2^b ou C57BL/6 H-2^b para o camundongo híbrido F1 do cruzamento da linhagem C57Bl/6J e BDA/2 (B6D2F1 H-2^{bxd}) previamente irradiado com 9 Gy de irradiação gama e este foi o modelo experimental de GVHD aguda murino utilizado neste trabalho.

1.2 Estratégias terapêuticas para prevenção ou tratamento da GVHD

Apesar dos avanços na compreensão da fisiopatologia da GVHD aguda e do desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas, corticosteroides, como metilprednisolona ou prednisona, associados a inibidores de calcinerina (ciclosporina A ou tacrolimus) permanecem como a primeira linha de tratamento da GVHD, uma vez que têm amplos efeitos anti-inflamatórios e linfocitotóxicos (WESTIN et al., 2011; MARTIN et al., 2012; HOLTAN; MACMILLAN, 2016; JAMIL; MINEISHI, 2015). Metotrexato (MTX) é outra droga citotóxica muito utilizada em combinação com ciclosporina na profilaxia da GVHD. Em baixas doses possui efeito anti-inflamatório por reduzir a ativação de células T. Por outro lado, em altas doses, apresenta efeitos adversos comuns que incluem toxicidade hematopoiética, renal, hepática e da mucosa gastrointestinal (CHOI; REDDY, 2014). Outra terapia profilática consiste no uso de mofetil micofenolato que inibe a atividade de células T e pode ser utilizado em combinação com inibidores de calcinerina para profilaxia da GVHD após transplantes não miceloablativos ou de cordão umbilical. Apesar de permanecerem como a primeira linha de tratamento da GVHD, estas drogas tem sido relatadas como capazes de interromper a lesão de órgãos alvo e os sintomas da doença em apenas 50% dos pacientes (CHOI; REDDY, 2014). Além disso, o tratamento com esteroides, principalmente em altas doses, leva ao aumento considerável de efeitos adversos, incluindo imunossupressão, hiperglicemia, osteopenia, miopatia e insuficiência renal (MARTIN et al., 2012; JAMIL; MINEISHI, 2015). Os pacientes que não respondem a esta terapia desenvolvem GVHD refratária a esteroides, responsável pela morte de 80% destes pacientes ou ainda podem desenvolver GVHD crônica mais tardiamente (HOLTAN; MACMILLAN, 2015; JAMIL; MINEISHI, 2015). O critério para diagnóstico da GVHD aguda refratária a esteroides ainda não é bem definido. Em geral, a segunda linha de tratamento para a doença deve ser considerada se altas doses de esteroides não forem capazes de reduzir o dano em pelo menos um órgão alvo em até 3 dias de terapia ou se nenhuma

resposta for observada entre o 5^o e 14^o dia após o início do tratamento (JAMIL; MINEISHI, 2015). A decisão de adicionar uma segunda linha de tratamento deve ser rápida para pacientes com GVHD grave ou para aqueles que não toleram o tratamento com altas doses de esteroides (JAMIL; MINEISHI, 2015).

Diferentes alvos terapêuticos têm sido utilizados nas terapias de segunda linha, incluindo drogas que depletam células T ou inibem a sua ativação, tais como globulina anti-timócito (ATG), anticorpos anti-CD52 (alemtuzumab), iCasp9 (inserção de gene alterado nos linfócitos T doados, provocando a sua apoptose), abatacept, sirolimus e pentostatina; aquelas que mantêm a população de linfócitos T regulatórios (ciclofosfamida) ou promovem a depleção de células B (rituximab) (CHOI; REDDY, 2014; JAMIL; MINEISHI, 2015). São utilizados ainda antagonistas de receptores de quimiocinas (maraviroc, um antagonista de CCR5); agentes anti-TNF- α (etanercept, um receptor solúvel dimérico de TNF- α que compete com receptores celulares pela ligação ao TNF ou infliximab, um anticorpo monoclonal que se liga diretamente ao TNF- α); anticorpos anti-receptor de IL-2 (daclizumab e basiliximab) e novas moléculas regulatórias tais como atorvastatina (reduz a atividade de linfócitos T e APCs, expande T reg e polariza a resposta para o padrão Th2) e bortezomib (bloqueia a ativação de NF-kappa B, o que resulta no bloqueio da ativação, proliferação e sobrevivência de LT (WOLF et al., 2012; CHOI; REDDY, 2014; JAMIL; MINEISHI, 2015).

Ainda não existem critérios e indicações sistemáticas para a escolha do agente terapêutico secundário mais adequado no tratamento da GVHD. Os estudos disponíveis sobre a eficácia de agentes individuais utilizados como segunda linha de tratamento para a doença são poucos e contraditórios e nenhum mostra benefícios comprovados a longo prazo, impossibilitando a escolha de apenas um fármaco para uso em pacientes com GVHD refratária a esteroides (DIGNAN et al., 2012; MARTIN et al., 2012; JAMIL; MINEISHI, 2015). A maior parte destas opções terapêuticas induz benefícios clínicos apenas a uma proporção limitada de pacientes (WESTIN et al., 2011). Além disso, os agentes terapêuticos de segunda linha também não estão isentos de efeitos adversos e podem causar citopenia, nefrotoxicidade, edema, hepatotoxicidade, anafilaxia, hiperlipidemia, infecções fúngicas repetidas e não se sabe até o momento, se estas terapias podem atenuar o efeito do enxerto-versus-leucemia (MARTIN et al., 2012; BLAZAR et al., 2012; CHOI; REDDY, 2014; JAMIL; MINEISHI, 2015).

1.3 Reação do enxerto-versus-leucemia (GVL)

Apesar dos avanços nos últimos anos em relação à profilaxia ou controle da GVHD, são necessárias terapias mais efetivas que assegurem não apenas o controle e manejo da doença do enxerto-versus-hospedeiro, mas também a manutenção ou ainda, a melhora do efeito do enxerto-versus-leucemia (GVL). O GVL ocorre a partir da ativação de células T do doador, que culmina na eliminação de células tumorais remanescentes da quimioterapia ou radioterapia, ocasionando uma resposta benéfica e essencial para cura da doença primária que levou o indivíduo à necessidade de receber o transplante de medula (WEIDEN et al., 1979; HOROWITZ et al., 1990; JOHNSON et al., 1996; LI et al., 2009). Uma vez que os linfócitos T doados apresentam funções tanto no desencadeamento da GVHD quanto na efetividade em eliminar as células tumorais remanescentes, torna-se complexo modular a resposta inflamatória prejudicial da doença do enxerto-versus-hospedeiro de tal forma que não interfira na resposta benéfica do enxerto-versus-leucemia.

Desde a década de 80, modelos animais têm sido propostos para entender melhor esta resposta. Nestes modelos é realizada uma injeção de células tumorais no mesmo dia do transplante de esplenócitos e/ou células da medula, mimetizando o que ocorre em humanos (KRIJANOVSKI et al., 1999; TESHIMA et al., 1999; COOKE et al., 2001; CASTOR et al., 2012; REZENDE et al., 2013; BERNARDES et al., 2015). Em nosso trabalho, o efeito GVL é estudado a partir da indução da GVHD em camundongos por meio do transplante de medula óssea e baço, associada à injeção de células tumorais derivadas de mastocitoma (P815 H2^d).

1.4 Mediadores lipídicos derivados da via de 5-lipoxigenase

Lipídeos presentes na membrana celular são uma importante fonte para a produção de mediadores que estão envolvidos na homeostase do organismo, os quais atuam em funções fisiológicas e também em processos inflamatórios (SHIMIZU, 2009). Dentre os diferentes mediadores lipídicos que participam da resposta inflamatória, tem-se os eicosanoides, moléculas derivadas de ácidos graxos dos fosfolipídeos de membrana celulares e que podem ser classificados como prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas. A biossíntese desses eicosanoides acontece a partir de estímulos químicos ou mecânicos que induzem a ativação da enzima fosfolipase A2 (PLA₂), responsável pela hidrólise do ácido araquidônico ligado à membrana celular. Uma vez liberado, o ácido araquidônico é metabolizado no citoplasma em produtos oxigenados através da ação de enzimas específicas, como as

cicloxygenases ou lipoxigenases (JAMPILEK et al., 2006; SHIMIZU, 2009). Dentre as diferentes lipoxigenases, a 5-lipoxigenase (5-LO) tem sido explorada em diferentes estudos, uma vez que a ativação da via desta enzima dá origem aos leucotrienos, mediadores pró-inflamatórios que participam do desenvolvimento e da progressão de diversas doenças inflamatórias. A produção de leucotrienos pela 5-LO é dependente da ativação da enzima por uma outra enzima específica, conhecida como FLAP (Five-Lipoxigenase Activating Protein ou proteína ativadora de 5-LO). Após ativada, 5-LO acrescenta um átomo de oxigênio ao ácido araquidônico na posição do carbono 5 e forma o composto 5-HPETE, o qual também sofre ação da 5-LO, originando o intermediário instável leucotrieno A4 (LTA4). O LTA4 pode, a partir desse momento, sofrer reações diferentes, dando origem a compostos variados. Essa variação acontece de acordo com o tipo celular e estímulo envolvidos. Através da ação da enzima LTA4 hidrolase, por exemplo, ocorre a hidrólise do LTA4, originando o leucotrieno B4 (LTB4) que é transportado para o meio extracelular (PETERS-GOLDEN; HENDERSON, 2007).

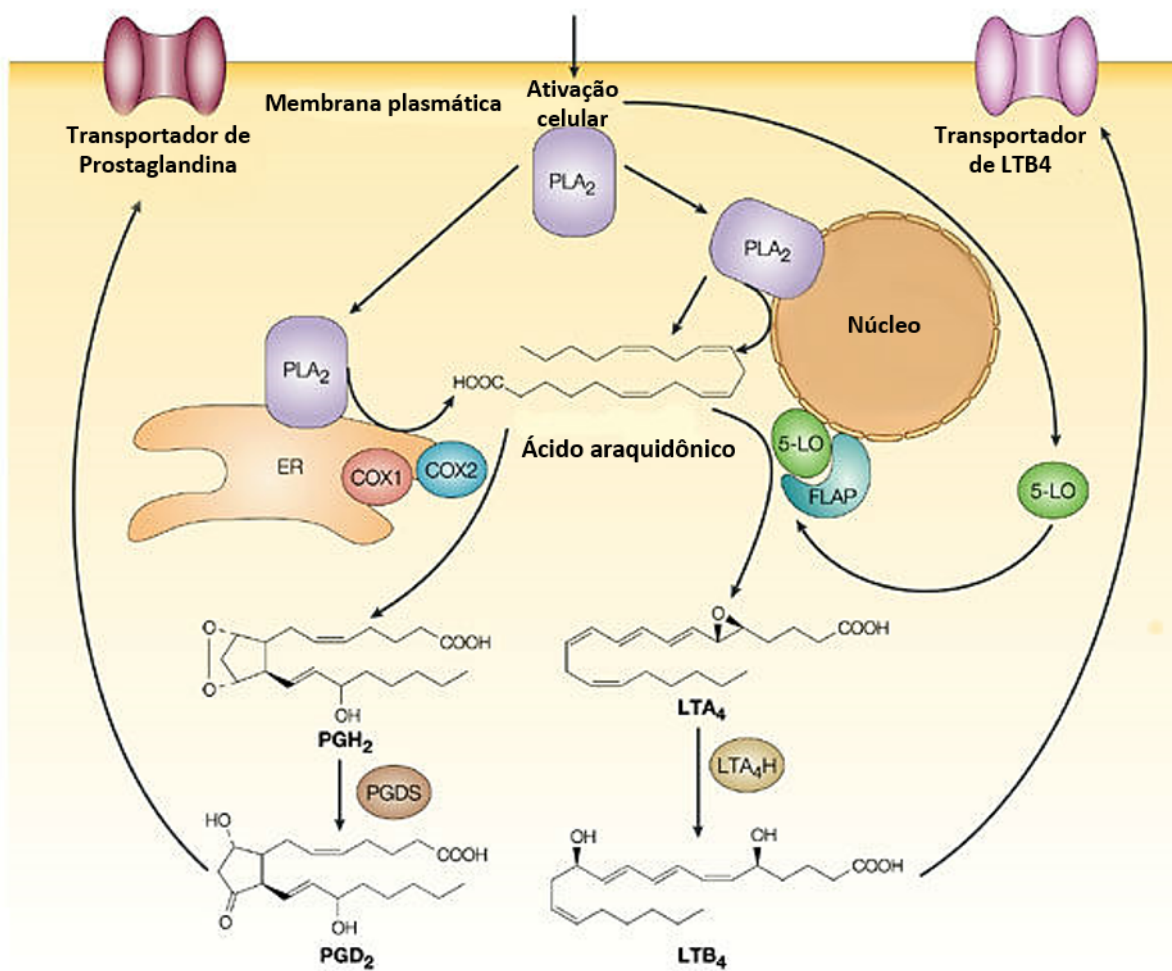


Figura 2. Produção de LTB4 através da via da enzima 5-lipoxigenase. Para a produção de LTB4, a enzima 5-LO é ativada por outra enzima denominada FLAP. Após ativação, a enzima 5-LO oxigena o ácido araquidônico convertendo-o num composto instável 5-HPETE que por sua vez, sofre mais uma ação da enzima 5-lipoxigenase e é convertido em LTA4. Este composto quando é hidrolisado pela enzima LTA4 hidrolase origina finalmente o LTB4 (Modificado de LUSTER; TAGER, 2004).

1.5 Participação de LTB4 em doenças inflamatórias

O LTB4 é considerado uma molécula de grande importância em respostas inflamatórias por apresentar ação direta no recrutamento, degranulação e adesão de leucócitos em células endoteliais (FORD-HUTCHINSON et al., 1980). Ele é produzido predominantemente por células inflamatórias, incluindo mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos/macrófagos, linfócitos B, células dendríticas e linfócitos T (FUNK, 2001). Dois tipos de receptores distintos foram identificados para o LTB4: BLT1 e BLT2, ambos acoplados à proteína G. A interação de leucotrieno B4 com o receptor BLT1, pelo qual tem maior afinidade, induz um aumento na produção de citocinas, fagocitose, estimula funções efetoras antimicrobianas, aumenta a expressão de moléculas de adesão, estimula o recrutamento e inibe a apoptose de células inflamatórias (TONNESEN et al., 1989; HEBERT et al., 1996; FILGUEIRAS, SEREZANI; JANCAR, 2015). O LTB4 está envolvido na patogênese de várias doenças, incluindo pancreatite neurogênica (SHAHID et al., 2015), hipertensão arterial (QIAN et al., 2015), desordens metabólicas (FILGUEIRAS, SEREZANI; JANCAR, 2015), lesão miocárdica por isquemia e reperfusão (de HOOG et al., 2015), aterosclerose (KETELHUTH et al., 2015), artrite (KIM et al., 2006; CHEN et al., 2006), gota (AMARAL et al., 2012) e polipose intestinal (GOUNARIS et al., 2015). Takatsuka et al. (2000) demonstraram ainda uma relação entre níveis aumentados de LTB4 no regime de condicionamento pré-transplante de medula óssea e o desenvolvimento de GVHD intestinal. Pacientes submetidos ao transplante de medula óssea que apresentaram altos níveis de LTB4 na fase de pré-condicionamento desenvolveram GVHD e evoluíram com lesão intestinal grave. Os altos níveis de LTB4 foram associados ao aumento de IL-2 e IFN- γ na fase inicial da doença e IFN- γ e TNF- α na fase mais tardia. Essas citocinas estão diretamente associadas à indução e exacerbação da lesão intestinal grave. Evidências clínicas e experimentais sugerem que a lesão do trato gastrointestinal é o principal fator relacionado à fisiopatologia da GVHD, e contribui para amplificação da doença a nível sistêmico, podendo culminar na morte do paciente (HILL; FERRARA, 2000). Apesar disso, o papel de LTB4 na fisiopatologia da GVHD permanece pouco esclarecido. Nesse contexto, compreender a participação da via da 5-lipoxigenase no desencadeamento e na progressão da doença do enxerto-versus-hospedeiro torna-se relevante e pode contribuir para o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas capazes de prevenir a morbi-mortalidade associada à doença.

1.6 Zileuton: Inibidor de 5-lipoxigenase

Zileuton (*N*-(1-benzo-[b]-thien-2-ylethyl)-*N*-hydroxyurea) ou A-64077 é o único inibidor da enzima 5-lipoxigenase disponível e liberado para uso clínico em humanos. Administrado por via oral, esta droga foi introduzida no mercado farmacêutico para tratamentos de pacientes asmáticos em 1996 e inibe a enzima 5-LO porque é um substrato análogo da enzima, se ligando ao átomo de ferro presente no sítio catalítico de 5-LO. Derivado do ácido hidroxâmico, esta droga possui um peso molecular de 236,3 kDa e atua de forma seletiva na 5-LO, inibindo a produção de leucotrieno E4 e B4 (BELL et al., 1992; WENZEL; KAMADA, 1996; STEINHILBER; HOFMANN, 2014). Uma vez que zileuton não interfere na atividade das enzimas cicloxigenases, não inibe a produção de tromboxano B2. Uma única dose de 800 mg reduz 80% da biossíntese de LTB4 (BELL et al., 1992). A meia-vida de zileuton é de cerca de 2,5 horas e o metabolismo da droga é hepático, por meio das enzimas do citocromo P450. A eliminação de zileuton ocorre principalmente na urina, mas pequenas concentrações podem ser encontradas nas fezes. Dispepsia e elevação moderada de alanina aminotransferase são efeitos adversos raros, observados em apenas 6,1% e 2,3% dos indivíduos que fazem uso do medicamento, respectivamente (BELL et al., 1992; WENZEL; KAMADA, 1996; STEINHILBER; HOFMANN, 2014).

Atualmente, existem duas formulações de zileuton disponíveis no mercado, denominadas ZYFLO (primeira formulação lançada, com meia-vida curta e necessidade de ser administrada 4 vezes ao dia) e ZYFLO CR (formulação de liberação prolongada, é administrada 2 vezes ao dia), ambas de 600 mg/comprimido. Em 2008, comprimidos de 300 mg também começaram a ser produzidos.

Seus efeitos benéficos no tratamento de pacientes asmáticos já está bem descrito e inclui redução do broncoespasmo e da resposta inflamatória e melhora na hiperresponsividade das vias aéreas (BELL et al., 1992; WENZEL; KAMADA, 1996; BERGER; DE CHANDT; CAIRNS, 2007; MASTALERZ; KUMIK, 2010). Alguns outros testes clínicos em humanos também mostraram que zileuton contribui para a redução da resposta inflamatória observada no lúpus eritematoso sistêmico (HACKSSHAW et al., 1995), melhora os sintomas da artrite (WEINBLATT et al., 1992) e reduz os sintomas e a graduação histológica na doença inflamatória intestinal (RASK-MADSEN et al., 1992).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a participação da via metabólica envolvendo a 5-lipoxigenase no desencadeamento e na progressão da GVHD.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar os aspectos histopatológicos no intestino e no fígado de camundongos submetidos à GVHD após o transplante de células selvagens ou deficientes em 5-LO e em animais transplantados com células selvagens e tratados com zileuton;
2. Avaliar o acúmulo de células inflamatórias em órgãos linfoides e órgãos alvo de camundongos submetidos à GVHD após o transplante de células selvagens ou deficientes em 5-LO e em animais transplantados com células selvagens e tratados com zileuton;
3. Avaliar o perfil de citocinas e quimiocinas no intestino e no fígado de camundongos submetidos à GVHD após o transplante de células selvagens ou deficientes em 5-LO e em animais transplantados com células selvagens e tratados com zileuton;
4. Avaliar o rolamento e a adesão de leucócitos nas vênulas mesentéricas de camundongos transplantados com células selvagens e tratados com zileuton;
5. Avaliar a presença da enzima 5-lipoxigenase através do ensaio de Real Time-PCR no intestino e no fígado de animais submetidos à GVHD;
6. Avaliar os níveis séricos, intestinais e hepáticos de LTB₄ nos camundongos submetidos à GVHD após o transplante de células selvagens ou deficientes em 5-LO e em animais transplantados com células selvagens e tratados com zileuton;
7. Avaliar a sobrevivência e a evolução dos aspectos clínicos de camundongos submetidos à GVHD após o transplante de células selvagens ou deficientes em 5-LO e em animais transplantados com células selvagens e tratados com zileuton;
8. Avaliar a reconstituição da medula óssea após o transplante de células selvagens ou deficientes em 5-LO e em animais transplantados com células selvagens e tratados com zileuton.
9. Avaliar a resposta do enxerto-versus-leucemia em camundongos submetidos à GVHD após o transplante de células selvagens ou deficientes em 5-LO e em animais transplantados com células selvagens e tratados com zileuton.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados como camundongos doadores, animais da linhagem C57Bl/6 e SV129 deficientes ou não na enzima 5-lipoxigenase e como camundongos receptores, foram utilizados animais da linhagem B6D2F1, machos, com oito a doze semanas de vida. Os animais SV129 WT e SV129 5LO KO foram fornecidos pelo grupo de pesquisa Imunofarmacologia-ICB-UFMG e animais C57Bl/6 e B6D2F1 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: 135/13. Ressalta-se que no final dos procedimentos experimentais, os camundongos restantes (que não morreram em decorrência da GVHD) também foram sacrificados com uma overdose de anestésico (mistura de 37,5 mg/ml de quetamina e de 2.5 mg/ml de xilazina). Em todos os ensaios os devidos cuidados foram tomados para minimizar o sofrimento dos camundongos.

3.2 Indução da doença do enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) aguda

Os camundongos receptores, B6D2F1, foram irradiados letalmente com 9Gy de radiação gama, divididos em duas doses de 4,5 Gy com intervalo de duas horas, utilizando fonte de ^{60}Co , no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN) da UFMG. No mesmo dia da irradiação os camundongos receberam 3×10^7 esplenócitos e 1×10^7 células da medula óssea do fêmur e da tíbia isoladas de camundongos doadores parentais deficientes ou não para a enzima 5-lipoxigenase, intravenosamente (i.v). O grupo controle do transplante foi constituído de camundongos B6D2F1 que receberam células de camundongos também B6D2F1, 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 e tibial. 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. Posteriormente, as células foram colocadas em um tubo Falcon e decantadas por 3 minutos para retirada dos grumos. O macerado de células foi centrifugado a 350 g por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado 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 1:200. Esta contagem foi realizada para analisar a viabilidade e o número das

células que foram injetadas no receptor. Para isolamento das células da medula femoral e tibial, ambos os fêmures e tíbias de cada camundongo foram retirados e suas cabeças cortadas com lâmina de bisturi, possibilitando a inserção de uma agulha 13 x 0,38 mm para lavagem da medula com 3 ml de meio RPMI incompleto gelado. Posteriormente, o líquido obtido do lavado contendo as células foi colocado em um tubo Falcon e centrifugado a 350 g por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 10 mL de meio RPMI incompleto para a contagem do número de células em câmara de Neubauer, como citado anteriormente. Um total de 3×10^7 esplenócitos + 1×10^7 células da medula óssea foram injetadas intravenosamente (i.v) nos camundongos receptores B6D2F1. Todos os grupos experimentais receberam tratamento com antibiótico (ATB) ciprofloxacino diluído em água filtrada (70mg de ATB 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.

3.3 Inibição farmacológica de 5-LO

O tratamento com zileuton, inibidor de 5-LO, foi feito utilizando a dose de 30mg/kg em 100µl de carboximetilcelulose (CMC) a 0,1% por via oral, de 12 em 12 horas. O tratamento foi iniciado no dia do transplante e interrompido no 10º dia após o transplante.

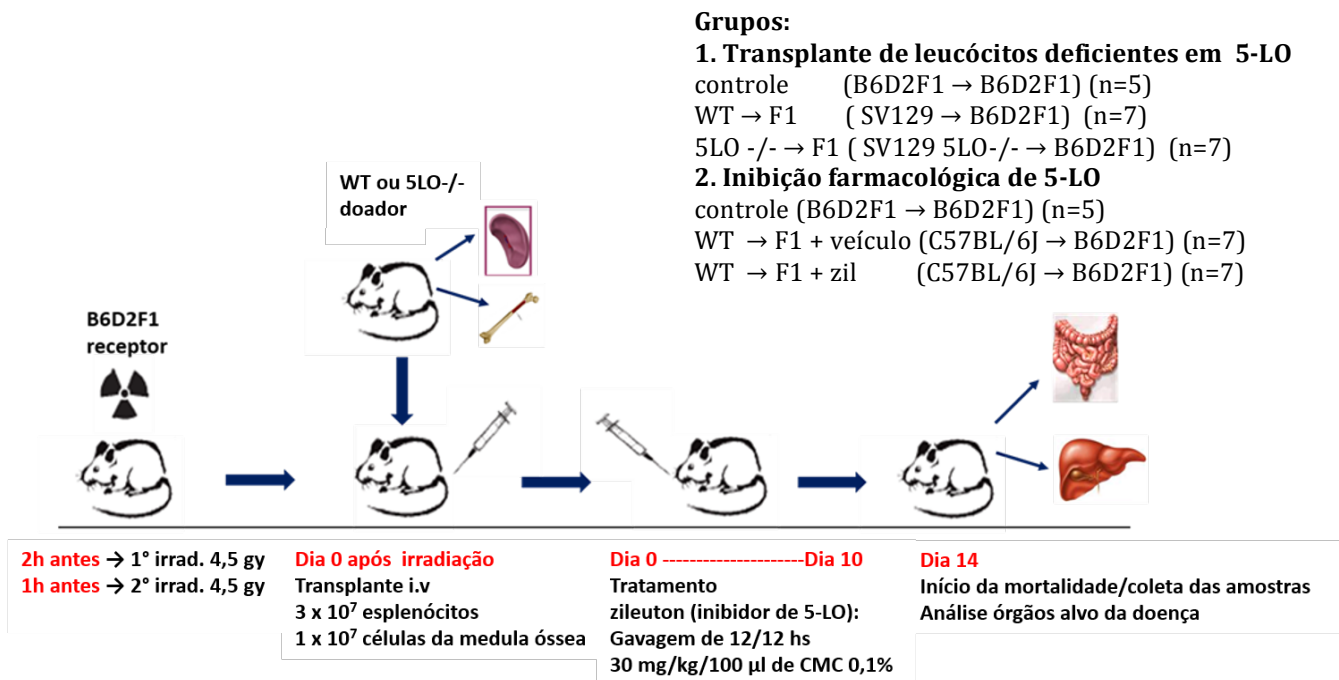


Figura 3. Protocolo de indução da GVHD. Camundongos da linhagem B6D2F1 foram irradiados com 9 gy de irradiação 2 horas antes do transplante. Foram transplantadas por injeção intravenosa, 3x10⁷ esplenócitos adicionados de 1x10⁷ células da medula óssea isoladas de camundongos selvagens ou deficientes em 5-LO. Os animais tratados com zileuton receberam a droga por gavagem, de 12 em 12 horas, durante 10 dias. Para análise dos dados, amostras do intestino e do fígado foram coletadas no início da mortalidade associada à GVHD.

3.4 Quantificação dos parâmetros histopatológicos da reação inflamatória ocasionada pela GVHD

3.4.1 Confeção de lâminas histológicas

Porções do intestino delgado (jejuno e íleo) e do fígado foram retiradas dos camundongos dos grupos estudados, 10 e 20 dias após o transplante. Os intestinos foram retirados inteiros, lavados com PBS, estendidos em papel filtro, 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 (10% 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 subseqüentes 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 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 fígado foi também retirado, armazenado em formol tamponado (10% em PBS) e foram confeccionadas lâminas histológicas conforme acima descrito.

3.4.2 Avaliação da graduação histopatológica

As camadas do epitélio, da lâmina própria, da muscular e da serosa da porção jejuno-íleo dos intestinos e o fígado foram analisadas ao microscópio óptico Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) utilizando-se objetivas de 10x e 20x. A quantificação dos parâmetros histopatológicos da reação ocasionada pela GVHD e demais intervenções foi realizada de acordo com uma adaptação de critérios utilizados por vários autores (THIELE et al., 1989; HILL et al., 1997; COLSON et al., 2004; REZENDE et al., 2013; BERNARDES et al., 2015). 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 (Figura 6). 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.

3.5 Análise do acúmulo de leucócitos por citometria de fluxo

3.5.1 Isolamento de células do baço e da medula óssea

Os animais dos diferentes grupos experimentais foram sacrificados por deslocamento cervical e o baço, os fêmures e as tíbias foram retirados. O baço foi pesado e macerado em *cell strainer* em uma solução de meio RMPI enriquecido com SFB a 10%. As células da medula óssea dos ossos coletados foram isoladas conforme descrito no item 3.2. Após a maceração do baço e obtenção do lavado de medula óssea, o líquido obtido do isolamento das células nestes órgãos foi centrifugado a 350 g por 5

minutos na temperatura de 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e para lise de hemácias foram acrescentados 2 mL de ACK sobre o *pellet* que permaneceu 4 minutos nesta solução a 4°C. Em seguida, foi adicionado 8 mL de meio RPMI+SFB 10%, centrifugado a 350 g por 5 minutos a 4°C, descartado o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de meio RPMI+SFB a 10% para contagem na câmara de Neubauer com o corante Turk na diluição de 1:10.

3.5.2 Isolamento de células do jejuno-íleo

Os animais dos diferentes grupos experimentais foram sacrificados por deslocamento cervical e o jejuno-íleo foi retirado e lavado com PBS1x. Em seguida, o órgão foi cortado em pequenos pedaços e colocado em um tubo falcon com 20mL de solução contendo PBS+5mM EDTA+ HEPES 10mM por 20 minutos em temperatura ambiente no *shake*. O tubo foi posteriormente centrifugado a 350 g por 5 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 10 mL de meio RPMI + SFB a 10%. Foi realizada outra centrifugação de 350 g por 5 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi ressuspensionado em 500 uL de uma solução a 9 mg de colagenase IV/mL de meio RPMI e o volume foi completado com 9,5 mL de meio RPMI. Os tubos contendo os pedaços de jejuno-íleo embebidos nesta solução de colagenase foram colocados no *shake* por 90 minutos à temperatura ambiente. Após esta etapa, os pedaços de intestino foram homogeneizados com pipeta de pasteur e macerados em *cell strainer* de 100 um. O líquido do macerado foi centrifugado a 350 g por 10 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de meio RPMI+SFB a 10% para contagem em câmara de Neubauer com o corante Turk na diluição de 1:10.

3.5.3 Isolamento de células do fígado

Os animais dos diferentes grupos experimentais foram sacrificados por deslocamento cervical e o lobo maior do fígado foi retirado e pesado. Em seguida, o lobo maior do fígado foi macerado em *cell strainer* em uma solução contendo meio RPMI + SFB a 10%. O líquido obtido do macerado foi centrifugado a 60 g por 3 minutos a 4°C para separação de hepatócitos (permaneceram no *pellet*) e leucócitos (presentes no sobrenadante). O sobrenadante foi em seguida coletado e colocado em um novo tubo falcon para realização de nova centrifugação a 60 g por 3 minutos a 4°C para garantir a presença de apenas leucócitos no sobrenadante. Este sobrenadante foi coletado e centrifugado a 350 g por 5 minutos à temperatura ambiente para formação do *pellet* de leucócitos. O sobrenadante foi descartado e sobre o *pellet* formado foram acrescentados 2 mL de ACK para lise de hemácias. Os tubos foram colocados por 4 minutos nesta solução a 4°C. Em seguida, foi adicionado 8 mL de meio

RPMI+SFB a 10%, centrifugado a 350 g por 5 minutos a 4°C, descartado o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI+SFB a 10% para contagem na câmara de Neubauer com o corante Turk na diluição de 1:10.

3.5.4 Marcação das células com anticorpos para leitura no citômetro

Após o isolamento das células de cada órgão, 1×10^6 células foram ressuspenso em 300 µl de meio RPMI + 10% soro fetal bovino e distribuídas em tubos eppendorf. Após centrifugação destes tubos a 350 g, por 5 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e sobre o *pellet* foram adicionados 10 µl de FC block diluído em PBS/BSA 1% na diluição de 1:100. Os tubos foram incubados por 20 minutos, a 4 °C, protegidos da luz. Posteriormente, foram acrescentados também sobre o *pellet* 10 µl dos anticorpos para os marcadores extracelulares a serem analisados, previamente diluídos em PBS/BSA 1% conforme concentração indicada nos kits. Um grupo de amostras de cada órgão foi incluído para marcação dos controles de isotipo dos anticorpos (isotipos IgG1 e IgG2a), diluídos em PBS/BSA 1%. Todas as amostras foram posteriormente incubadas por 30 minutos, a 4 C°, protegidas da luz. Em seguida, adicionou-se 200 µl de PBS 1X gelado ao *pellet* e os tubos foram centrifugados a 350 g, por 5 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em formaldeído 4% e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente para fixação. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas, descartados os sobrenadantes e o *pellet* foi ressuspenso em PBS/BSA 1% para posterior leitura no citômetro. Nas amostras em que foram realizadas marcação intracelular, logo após a incubação dos anticorpos para marcação extracelular, lavagem com PBS 1X gelado e centrifugação, o sobrenadante foi descartado e sobre o *pellet* foram adicionados 150 µl/tubo de tampão de permeabilização (BD: Becton Dickinson and Company, EUA) e as amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Em seguida, centrifugou-se e adicionou-se 20 µl/tubo dos anticorpos para marcação intracelular diluídos em tampão de permeabilização nas concentrações previamente padronizadas. As amostras foram incubadas por 45 minutos e em seguida foram adicionados 200 µl/tubo de PBS 1X gelado. Os tubos foram centrifugados, os sobrenadantes foram descartados e o *pellet* foi ressuspenso em formaldeído 4% e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente para fixação. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas, descartados os sobrenadantes e o *pellet* foi ressuspenso em PBS/BSA 1% para posterior leitura no citômetro. Os seguintes anticorpos foram utilizados para marcação das células: CD3 (APC-Cy7), CD4 (Pacific Blue; PE Cy7), CD8 (Pacific Blue; V450), CD45R/B220 (PE), CD11b (PE-Cy5), F4/80 (PE-Cy7; V450), Ly6G (APC), CD25 (APC), CD11c (PE Cy7) e FOXP3 (PE). Todos os anticorpos foram adquiridos da BD Pharmingen (Le Pont de Claix, France). A frequência de células positivas foi

analisada usando quadrantes específicos para as populações de interesse: linfócitos, granulócitos e macrófagos. Os limites dos quadrantes foram estabelecidos baseados nas populações negativas e controles de isotipo. As células foram adquiridas no citômetro BD FACS Canto II (BD Biosciences) e analisadas por meio do programa FlowJo 7.5.3 (TreeStar Inc.). Para construção dos gráficos, foram utilizadas as frequências das células (porcentagens) no total de eventos adquiridos (mínimo de 20.000 eventos/amostra).

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

Uma porção de 100 mg do intestino delgado ou fígado foi ressuspendida em solução salina 0,9% (4° C) contendo 0,15 v/v de Triton X-100 (Merck). Logo em seguida, foi homogeneizada em vortex e centrifugada a 4° por 10 minutos a 350 g. Os sobrenadantes foram imediatamente recolhidos e utilizados para o ensaio de NAG com diluição de 1:10. A reação foi iniciada após a adição de 100 µL do sobrenadante recolhido após centrifugação e pela adição de 100 µL de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminidina (Sigma), diluído em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1M; Na₂ HPO₄ 0,1 M; pH 4,5) na concentração final de 2,24mM. A reação se processou a 37°C por 10 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 em número relativo de macrófagos por miligrama (mg) de tecido úmido. A unidade obtida por este procedimento é expressa como “número relativo de macrófagos” /100mg de tecido.

3.7 Análise do recrutamento celular por microscopia intravital

Para realização da técnica de microscopia intravital, os camundongos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de uma mistura de xilazina e quetamina (essa mistura não causa alterações hemodinâmicas que poderiam interferir nos processos de recrutamento de leucócitos). O camundongo anestesiado foi colocado em uma placa térmica mantida a 37°C, importante para manter a temperatura corpórea do animal estável. Uma incisão foi feita na parede abdominal expondo cuidadosamente o

mesentério e as alças intestinais que foram posicionados sobre uma superfície transparente permitindo a passagem de luz. Um microscópio intravital (Nikon C-SRS H550L; Japan) com uma lente objetiva de 20X foi utilizado para examinar a microvasculatura mesentérica. Uma câmera digital (Nikon DSQIMC, Japan) acoplada ao microscópio foi usada para projetar as imagens em um monitor de computador. Essas imagens foram gravadas para posterior análise usando o programa Imaging software (NIS ELEMENTS-NIKON). O número de leucócitos rolando e aderidos foi determinado após análise das imagens gravadas. Leucócitos rolando foram definidos como células movendo em uma velocidade menor que aquelas de eritrócitos dentro de um determinado vaso. O número de leucócitos rolando foi determinado pela contagem de células passando por um determinado ponto marcado no vaso por minuto. Um leucócito foi considerado aderido quando permanecia parado por pelo menos 30 segundos no vaso e o número de leucócitos aderidos foi quantificado contando-se o número de células aderidas dentro de um comprimento de 100 μm de vaso.

3.8 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA

O jejuno-íleo e o fígado dos animais foram retirados no início da mortalidade (aproximadamente 14 dias após o transplante). Os níveis de citocinas e quimiocinas foram medidos em homogenatos destes órgãos através de *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA). Cem miligramas da porção jejuno-íleo do intestino delgado (úmido) e do lobo quadrado hepático coletado dos grupos estudados foram homogeneizadas 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 centrifugadas por 10 minutos, a 10.000 rpm e a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio de ELISA com diluição de 1:4. 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 Extração e expressão de mRNA de 5-LO por Real Time PCR

O RNA total de amostras do intestino e do fígado foi extraído utilizando-se Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), tratados com DNase livre de RNase e armazenados em freezer -70 °C. A reação de PCR em tempo real foi realizada em um sistema de detecção de sequência de 7500 (Applied Biosystems) utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) após uma reação de

transcrição reversa de 2 ug de RNA total usando o kit SuperScript III (Invitrogen, EUA). O nível de expressão relativa do gene de 5-LO foi determinado pelo método do $\Delta\Delta$ de comparação do limiar, normalizado pela subunidade ribossomal 18S. Foram utilizados os seguintes pares de iniciadores:

m5-LO Fwd	AGC TGC CTG CTG TGC ATC CC
m5-LO Rev	CCC GGT GGC ATT GGC CTT GT
m18S	CGT TCC ACC AAC TAA GAA CG
	CTC AAC ACG GGA AAC CTC AC

3.10 Dosagem de leucotrieno B4

Os animais foram eutanasiados no 3° e no 10° dia após o transplante para coleta do jejuno-íleo, fígado e sangue e posterior dosagem dos níveis de LTB4. Foram pesadas 50 mg das amostras de jejuno-íleo e fígado que foram em seguida processadas em 500 μ L de buffer contendo inibidores de proteases. O soro foi obtido a partir da centrifugação do sangue a 7000 rpm, 15 min., à temperatura ambiente. Os níveis séricos, hepáticos e intestinais de LTB4 foram então determinados por ensaio enzimático através de kit comercial próprio (Biotrak™, Amersham Pharmacia Biotech, UK), conforme as instruções do fabricante. As amostras foram lidas em um leitor de absorbância no comprimento de onda 405 nm e os resultados foram expressos como pg LTB4/amostra, baseados numa curva padrão.

3.11 Avaliação dos parâmetros clínicos e sobrevivência

Após o transplante de esplenócitos, os camundongos foram avaliados de dois em dois dias para análise dos parâmetros clínicos da GVHD, utilizando uma escala clínica, com pontuação de 0 a 14 (tabela 1). Esta escala foi criada a partir de uma adaptação da escala utilizada em trabalhos anteriores do nosso grupo (REZENDE et al., 2013; BERNARDES et al., 2015) e avaliou a variação do peso corporal; o aspecto do pêlo dos camundongos; a descamação da pele, verificada na cauda, na região anal, no pavilhão auricular externo e no focinho; a atividade do camundongo; a postura em flexão do tronco; a ocorrência de diarreia e a presença de sangue oculto nas fezes. O sangue oculto foi verificado através do kit diagnóstico da FECA-CULT™, de acordo com as instruções do fabricante. Estes sete parâmetros foram pontuados de zero a dois, somando um total de 14 pontos. O aspecto do pêlo (pêlo arrepiado) foi pontuado com dois pontos quando apresentou alterações ou com zero quando não ocorreu alteração. A pontuação da variação do peso corporal foi dividida em percentual de peso

perdido. Foi pontuado com zero o animal que não teve perda de peso corporal; 0,5 se a perda foi de até 10% do peso corporal inicial; 1,0 se a perda foi entre 10 a 25%; 1,5 se a perda de peso foi entre 25% a 50% em relação ao peso inicial e 2,0 se a perda de peso corporal foi acima de 50%. A postura foi graduada de acordo com o grau de inclinação ou flexão do tronco. O animal recebeu pontuação zero quando não apresentou nenhuma inclinação aparente; 0,5 para uma leve inclinação; 1,0 para uma inclinação moderada e 2,0 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 zero quando não tinha alterações, 0,5 quando foi observada uma apatia leve, 1,0 para apatia moderada e 2,0 quando a apatia ficou grave (letargia). As fezes dos animais também foram avaliadas e pontuadas, quanto à presença de diarreia em zero (fezes sem alterações), 1,0 (fezes pastosas) e 2,0 (fezes líquidas) e quanto à presença ou não de sangue: 0 (ausência), 1,0 (moderada quantidade de sangue) e 2,0 (grande quantidade de sangue). Os parâmetros clínicos foram analisados de 2 em 2 dias até que um dos grupos analisados apresentasse 100% de mortalidade.

Tabela 1: Escala clínica. Adaptada a partir de dados da literatura (COOKE et al., 2001; COLSON et al., 2004; CASTOR et al., 2012; REZENDE et al., 2013; BERNARDES et al., 2015) para a verificação dos parâmetros clínicos ocasionados pela reação inflamatória ocasionada pela GVHD.

Peso	0: sem perda de peso/ 0,5: perda 10% do peso corporal/ 1,0: perda de 10 a 25% / 1,5: perda de 25 a 50%/ 2,0: perda acima de 50%.
Postura	0: sem inclinação aparente/ 0,5: inclinação leve/ 1,0: inclinação moderada/ 2,0: inclinação grave.
Atividade	0: sem alteração aparente/ 0,5: apatia leve/ 1,0: apatia moderada/ 2,0: letargia.
Textura do pêlo (pêlo arrepiado)	0: ausência / 2,0: presença
Integridade da pele	0: ausência de lesão / 2,0: presença de lesão
Sangue oculto nas fezes	0: ausência / 1,0: quantidade de sangue moderada / 2,0: grande quantidade de sangue
Diarreia	0: ausência / 1,0: pastosa / 2,0: líquida
Total	14 pontos

3.12 Análise da reconstituição da medula óssea por citometria de fluxo

O baço e a medula dos camundongos foram coletados e 1×10^6 células foram isoladas de cada órgão conforme o protocolo de isolamento citado no item 3.2. Após o isolamento, estas amostras foram processadas e marcadas para leitura no citômetro conforme citado no item 3.6.3. Os seguintes anticorpos foram utilizados para marcação das células: H-2D^d (Alexa Fluor-647; Biolegend, San Diego, CA) e H-2Kb/H-2D^b (PE; Biolegend, San Diego, CA). Os limites dos quadrantes foram estabelecidos baseados nas populações negativas e controles de isotipo. As células foram adquiridas no citômetro BD FACS Canto II (BD Biosciences) e analisadas por meio do programa FlowJo 7.5.3 (TreeStar Inc.). Para construção dos gráficos, foram utilizadas as frequências das células (porcentagens) no total de eventos adquiridos (mínimo de 50.000 eventos/amostra).

3.13 Indução da reação do GVL

Uma linhagem celular de mastocitoma murino, P815 (H-2^d, American Type Culture Collection, Rockville, MD), transduzida com um vetor (EF1 α GFP) foi gentilmente cedida por A. C. Leal e M. Bonamino (Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, Brasil). Sete dias antes do transplante destas células em camundongos submetidos à GVHD, elas foram cultivadas em garrafas próprias para cultura, em meio DMEN + 10% de soro fetal bovino (SFB), armazenadas em estufa na temperatura de 37°C e na concentração de 5% CO₂. No dia 7, quando as células P815⁺ apresentavam pelo menos 80% de viabilidade (avaliadas pela contagem com o corante Tripan) e expressão de GFP em 100% das células (avaliadas por citometria de fluxo), o mesmo protocolo de indução da GVHD foi realizado, seguida da injeção intravenosa de seis mil células P815 GFP⁺ nos camundongos B6D2F1. Os camundongos submetidos à doença do enxerto-versus-hospedeiro e ao transplante de células tumorais, foram eutanasiados no 5º dia após o transplante para retirada do baço e realização da citometria de fluxo. Após o isolamento de 1 x10⁶ células/amostra conforme o protocolo de isolamento citado no item 3.2., a leitura das amostras foi realizada no citômetro BD C6 Accuri (BD Biosciences, San Jose, CA). Foram adquiridos 20000 eventos/amostra e a presença de células tumorais foi determinada pela frequência de células GFP⁺ no total de eventos adquiridos. Os gráficos foram construídos a partir da análise dos histogramas produzidos pelo citômetro, partindo-se do histograma de células do baço não GFP⁺, utilizando-se o programa FlowJo 7.5.3 (TreeStar Inc.).

3.14 Análises estatísticas

Os dados 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 dados foram expressos como média \pm EPM. As análises estatísticas e os gráficos foram elaborados utilizando-se o *software* GraphPad Prism 6.

4 RESULTADOS

4.1 Transplante de células deficientes em 5-LO reduz lesão intestinal e hepática em camundongos submetidos à GVHD

Para compreender o papel de 5-lipoxigenase no desenvolvimento da GVHD, analisamos as modificações histopatológicas do intestino e do fígado de camundongos submetidos à doença que receberam transplante de células deficientes ou não em 5-lipoxigenase. O intestino e o fígado dos animais foram retirados em duas diferentes fases da GVHD: início dos sinais clínicos da doença (aproximadamente 7 dias após o transplante) e início da mortalidade (aproximadamente 14 dias após o transplante). No início dos sinais clínicos, não foi encontrada diferença na graduação das lesões histopatológicas do fígado e do intestino de camundongos que receberam células deficientes ou não em 5-lipoxigenase comparada à graduação histopatológica do grupo controle (dados não mostrados). Entretanto, no início da mortalidade, houve uma diferença significativa na graduação das lesões histopatológicas no intestino e fígado entre o grupo controle e aqueles submetidos à GVHD com células de animais WT (Figura 4A e 4B). Nesta fase da GVHD, o grupo que recebeu células de camundongos selvagens apresentou perda parcial da arquitetura do intestino, além de um acúmulo de células inflamatórias na mucosa e submucosa, edema e congestão de vasos sanguíneos. Foram observadas também mudanças degenerativas graves e ulceração da mucosa, com áreas focais de necrose na camada muscular e serosa (Figura 4A e 4D), enquanto que no grupo controle foram observadas apenas pequenas áreas com discreto infiltrado inflamatório, possivelmente devido aos efeitos da irradiação no intestino. O grupo que recebeu células deficientes em 5-LO apresentou preservação da arquitetura do órgão, onde foram observadas apenas raras erosões superficiais na mucosa, um menor infiltrado inflamatório e edema na lâmina própria, além de permanecerem íntegras as camadas muscular e serosa, o que resultou em uma menor graduação histopatológica em comparação ao grupo de camundongos submetidos à GVHD (Figura 4A e 4E). No fígado, destacou-se um infiltrado inflamatório ao redor da veia centro-lobular no grupo que recebeu células selvagens (Figura 4B e 4G) em comparação ao grupo controle e uma redução desse infiltrado no grupo que recebeu células deficientes em 5-LO (Figura 4B e 4H). Estes resultados destacam a importância da via de 5-lipoxigenase na fisiopatologia da doença do enxerto-versus-hospedeiro.

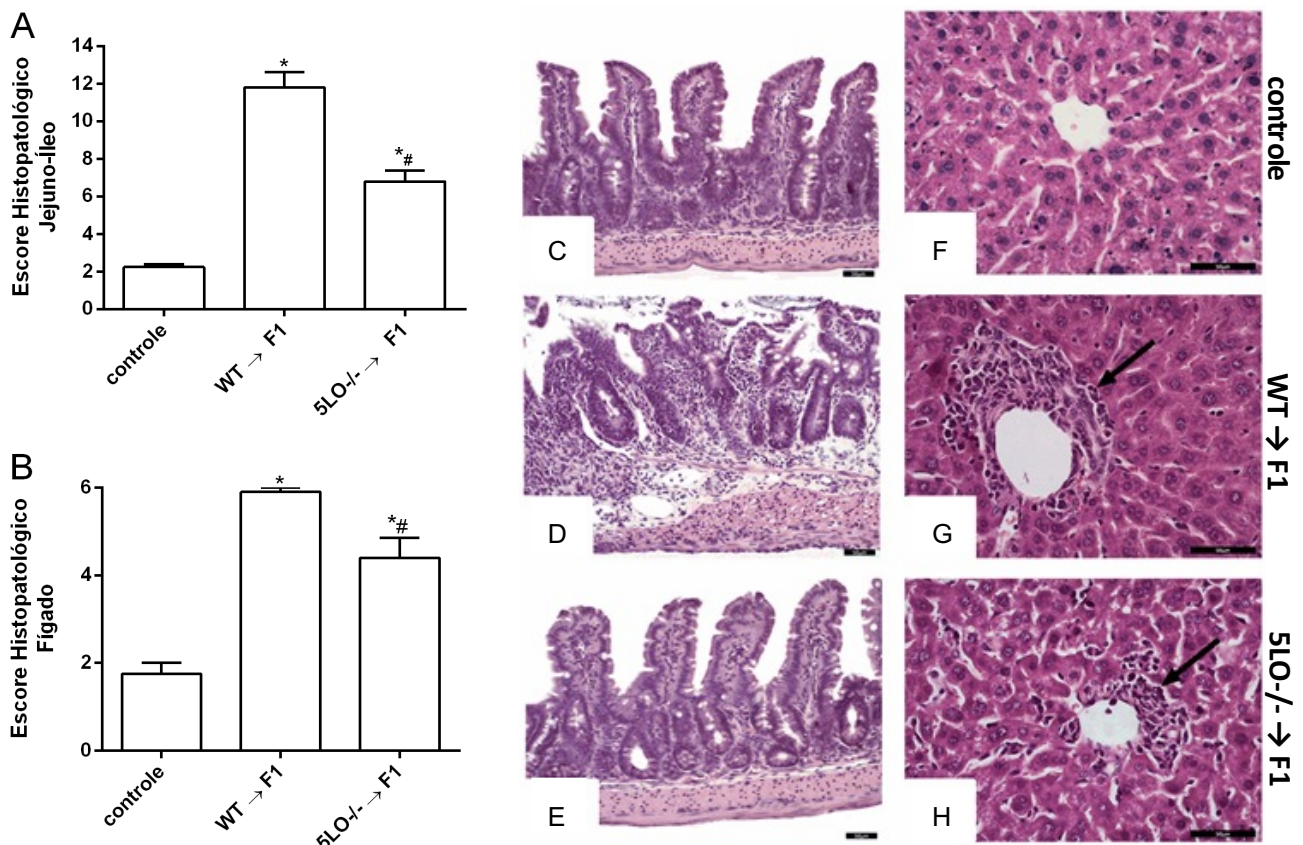


Figura 4. Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO diminui a lesão de órgãos alvo associada à GVHD no início da mortalidade. A GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos e células da medula de camundongos doadores semialogênicos WT ou WT 5LO^{-/-} para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos e células da medula de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. No início da mortalidade, os camundongos foram sacrificados e coletadas amostras do jejuno-íleo (A) e do fígado (B) para análise histopatológica. Aspectos histopatológicos de seções do intestino (C-E) e fígado (F-H) coradas com H&E nos grupos controle, WT → F1 e 5LO^{-/-} → F1, respectivamente. Escala de barra, 50 μm para todos os painéis. Os resultados são apresentados como média ± SEM (n = 5). * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo controle e ao grupo WT → F1, respectivamente.

4.2 Transplante de células deficientes em 5-LO diminui o acúmulo de leucócitos em órgãos alvo da GVHD

LTB₄ tem papel importante em diferentes doenças inflamatórias por meio da interação com o receptor BLT1 pelo qual tem maior afinidade. Este receptor está expresso principalmente em leucócitos, incluindo linfócitos T e macrófagos (FUNK, 2001; LUSTER; TAGER, 2004). O eixo LTB₄-BLT1 participa do recrutamento de leucócitos para sítios inflamatórios tanto por direcionar a migração dessas células quanto por aumentar a interação entre a célula endotelial e os leucócitos. Dessa forma, nós avaliamos se a interferência na via de produção de LTB₄ poderia alterar o acúmulo de leucócitos no baço, na medula óssea, no jejuno-íleo e no fígado, órgãos alvo associados à GVHD, no início da mortalidade.

4.2.1 Acúmulo de células no baço e na medula

Nos animais submetidos à GVHD houve um aumento na proporção de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no baço (Figura 5A-B, 5E) e na medula (Figura 5C-D). Por outro lado, o transplante de leucócitos deficientes em 5-LO reduziu a proporção dessas células no baço (Figura 5A-B, 5E) e na medula (Figura 5C-D). Foi observado também um aumento na proporção de macrófagos no baço (Figura 6A e 6C) e na medula (Figura 6B e 6D) de camundongos submetidos à GVHD comparado ao grupo controle. Já o transplante de leucócitos deficientes em 5-LO reduziu a proporção dessas células nestes órgãos linfoides (Figura 6).

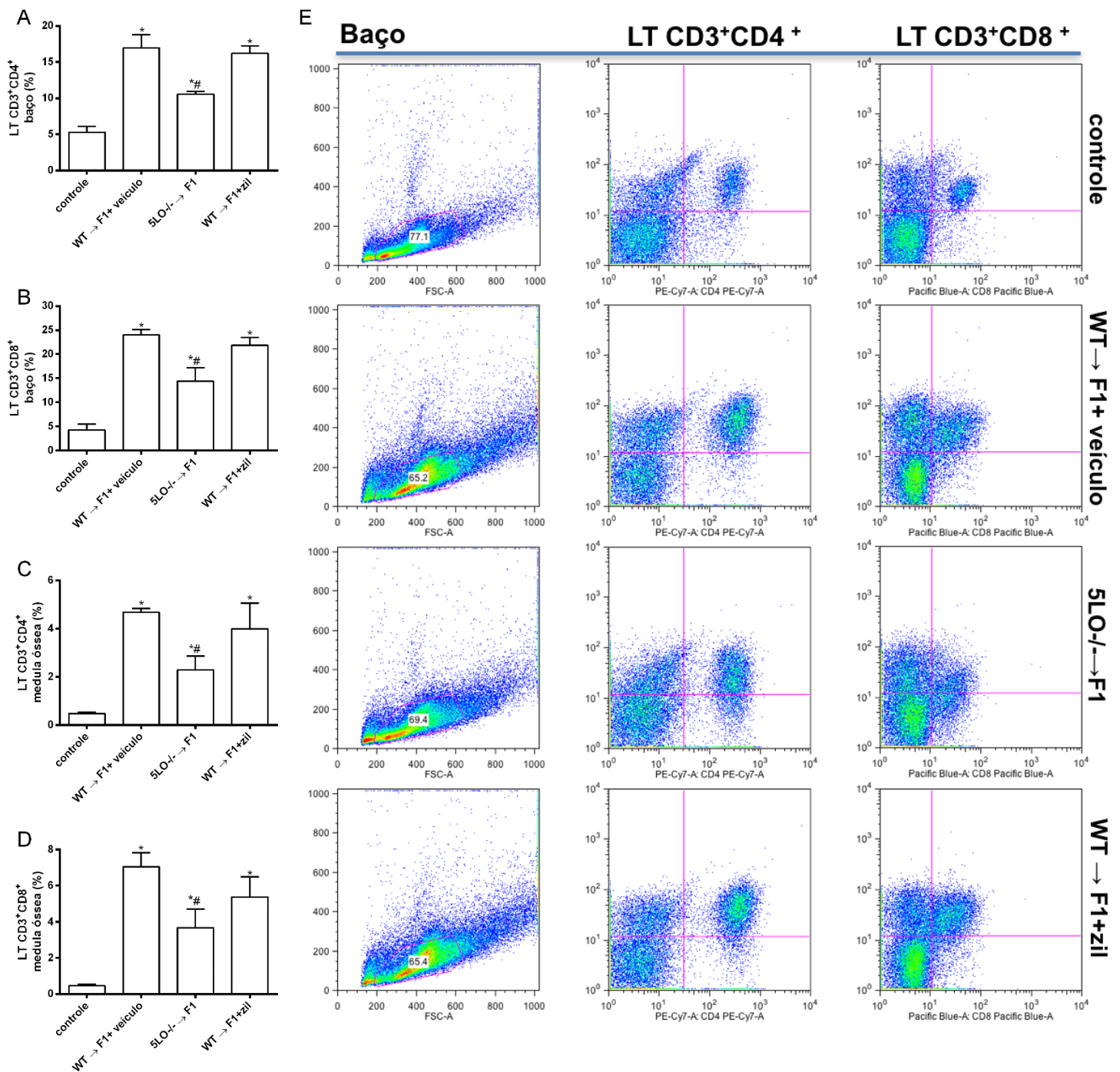


Figura 5. Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO reduz o acúmulo de LT CD4⁺ e T CD8⁺ em órgãos linfóides associados à GVHD. A GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos e células da medula de camundongos doadores semialogênicos WT ou WT 5LO^{-/-} para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos e células da medula de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. O grupo tratado com zileuton (inibidor de 5-LO) recebeu a droga por gavagem (30mg/kg/100µl de CMC 0,1% 12 em 12hs), iniciada no dia do transplante e mantida até o início dos sinais clínicos da GVHD (10 dias após o transplante). No início da mortalidade, os camundongos foram sacrificados e coletadas amostras para análise do acúmulo de LT CD4⁺ (A, E) e LT CD8⁺ (B, E) no baço e LT CD4⁺ (C) e LT CD8⁺ (D) na medula por citometria de fluxo. Dot plot representativo da análise dos resultados realizada no baço (E). Os resultados são apresentados como média ± SEM (n = 4). * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo controle e ao grupo WT → F1 + veículo, respectivamente.

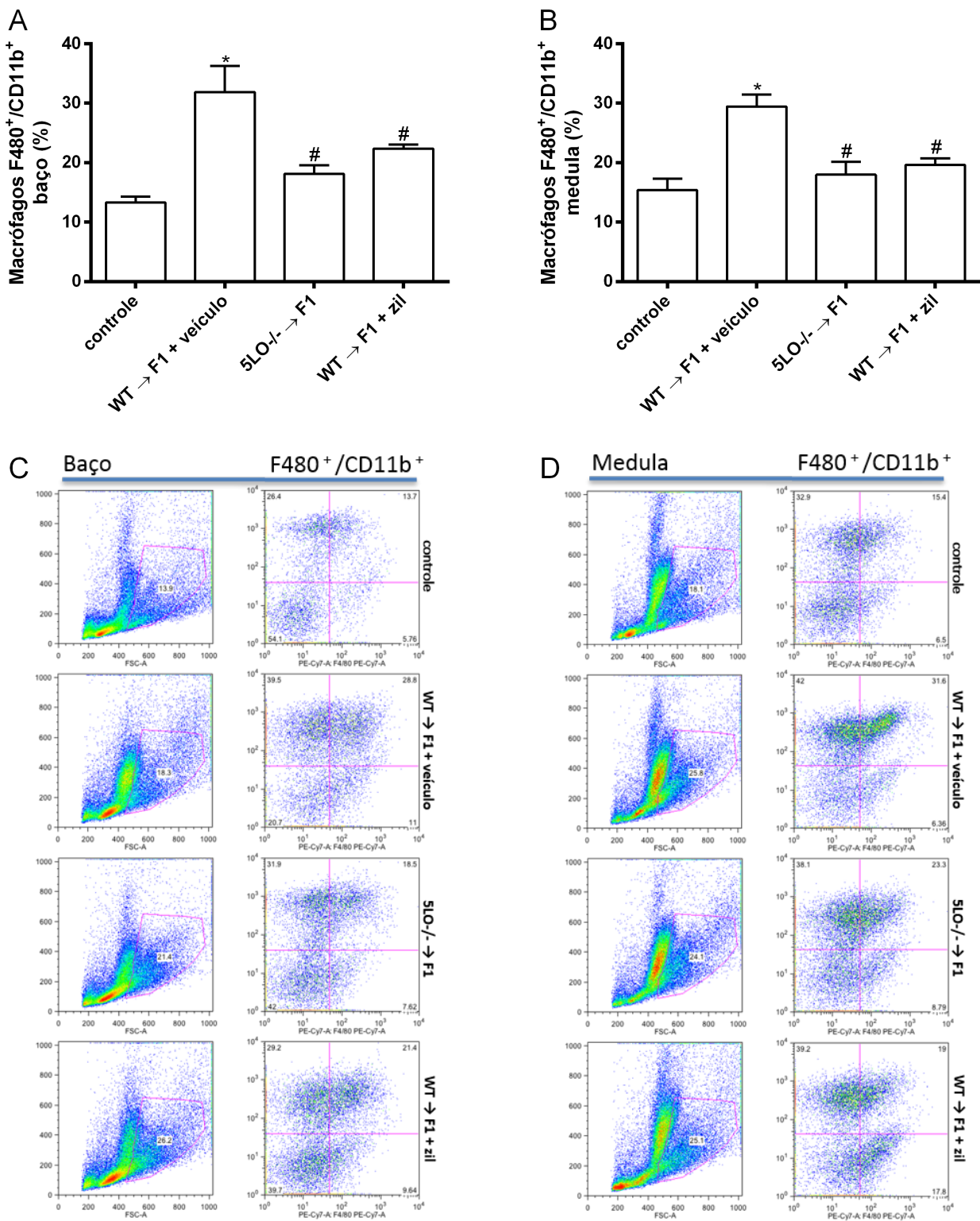


Figura 6. Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou tratamento com zileuton reduz o acúmulo de macrófagos em órgãos linfoides associados à GVHD. A GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos e células da medula de camundongos doadores semialogênicos WT ou WT 5LO^{-/-} para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos e células da medula de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. O grupo tratado com zileuton (inibidor de 5-LO) recebeu a droga por gavagem (30mg/kg/100µl de CMC 0,1% 12 em 12hs), iniciada no dia do transplante e mantida até o início dos sinais clínicos da GVHD (10 dias após o transplante). No início da mortalidade, os camundongos foram sacrificados e coletadas amostras para análise do acúmulo de macrófagos no baço (A, C) e na medula (B, D) por citometria de fluxo. Os resultados são apresentados como média ± SEM (n = 4). * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo controle e ao grupo WT → F1 + veiculo, respectivamente.

Não houve diferença na proporção de células T reg no baço em nenhum dos grupos avaliados (Tabela 2). Na medula, a proporção de T reg nos camundongos submetido à GVHD apresentou-se aumentada em comparação ao grupo controle (Tabela 2). No grupo que recebeu células deficientes em 5-LO não houve diferença na proporção de T reg na medula quando comparada aos demais grupos (Tabela 2). Não houve diferença na proporção de células NK no baço e na medula em nenhum dos grupos avaliados (Tabela 2). A proporção de células dendríticas no baço de camundongos submetidos à GVHD estava reduzida em comparação ao grupo controle. Nos camundongos que receberam células deficientes em 5-LO houve um aumento na proporção de células dendríticas comparado ao grupo controle e ao grupo submetido à GVHD (Tabela 2). Na medula, entretanto, não houve diferença na proporção dessas células em nenhum dos grupos avaliados (Tabela 2). Com relação ao acúmulo de neutrófilos, houve um aumento no baço e na medula dos camundongos submetidos à GVHD em comparação ao grupo controle (Tabela 2). No grupo que recebeu leucócitos deficientes em 5-LO, a proporção de neutrófilos no baço estava diminuída em relação aos animais doentes, o que não ocorreu na medula óssea (Tabela 2). Os camundongos submetidos à GVHD também apresentaram uma redução na proporção de linfócitos B no baço e na medula em comparação ao grupo controle. Entretanto, o grupo de animais que recebeu células deficientes em 5-LO apresentou uma proporção maior dessas células, apesar dessa proporção permanecer menor que a dos animais não doentes (Tabela 2).

Tipo celular	Baço (Média da % de células ± SEM)				Medula (Média da % de células ± SEM)			
	controle	WT → F1+veíc	5-LO-/- → F1	WT → F1 +zil	controle	WT → F1+veíc	5-LO-/- → F1	WT → F1 +zil
Treg	78,4 ± 0,9	84,7 ± 3,8	84,2 ± 3,2	85,0 ± 1,5	57,2 ± 2,6	*80,5 ± 10	69,13 ± 6,5	*81,2 ± 5,5
NK	1,8 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,4 ± 0,3	1,0 ± 0,1	1,5 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,5 ± 0,6	0,9 ± 0,1
Células dendríticas	28,4 ± 0,6	*12,6 ± 1,8	*#39,1 ± 2,8	*#43,7 ± 1,9	23,3 ± 3,0	31,3 ± 7,8	39,1 ± 2,8	43,7 ± 1,9
Neutrófilo	29,8 ± 2,2	*51,7 ± 3,6	*32,2 ± 4,7	*48,7 ± 3,2	54,8 ± 2,5	*71,6 ± 5,2	*73,3 ± 3,2	*67,3 ± 4,4
LB	37,8 ± 2,3	*3,0 ± 0,3	*#8,9 ± 1,8	*2,4 ± 0,2	38,4 ± 3,3	*4,3 ± 0,4	*#12,7 ± 1,6	*3,3 ± 0,2

Tabela 2: Perfil de leucócitos nos órgãos linfoides associados à GVHD. A GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos e células da medula de camundongos doadores semialogênicos WT ou WT 5LO-/- para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos e células da medula de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. O grupo tratado com zileuton (inibidor de 5-LO) recebeu a droga por gavagem (30mg/kg/100µl de CMC 0,1% 12 em 12hs), iniciada no dia do transplante e mantida até o início dos sinais clínicos da GVHD (10 dias após o transplante). No início da mortalidade, os camundongos foram sacrificados e coletadas amostras do baço e da medula para análise do acúmulo de células inflamatórias por citometria de fluxo. Os resultados são apresentados como média ± SEM (n = 4). * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo controle e ao grupo WT → F1 + veíc., respectivamente. Os dados que apresentaram diferenças estatisticamente significativas foram destacados em negrito.

4.2.2 Acúmulo de células no intestino e no fígado

A análise do acúmulo de leucócitos no jejuno-íleo de animais submetidos à GVHD demonstrou um aumento na proporção de LT CD4⁺ e LT CD8⁺ em comparação ao grupo controle. Os animais que receberam transplante de células deficientes em 5-LO apresentaram uma redução na proporção dessas células quando comparada ao grupo de animais que recebeu células selvagens (Figura 7A e 7C). Nós também observamos um aumento no acúmulo de macrófagos no jejuno-íleo de camundongos submetidos à GVHD em comparação ao grupo controle (Figura 8A). No grupo que recebeu células deficientes em 5-LO, observamos uma redução do acúmulo de macrófagos neste órgão comparado ao grupo que recebeu células selvagens (Figura 8A). Em relação às células dendríticas e T reg observamos uma redução na proporção dessas células nos animais que receberam leucócitos selvagens em comparação ao grupo controle (Figura 8B e 8D). Entretanto, no grupo de animais que receberam leucócitos deficientes em 5-LO, a proporção de células dendríticas (Figura 8B e 8D) e T reg manteve-se semelhante à do grupo não doente (Figura 8C e 8E).

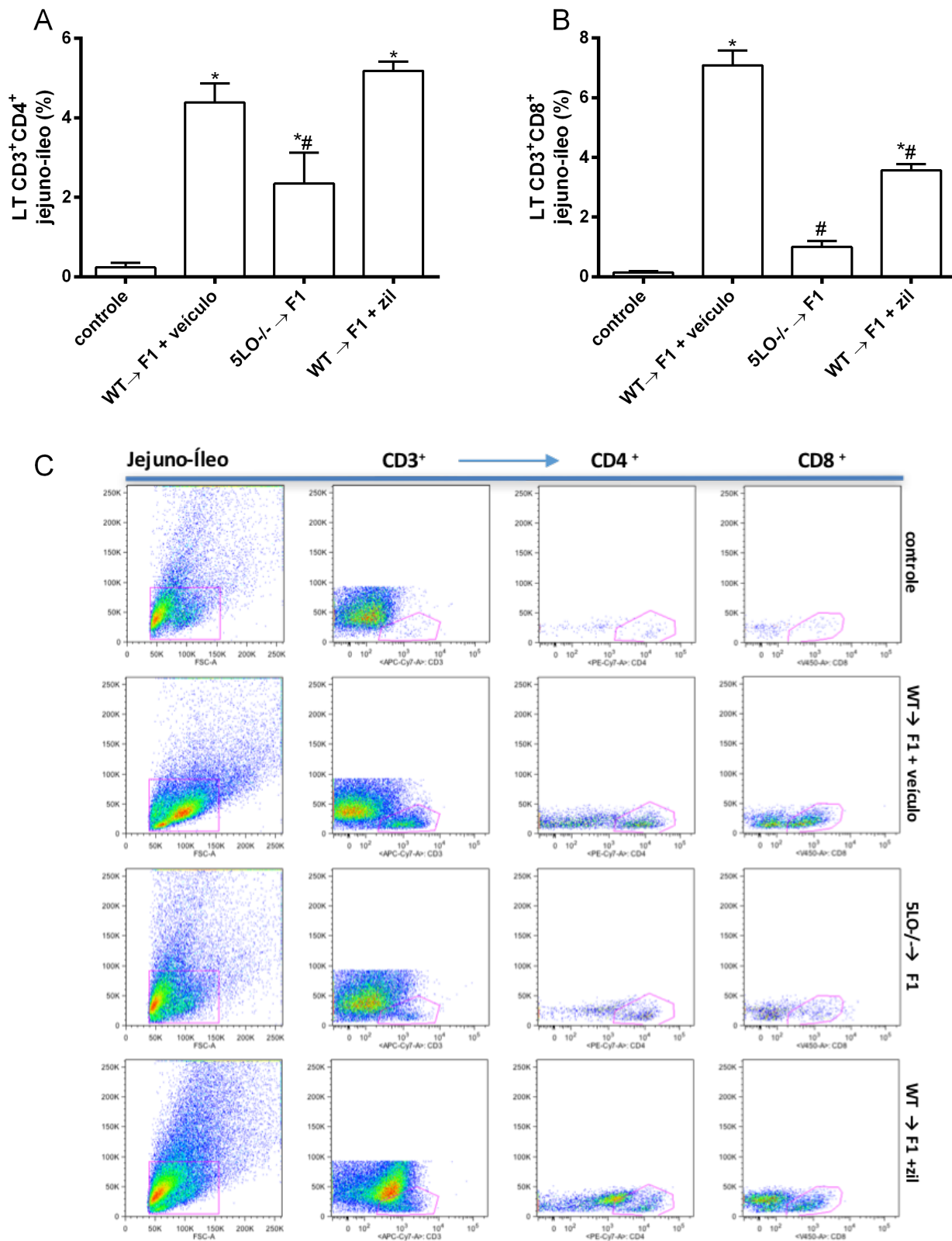


Figura 7. Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou tratamento com zileuton reduz o acúmulo de linfócitos no jejuno-íleo. A GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos e células da medula de camundongos doadores semialogênicos WT ou WT 5LO^{-/-} para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos e células da medula de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. O grupo tratado com zileuton (inibidor de 5-LO) recebeu a droga por gavagem (30mg/kg/100µl de CMC 0,1% 12 em 12hs), iniciada no dia do transplante e mantida até o início dos sinais clínicos da GVHD (10 dias após o transplante). No início da mortalidade, os camundongos foram sacrificados e coletadas amostras para análise do acúmulo de LT CD4⁺ (A, C) e LT CD8⁺ (B, C). Os resultados são apresentados como média ± SEM (n = 4). * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo controle e ao grupo WT → F1 + veículo, respectivamente.

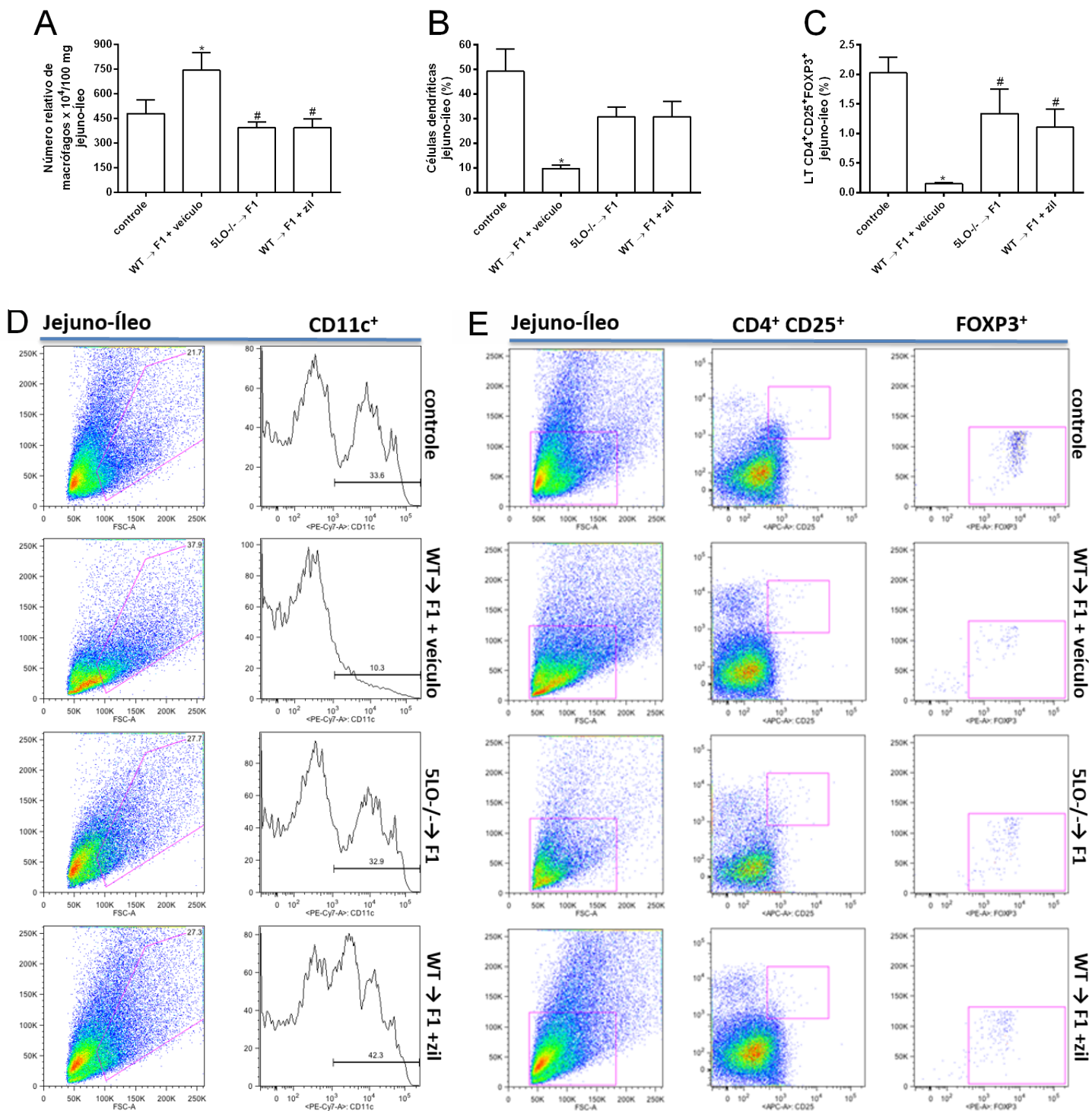


Figura 8. Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou tratamento com zileuton reduz o acúmulo de macrófagos e mantém o número de células dendríticas e Treg no jejuno-íleo. A GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos e células da medula de camundongos doadores semialogênicos WT ou WT 5LO $^{-/-}$ para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos e células da medula de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. O grupo tratado com zileuton (inibidor de 5-LO) recebeu a droga por gavagem (30mg/kg/100 μ l de CMC 0,1% 12 em 12hs), iniciada no dia do transplante e mantida até o início dos sinais clínicos da GVHD (10 dias após o transplante). No início da mortalidade, os camundongos foram sacrificados e coletadas amostras para análise do acúmulo de macrófagos através do ensaio de NAG (A) e de células dendríticas CD11c $^+$ (B, D) e Treg (C, E) por citometria de fluxo. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n = 4). * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo controle e grupo WT \rightarrow F1 + veículo, respectivamente.

Houve ainda uma redução na proporção de células NK tanto nos animais que receberam células selvagens quanto nos animais que receberam células deficientes em 5-LO em comparação ao grupo controle. Não houve diferença na proporção de LB ou neutrófilos em nenhum dos grupos avaliados (Tabela 3).

Tipo celular	Jejuno-Íleo (Média da % de células ± SEM)			
	controle	WT → F1+veíc	5-LO/- → F1	WT → F1 +zil
NK	5,2 ± 0,5	*0,9 ± 0,1	*2,0 ± 0,9	*2,1 ± 1,3
LB	3,4 ± 0,9	1,7 ± 0,8	3,4 ± 1,0	4,3 ± 1,2
Neutrófilo	27,1 ± 2,8	17,1 ± 1,5	29,2 ± 6,6	26,4 ± 7,5

Tabela 3: Perfil de leucócitos no jejuno-íleo de camundongos submetidos à GVHD. A GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos e células da medula de camundongos doadores semialogênicos WT ou WT 5LO/- para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos e células da medula de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. O grupo tratado com zileuton (inibidor de 5-LO) recebeu a droga por gavagem (30mg/kg/100µl de CMC 0,1% 12 em 12hs), iniciada no dia do transplante e mantida até o início dos sinais clínicos da GVHD (10 dias após o transplante). No início da mortalidade, os camundongos foram sacrificados e coletadas amostras do jejuno-íleo para análise do acúmulo de células inflamatórias por citometria de fluxo. Os resultados são apresentados como média ± SEM (n = 4). * P < 0.05 quando comparados ao grupo controle. Os dados que apresentaram diferenças estatisticamente significativas foram destacados em negrito.

A análise do acúmulo de leucócitos no fígado no início da mortalidade demonstrou que em nosso modelo de GVHD murino não há diferença na proporção de linfócitos T CD4⁺ neste órgão em nenhum dos grupos avaliados (Tabela 4). Entretanto, houve um aumento na proporção de linfócitos T CD8⁺ de animais submetidos à GVHD em comparação ao grupo controle. Nos animais que receberam leucócitos deficientes em 5-LO houve uma redução significativa na proporção dessas células em comparação aos animais que receberam células selvagens (Figura 9A e 9C). Nós também observamos um aumento no acúmulo de macrófagos no fígado de camundongos que receberam leucócitos selvagens quando comparado ao grupo controle. No grupo que recebeu células deficientes em 5-LO houve uma redução do acúmulo destes macrófagos hepáticos (Figura 9B). Não houve diferença na proporção de células NK no fígado em nenhum dos grupos avaliados (Tabela 4). Em relação à Treg, houve um pequeno aumento nos grupos que receberam células selvagens ou deficientes em 5-LO em comparação ao grupo controle, entretanto, a proporção dessas células em todos os grupos foi extremamente baixa, mantendo-se em níveis menores que 1% (Tabela 4). A análise do neutrófilo

demonstrou um aumento na proporção desse tipo celular nos camundongos submetidos à GVHD em comparação ao grupo controle. No grupo que recebeu leucócitos deficientes em 5-LO foi observada uma redução na proporção dessas células quando comparada à do grupo de animais que recebeu células selvagens (Tabela 4). Houve também uma redução na proporção de células NK tanto nos animais que receberam células selvagens quanto nos animais que receberam células deficientes em 5-LO em comparação ao grupo controle. Não houve diferença na proporção de LB ou neutrófilos em nenhum dos grupos avaliados (Tabela 3). Foi observada uma redução na proporção de LB e células dendríticas em animais submetidos à GVHD comparada à proporção apresentada pelo grupo controle (Tabela 4). Nos animais que receberam leucócitos deficientes em 5-LO, a proporção de linfócitos B e células dendríticas manteve-se semelhante à do grupo controle (Tabela 4).

Os dados expostos até agora indicam que a redução de macrófagos e linfócitos intestinais e hepáticos contribuem para a proteção dos órgãos alvo da GVHD. Além disso, a manutenção da proporção de T reg e de células dendríticas no jejuno-íleo observada em camundongos que receberam células deficientes em 5-LO pode estar associada à proteção deste órgão.

Tipo celular	Fígado (Média da % de células ± SEM)			
	controle	WT → F1+veíc	5-LO-/- → F1	WT → F1 +zil
LT CD4	32,1 ± 3,1	30,0 ± 2,5	36,8 ± 4,4	29,7 ± 1,3
NK	0,7 ± 0,3	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Treg	0,2 ± 0,02	*0,9 ± 0,1	*0,8 ± 0,2	*0,9 ± 0,1
Neutrófilo	16,2 ± 6,3	*60,2 ± 4,6	#29,8 ± 3,3	*53,4 ± 2,0
LB	38,5 ± 4,3	*10,2 ± 0,5	#33,9 ± 7,2	*14,0 ± 0,8
Células dendríticas	68,1 ± 4,3	*21,4 ± 1,8	#50,9 ± 9,0	*30,6 ± 1,5

Tabela 4: Perfil de leucócitos no fígado de camundongos submetidos à GVHD. A GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos e células da medula de camundongos doadores semialogênicos WT ou WT 5LO-/- para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos e células da medula de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. O grupo tratado com zileuton (inibidor de 5-LO) recebeu a droga por gavagem (30mg/kg/100µl de CMC 0,1% 12 em 12hs), iniciada no dia do transplante e mantida até o início dos sinais clínicos da GVHD (10 dias após o transplante). No início da mortalidade, os camundongos foram sacrificados e coletadas amostras do fígado para análise do acúmulo de células inflamatórias por citometria de fluxo. Os resultados são apresentados como média ± SEM (n = 4). * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo controle e ao grupo WT → F1 + veíc., respectivamente. Os dados que apresentaram diferenças estatisticamente significativas foram destacados em negrito.

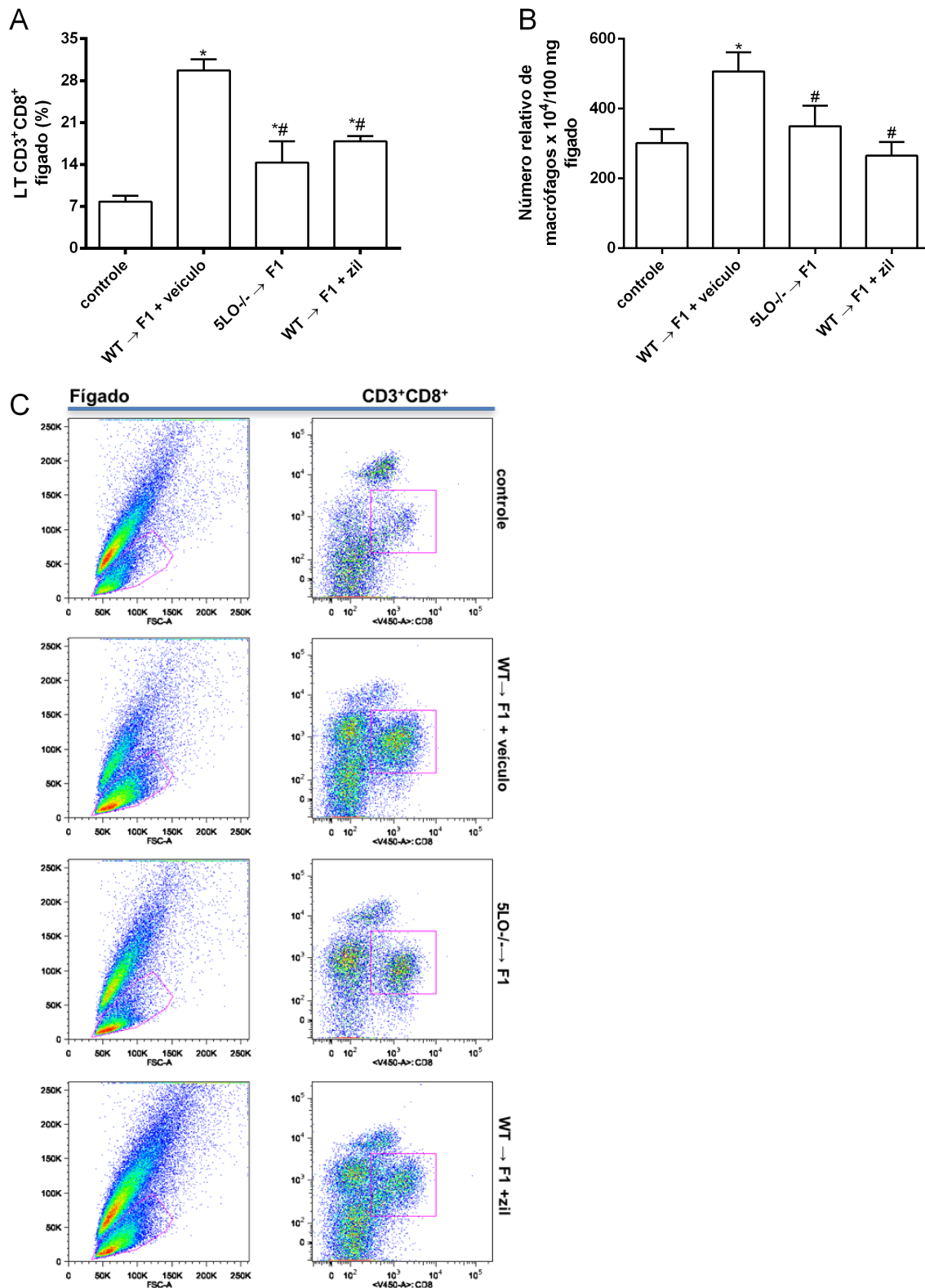


Figura 9. Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou tratamento com zileuton reduz o acúmulo de LT CD8 e macrófagos no fígado. A GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos e células da medula de camundongos doadores semialogênicos WT ou WT 5LO^{-/-} para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos e células da medula de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. O grupo tratado com zileuton (inibidor de 5-LO) recebeu a droga por gavagem (30mg/kg/100µl de CMC 0,1% 12 em 12hs), iniciada no dia do transplante e mantida até o início dos sinais clínicos da GVHD (10 dias após o transplante). No início da mortalidade, os camundongos foram sacrificados e coletadas amostras para análise do acúmulo de LT CD8 (A) por citometria de fluxo e macrófagos através do ensaio de NAG (B). Os resultados são apresentados como média ± SEM (n = 4). * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo controle e ao grupo WT → F1 + veículo, respectivamente.

4.3 Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO reduz a concentração de citocinas e quimiocinas em órgãos alvo da GVHD

Visto que a ausência de 5-LO nos leucócitos doados protegeu os órgãos alvo da GVHD e reduziu o acúmulo de leucócitos nestes órgãos, o nosso próximo experimento objetivou avaliar a produção de quimiocinas e citocinas relacionadas à fisiopatologia da doença do enxerto-versus-hospedeiro. Foi observada uma maior concentração das quimiocinas CCL2, CCL3 e CCL5 (Figura 10A-C) no intestino de camundongos submetidos à GVHD no início da mortalidade comparada à concentração destas quimiocinas no grupo controle. Entretanto, não foram encontradas diferenças nos níveis de CCL2 (Figura 10A) e CCL5 (Figura 10C) em camundongos que receberam células deficientes ou não em 5-lipoxigenase. Já na análise de CCL3 (Figura 10B), observamos níveis reduzidos dessa quimiocina em animais que receberam transplante de células deficientes em 5-LO em comparação aos animais que receberam células selvagens.

Camundongos submetidos à GVHD pelo transplante de leucócitos selvagens apresentaram ainda um aumento nos níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-17 (Figura 10D-F) e uma redução dos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 (Figura 10G) em comparação ao grupo controle. Já os camundongos que receberam células deficientes em 5-LO apresentaram níveis reduzidos destas citocinas pró-inflamatórias quando comparados aos níveis apresentados por camundongos que receberam células selvagens (Figura 10D-F). Além disso, o nível da citocina anti-inflamatória IL-10 apresentou-se aumentado em comparação ao grupo controle e ao grupo que recebeu células selvagens (Figura 10G), demonstrando que parte do efeito protetor da ausência de 5-lipoxigenase poderia ser explicado pela redução de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 no intestino (Figura 10).

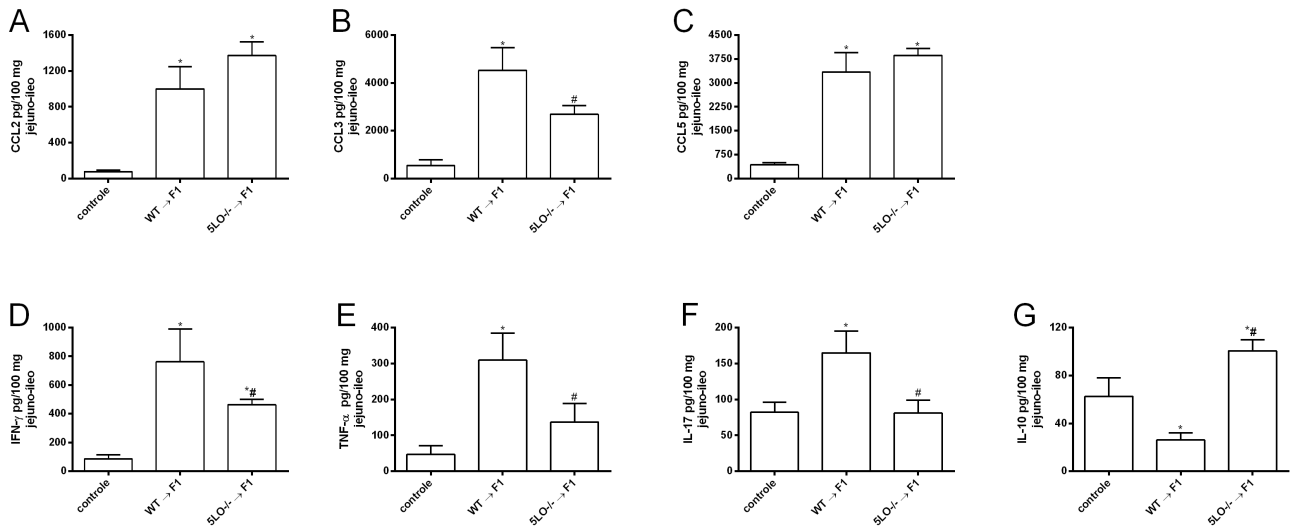


Figura 10. Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO reduz a concentração intestinal de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias envolvidas na GVHD. A GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos e células da medula de camundongos doadores semialogênicos WT ou WT 5LO^{-/-} para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos e células da medula de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. No início da mortalidade associada à doença, os camundongos foram sacrificados e as concentrações de CCL2 (A), CCL3 (B), CCL5 (C), IFN- γ (D), TNF- α (E), IL-17 (F) e IL10 (G) foram avaliadas em homogenatos do jejuno-íleo pelo ensaio de ELISA. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n = 5). * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo controle e ao grupo WT \rightarrow F1, respectivamente.

No fígado de animais submetidos à GVHD, foi observado um aumento nos níveis das quimiocinas CCL2 (Figura 11A), CCL3 (Figura 11B) e CCL5 (Figura 11C) no início da mortalidade em comparação ao grupo controle. Não houve diferença nos níveis de CCL3 e CCL5 entre os animais do grupo que receberam células selvagens ou células deficientes em 5-LO (Figura 11B-C). Entretanto, houve um aumento de CCL2 no grupo que recebeu células deficientes em 5-LO em comparação ao grupo que recebeu células selvagens e ao grupo controle (Figura 11A).

Os níveis hepáticos das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ (Figura 11D), TNF- α (Figura 11E) e IL-17 (Figura 11F) também se apresentaram elevados em animais que receberam células deficientes ou não em 5-LO em comparação ao grupo controle. Entretanto, animais que receberam células deficientes em 5-lipoxigenase mantiveram o nível da citocina anti-inflamatória IL-10 semelhante ao grupo controle, enquanto que animais que receberam células selvagens apresentaram uma redução no nível desta citocina anti-inflamatória (Figura 11G).

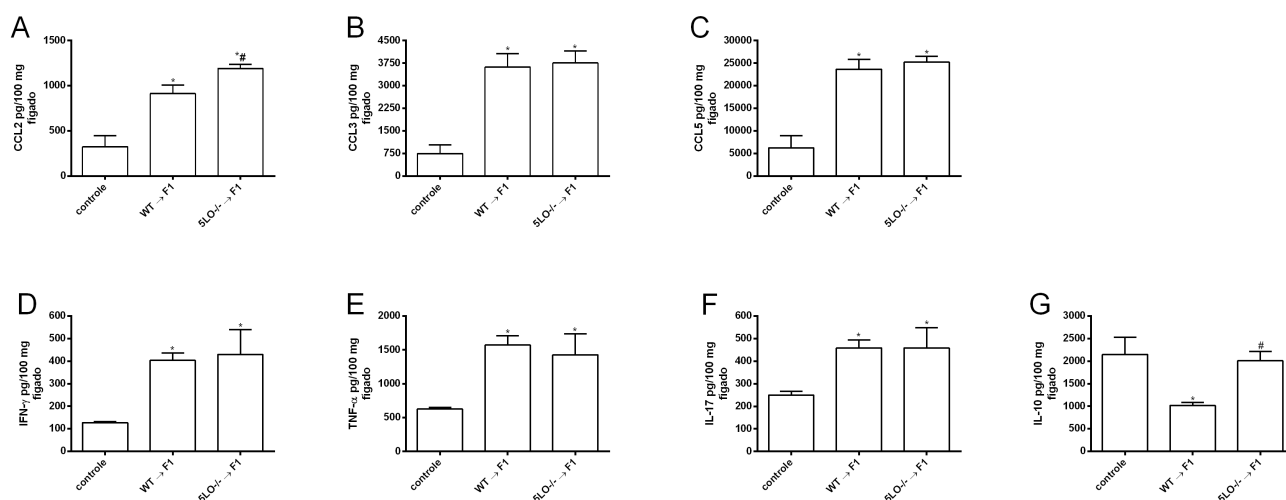


Figura 11. Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO mantém o nível da citocina anti-inflamatória IL-10 semelhante ao grupo controle. A GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos e células da medula de camundongos doadores semialogênicos WT ou WT 5LO^{-/-} para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos e células da medula de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. No início da mortalidade associada à doença, os camundongos foram sacrificados e as concentrações de CCL2 (A), CCL3 (B), CCL5 (C), IFN-γ (D), TNF-α (E), IL-17 (F) e IL10 (G) foram avaliadas em homogenatos do fígado pelo ensaio de ELISA. Os resultados são apresentados como média ± SEM (n = 5). * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo controle e ao grupo WT → F1, respectivamente.

4.4 Inibição farmacológica de 5-lipoxigenase com zileuton protege os órgãos alvo da GVHD

Embora existam várias classes de inibidores de 5-LO, apenas zileuton é aprovado para uso clínico. Zileuton foi introduzido na prática clínica em 1996 para tratamento de asma brônquica e rinite alérgica e é ainda hoje comumente utilizado (MASTALERZ; KUMIK, 2010; APAROY; REDDY; REDDANNA, 2012; STEINHILBER; HOFMANN, 2014). Dessa forma, nosso próximo passo foi avaliar os efeitos do tratamento com zileuton nos órgãos alvo da GVHD. Em animais tratados com zileuton, nós observamos uma importante redução da lesão intestinal e hepática associada à doença do enxerto-versus-hospedeiro (Figura 12). O tratamento com este fármaco resultou na preservação da arquitetura do jejuno-íleo, que apresentou moderado infiltrado inflamatório na lâmina própria e discreto acúmulo de células inflamatórias na camada muscular e serosa em comparação ao grupo submetido à GVHD e tratado com veículo (Figure 12A e 12E). No fígado, foi observado um pequeno infiltrado inflamatório ao redor da veia centrolobular no grupo de animais tratados com zileuton, diferente do grupo não tratado que apresentou intenso infiltrado inflamatório nessa região (Figura 12B e 12H). Estes resultados são similares aos apresentados anteriormente quando camundongos receberam leucócitos

deficientes em 5-LO. Em conjunto, os resultados demonstrados até agora corroboram com a hipótese de que produtos derivados da via de 5-lipoxigenase podem ser relevantes para o desenvolvimento do dano intestinal e hepático associados à GVHD em camundongos.

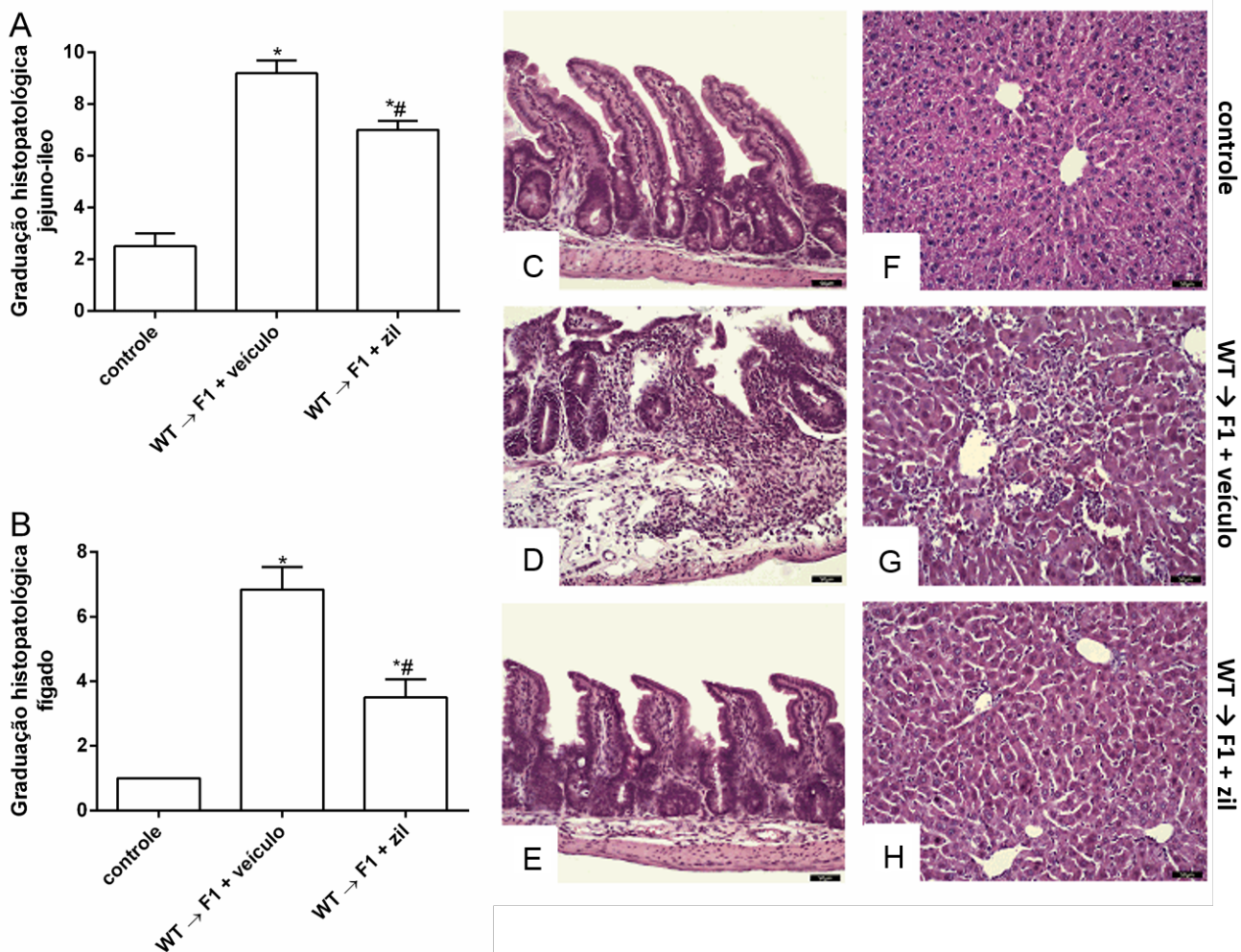


Figura 12. Tratamento com zileuton diminui a lesão de órgãos alvo da GVHD em camundongos submetidos à doença. A GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos e células da medula de camundongos doadores semialogênicos WT para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos e células da medula de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. O grupo tratado com zileuton (inibidor de 5-LO) recebeu a droga por gavagem (30mg/kg/100µl de CMC 0,1% 12 em 12hs), iniciada no dia do transplante e mantida até o início dos sinais clínicos da GVHD (10 dias após o transplante). Após indução da GVHD, os camundongos foram sacrificados e amostras do intestino (A) e fígado (B) foram coletadas para análise histopatológica no início da mortalidade associada à doença. Podem ser observados os aspectos histopatológicos de seções do intestino (C-E) e fígado (F-H) coradas com H&E nos grupos controle, WT → F1 + veículo e WT → F1 + zil, respectivamente. Escala de barra, 50 µm para todos os painéis. Os resultados são apresentados como média ± SEM (n = 5). * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo controle e ao grupo WT → F1 + veículo, respectivamente.

4.5 Tratamento com zileuton controla a resposta inflamatória associada à doença do enxerto-versus-hospedeiro

4.5.1 Acúmulo de leucócitos em órgãos linfoides

Nós demonstramos neste trabalho que o transplante de leucócitos deficientes em 5-LO reduz a proporção de células T CD4⁺ e T CD8⁺ no baço e na medula óssea. Entretanto, o tratamento com zileuton não foi capaz de reduzir a proporção dessas células no baço e na medula, apresentando valores similares aos do grupo não tratado (Figura 5). Apesar disso, o tratamento com zileuton reduziu o acúmulo de macrófagos no baço e na medula em comparação ao grupo não tratado (Figura 6).

Assim como observado para os animais que receberam transplante de leucócitos deficientes em 5-LO, o tratamento com zileuton não alterou a proporção de células Treg ou NK no baço e NK também na medula comparada aos demais grupos avaliados (Tabela 2). Ainda na medula, houve um aumento na proporção de Treg do grupo tratado com zileuton em comparação ao grupo controle, o que resultou em valores similares aos apresentados pelo grupo não tratado (Tabela 2). A proporção de células dendríticas no baço de camundongos tratados com zileuton também apresentou um aumento comparado ao grupo controle e ao grupo não tratado, conforme já observado no baço de camundongos que receberam células deficientes em 5-LO (Tabela 2). Na medula, a proporção de células dendríticas dos animais tratados com zileuton manteve-se em níveis similares a todos os outros grupos avaliados (Tabela 2). Em relação ao neutrófilo, o tratamento com zileuton não foi capaz de reduzir o aumento destas células observado no baço e na medula de camundongos submetidos à GVHD, apresentando uma proporção de neutrófilos nesses órgãos semelhante à do grupo não tratado (Tabela 2). A avaliação dos linfócitos B no baço e na medula mostrou uma redução drástica na proporção deste leucócito tanto no grupo não tratado quanto no grupo tratado com zileuton em comparação ao grupo controle (Tabela 2).

4.5.2 Acúmulo de leucócitos em órgãos alvo

Nós também avaliamos o acúmulo de leucócitos nos órgãos alvo de camundongos tratados com zileuton. No jejuno-íleo, apesar de o tratamento com zileuton não ser capaz de reduzir a proporção de LT CD4⁺ (Figura 7A e 7C) no início da mortalidade, a inibição farmacológica da via reduziu a proporção de LT CD8⁺ intestinais em comparação ao grupo não tratado (Figura 7B e 7C), assim como observado para os camundongos que receberam células deficientes em 5-LO. O tratamento com zileuton também inibiu o acúmulo de macrófagos neste órgão, apresentando níveis similares ao grupo

controle (Figura 8A). Camundongos que foram tratados com zileuton mantiveram a proporção de células dendríticas no jejuno-íleo em valores próximos aos observados no grupo controle e no grupo que recebeu células deficientes em 5-LO, em contraste com a grande redução da proporção dessas células no grupo não tratado (Figura 8B e 8D). A proporção de células T reg no jejuno-íleo de animais tratados com zileuton permaneceu semelhante à proporção observada no grupo controle e no grupo que recebeu leucócitos deficientes em 5-LO, enquanto que no grupo não tratado, houve uma redução drástica na proporção dessas células. O tratamento com zileuton não alterou a proporção de células NK em comparação ao grupo não tratado. Em ambos os grupos, houve uma redução na proporção desta célula em comparação à proporção observada no grupo controle (Tabela 3). O tratamento com zileuton também não modificou a proporção de LB ou neutrófilos intestinais, mantendo-se em valores semelhantes aos observados para os demais grupos avaliados (Tabela 3).

A análise do acúmulo de leucócitos no fígado de animais tratados com zileuton no início da mortalidade demonstrou uma reduzida proporção de linfócitos T CD8⁺ neste órgão quando comparada ao grupo não tratado, apresentando valores similares aos observados nos camundongos que receberam células deficientes em 5-LO (Figura 9A e 9C). Foi observada ainda uma inibição do acúmulo de macrófagos hepáticos em camundongos tratados com zileuton, apresentando um número relativo de macrófagos similar ao grupo controle (Figure 9B). O tratamento com zileuton não modificou a proporção de células NK no fígado, que permaneceu semelhante à proporção apresentada pelos demais grupos (Tabela 4). Em relação à Treg, camundongos tratados com zileuton também apresentaram um pequeno aumento na proporção dessas células, assim como observado nos grupos que receberam células deficientes ou não em 5-LO em comparação ao grupo controle (Tabela 4). Diferente do observado em camundongos que receberam células deficientes em 5-LO, o tratamento com zileuton não foi capaz de reduzir a proporção de neutrófilos hepáticos, apresentando valor semelhante ao grupo não tratado (Tabela 4). O tratamento com zileuton também não foi capaz de reverter a redução de LB e de células dendríticas observadas no grupo não tratado, resultando em reduzida proporção dessas células em comparação ao grupo controle (Tabela 4).

4.5.3 Recrutamento e adesão de leucócitos em vênulas mesentéricas

O papel de LTB4 no desenvolvimento de respostas inflamatórias através da ação direta na quimiotaxia e adesão de leucócitos em células endoteliais já está bem descrito. Dessa forma, nosso próximo experimento foi realizado com o objetivo de avaliar se camundongos tratados com zileuton apresentariam uma redução no recrutamento e/ou adesão de leucócitos em vênulas do mesentério

intestinal. Para tanto, após 10 dias de tratamento com zileuton, os animais foram submetidos ao experimento de microscopia intravital dos vasos mesentéricos e os valores de rolamento e adesão de leucócitos obtidos foram comparados aos observados em camundongos controle e camundongos submetidos à GVHD sem tratamento. Nós observamos que a indução da GVHD com células de camundongos selvagens e o tratamento com veículo aumenta o rolamento e a adesão de leucócitos nas vênulas mesentéricas 10 dias após o transplante. O grupo tratado com zileuton apresentou uma inibição tanto do rolamento (Figura 13A) quanto da adesão (Figura 13B) destes leucócitos nas vênulas mesentéricas, apresentando valores similares aos observados no grupo controle (Figura 13A-B).

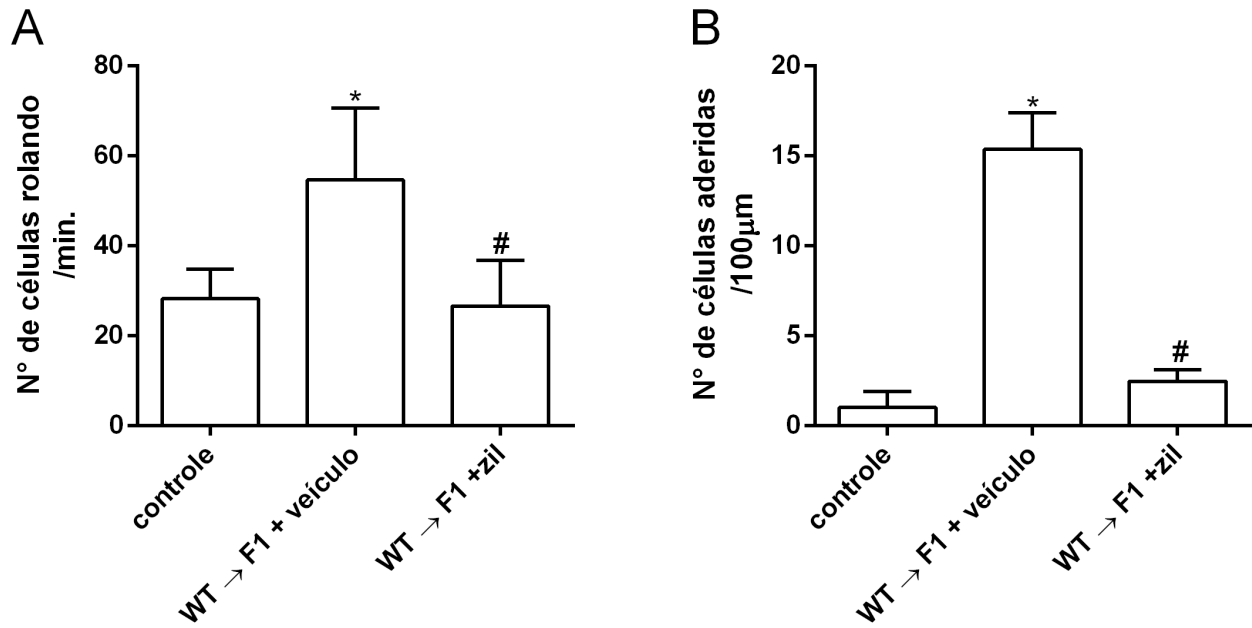


Figura 13. Tratamento com zileuton diminui o rolamento e a adesão de leucócitos na microvasculatura mesentérica de camundongos submetidos à GVHD. A GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos e células da medula de camundongos doadores semialogênicos WT para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos e células da medula de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. O grupo tratado com zileuton (inibidor de 5-LO) recebeu a droga por gavagem (30mg/kg/100µl de CMC 0,1% 12 em 12hs), iniciada no dia do transplante e mantida até o início dos sinais clínicos da GVHD (10 dias após o transplante). No 10º dia após o transplante, os camundongos foram anestesiados e vênulas intestinais ($\pm 80 \mu\text{m}$) foram selecionadas para contagem do número de leucócitos rolando e aderidos através da microscopia intravital. Número de células rolando por minuto (A) e número de células aderidas por 100 μm (B). Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n = 5). * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo controle e ao grupo WT \rightarrow F1 + veículo, respectivamente.

4.5.4 Redução dos níveis de quimiocinas e citocinas em órgãos alvo da GVHD

No grupo tratado com zileuton, todas as quimiocinas intestinais avaliadas apresentaram uma diminuição em comparação ao grupo tratado apenas com veículo (Figura 14A-C). Os níveis hepáticos de CCL2 e CCL3 também foram reduzidos após o tratamento com zileuton quando comparado ao grupo não tratado (Figura 14D-E). Não foi observada nenhuma modificação nos níveis hepáticos de CCL5 entre o grupo tratado ou não com zileuton, ambos se apresentando elevados em comparação ao grupo controle (Figura 14F).

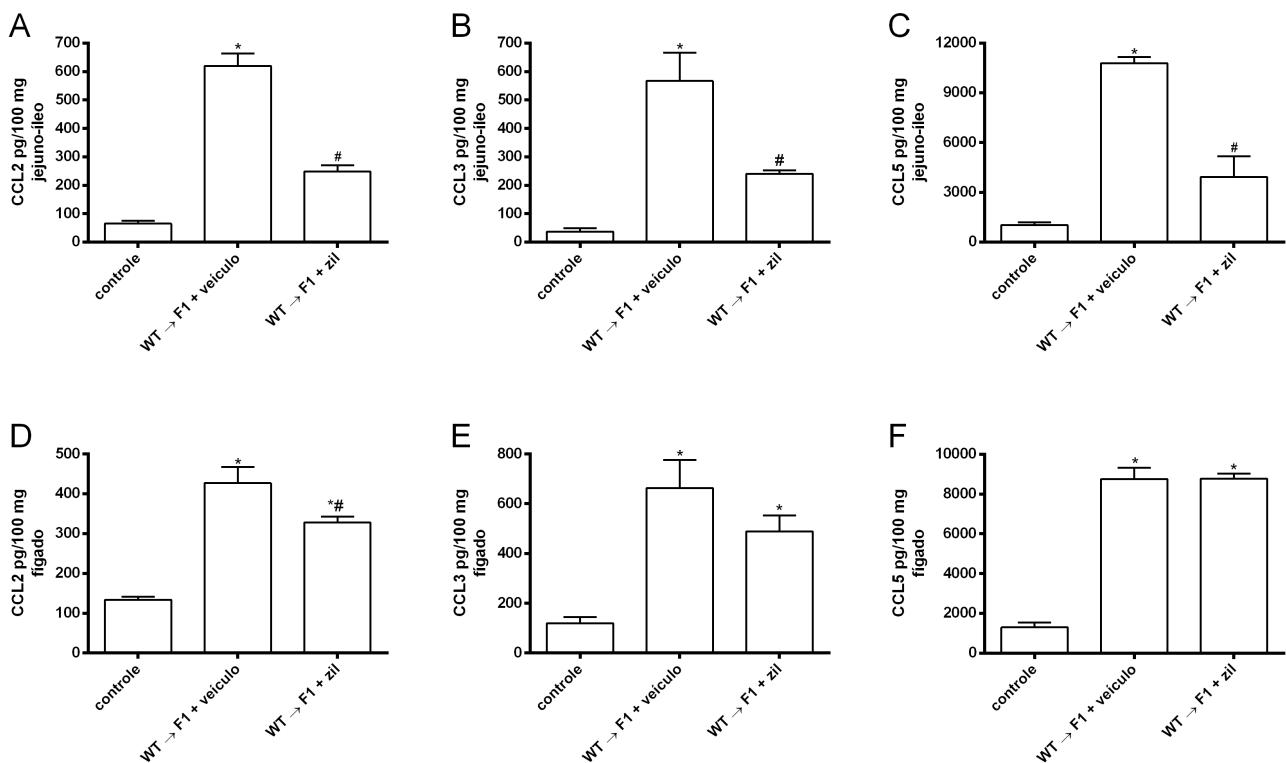


Figura 14. Tratamento com zileuton reduz quimiocinas intestinais e hepáticas em camundongos submetidos à GVHD. A GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos e células da medula de camundongos doadores semialogênicos WT para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos e células da medula de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. O grupo tratado com zileuton (inibidor de 5-LO) recebeu a droga por gavagem (30mg/kg/100µl de CMC 0,1% 12 em 12hs), iniciada no dia do transplante e mantida até o início dos sinais clínicos da GVHD (10 dias após o transplante). No início da mortalidade associada à doença, os camundongos foram sacrificados e as concentrações de CCL2 (A, D), CCL3 (B, E) e CCL5 (C, F), foram avaliadas em homogenatos do jejuno-íleo e do fígado pelo ensaio de ELISA. Os resultados são apresentados como média ± SEM (n = 5). * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo controle e ao grupo WT → F1 + veículo, respectivamente.

Camundongos tratados com zileuton também mostraram níveis intestinais reduzidos de IFN- γ , TNF- α , IL-17 e IL-12 comparado ao grupo tratado apenas com veículo (Figura 15A-D). Além disso, houve uma redução nos níveis de IFN- γ (Figura 15E) e IL-17 (Figura 15G) no fígado de animais tratados com zileuton. Já os níveis hepáticos de TNF- α não se apresentaram alterados em nenhum grupo avaliado (Figura 15B) e os níveis de IL-12 foram similares entre o grupo tratado e o não tratado (Figura 15H). Não foram observadas diferenças nos níveis intestinais e hepáticos de IL-10 entre os animais tratados ou não com zileuton (dados não mostrados).

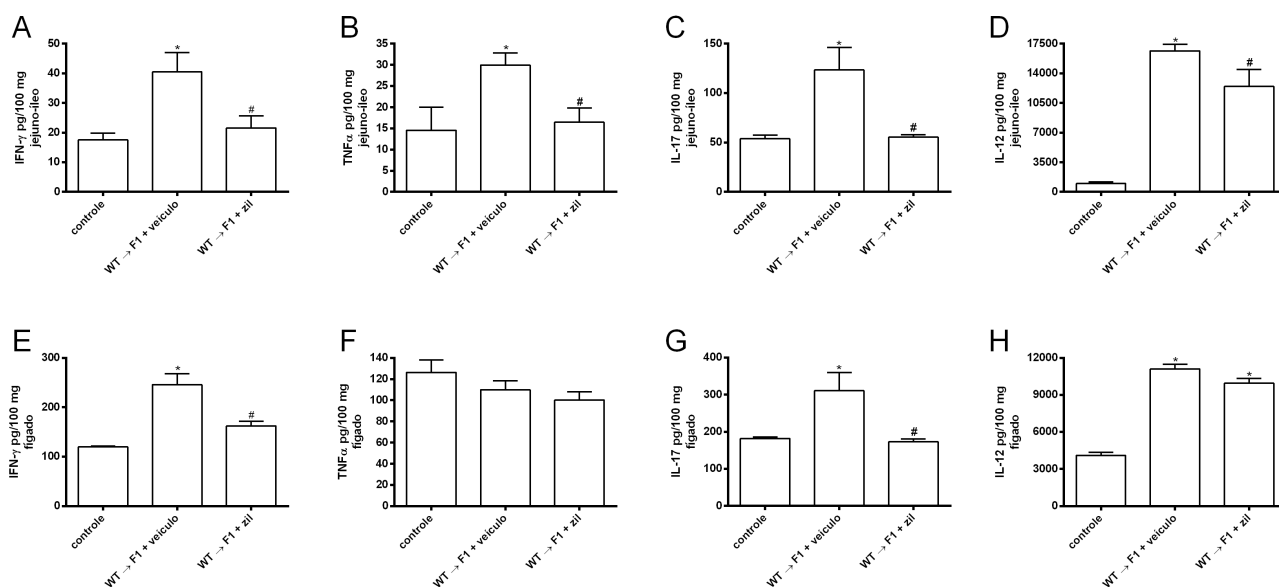


Figura 15. Tratamento com zileuton reduz citocinas intestinais e hepáticas em camundongos submetidos à GVHD. A GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos e células da medula de camundongos doadores semialogênicos WT para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos e células da medula de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. O grupo tratado com zileuton (inibidor de 5-LO) recebeu a droga por gavagem (30mg/kg/100 μ l de CMC 0,1% 12 em 12hs), iniciada no dia do transplante e mantida até o início dos sinais clínicos da GVHD (10 dias após o transplante). No início da mortalidade associada à doença, os camundongos foram sacrificados e as concentrações de CCL2 (A), CCL3 (B), CCL5 (C), IFN- γ (D), TNF- α (E), IL-17 (F) e IL10 (G) foram avaliadas em homogenatos do fígado pelo ensaio de ELISA. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n = 5). * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo controle e ao grupo WT \rightarrow F1 + veículo, respectivamente.

Os resultados expostos até aqui nos conduzem à hipótese de que a redução intestinal e hepática destas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias podem estar associadas à redução do acúmulo de leucócitos observada anteriormente após o transplante de células deficientes em 5-LO ou o tratamento com zileuton. Em conjunto, esses resultados são consistentes com nossos dados apresentados anteriormente que demonstram uma redução na lesão de órgãos alvo da GVHD após a inibição da via de 5-LO.

4.6 Expressão de mRNA de 5-LO e produção de LTB4 em camundongos submetidos à GVHD

O nosso próximo passo foi verificar a produção de LTB4 durante a GVHD. Primeiramente, verificamos se havia uma modificação na expressão do mRNA de 5-LO. Embora tenhamos observado um aumento da expressão de 5-lipoxigenase no jejuno-íleo de camundongos submetidos a um modelo mais brando de GVHD no início da mortalidade (dados não mostrados), foi observada uma menor expressão do mRNA para 5-LO no intestino de camundongos submetidos ao modelo mais grave de GVHD, o qual foi utilizado neste trabalho (Figura 16A). Neste modelo, nós ainda realizaremos em breve essa análise nas fases iniciais da doença. No fígado, não houve diferença na expressão de mRNA de 5-LO no início da mortalidade entre o grupo controle e o grupo submetido à GVHD (Figura 16B).

Nosso próximo passo foi investigar se havia diferença na produção de LTB4. Para isso, os níveis de LTB4 foram avaliados no soro, no jejuno-íleo e no fígado no 3º dia após o transplante e no início da mortalidade em camundongos que receberam leucócitos deficientes ou não em 5-LO e em camundongos submetidos à GVHD tratados ou não com zileuton (Figura 16C-E). No terceiro dia após o transplante, houve um aumento de LTB4 no soro de animais submetidos à GVHD e tratados com veículo em comparação ao grupo controle, o que não ocorreu nos camundongos tratados com zileuton (Figura 16C). Nos animais que receberam células deficientes em 5-LO não foi detectado LTB4 nessa fase (Figura 16C). No jejuno-íleo, os níveis de LTB4 no 3º dia pós-transplante apresentaram-se elevados em todos os grupos avaliados em relação ao grupo controle (Figura 16D). Já no fígado, nessa fase da doença, não foram observadas diferenças nos níveis de leucotrieno B4 entre o grupo controle e o grupo submetido à GVHD e tratado com veículo. Foi observado um menor nível de LTB4 neste órgão tanto no grupo que recebeu células deficientes em 5-LO quanto no grupo de animais tratados com zileuton, em comparação ao grupo controle e ao grupo submetido à GVHD (Figura 16E).

No início da mortalidade, foi observado um aumento dos níveis de LTB4 no soro, no jejuno-íleo e no fígado em todos os grupos avaliados quando comparados aos níveis obtidos no 3º dia após o transplante e aos níveis basais apresentados por camundongos que não foram submetidos à irradiação ou transplante (representado nos gráficos pela linha pontilhada) (Figura 16). No sangue, os níveis de LTB4 atingidos no início da mortalidade foram semelhantes no grupo controle e nos camundongos que receberam células selvagens (Figura 16C). Foram observados menores níveis séricos deste eicosanoide tanto no grupo que recebeu células deficientes em 5-LO quanto no grupo tratado com zileuton comparado ao grupo que recebeu células de camundongos selvagens e não foi tratado e ao grupo controle (Figura 16C). No intestino, os níveis de leucotrieno atingidos nesse período da doença foram semelhantes para todos os grupos (Figura 16D). Por outro lado, foi observado um aumento nos níveis

hepáticos de LTB4 nos camundongos submetidos à GVHD em comparação ao grupo controle (Figura 16E). Por sua vez, tanto o grupo que recebeu células deficientes em 5-LO quanto o grupo de animais submetidos à GVHD e tratados com zileuton apresentaram uma redução na produção de LTB4 hepática comparada ao grupo controle (Figura 16E).

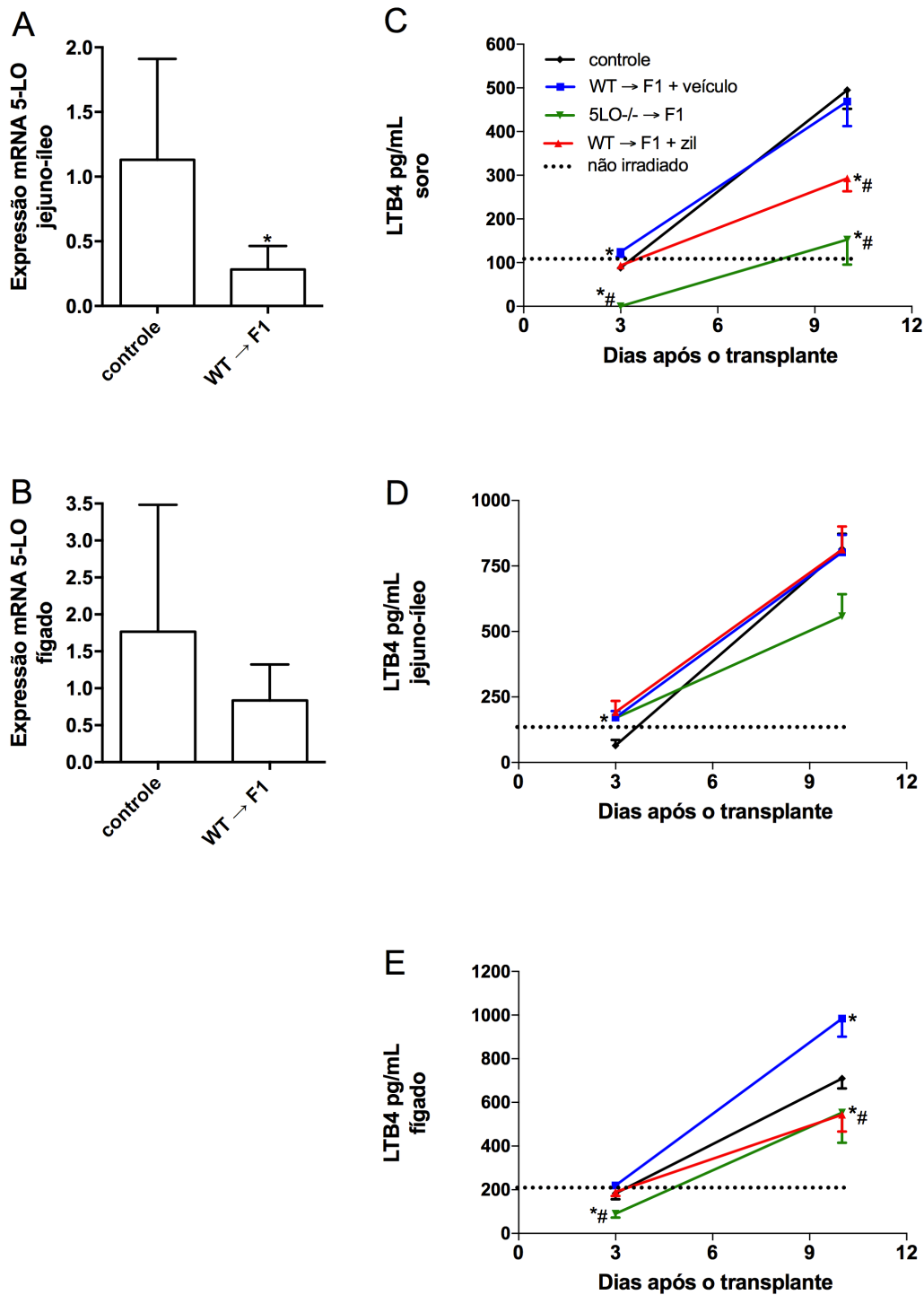


Figura 16. Expressão da enzima 5-LO e produção de LTB4 em camundongos submetidos à GVHD. A GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos e células da medula de camundongos doadores semialogênicos WT ou WT 5LO^{-/-} para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos e células da medula de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. O grupo tratado com zileuton (inibidor de 5-LO) recebeu a droga por gavagem (30mg/kg/100µl de CMC 0,1% 12 em 12hs), iniciada no dia do transplante e mantida até o início dos sinais clínicos da GVHD (10 dias após o transplante). No início da mortalidade, os camundongos foram sacrificados e amostras do jejuno-íleo (A) e fígado (B) foram coletadas para análise do mRNA de 5-LO. Amostras de soro (C), jejuno-íleo (D) e fígado (E) foram coletadas também no 3º dia após o transplante e no início da mortalidade para dosagem de LTB4. A linha pontilhada representa os valores basais de LTB4 nos órgãos de animais não submetidos à irradiação ou transplante (C-E). Os resultados são apresentados como média ± SEM (n = 5). * e # P < 0.05 quando comparados ao grupo controle e ao grupo WT → F1 + veículo, respectivamente.

Esses dados demonstram que a participação da via da 5-lipoxigenase na GVHD não depende do aumento da expressão gênica da enzima e que a produção de LTB4 na doença é complexa. Experimentos para avaliação da atividade da enzima serão realizados afim de esclarecer os mecanismos pelos quais o bloqueio da via nas células doadas ou o tratamento com zileuton reduz a GVHD.

4.7 Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou tratamento com zileuton reduz os sinais clínicos e a mortalidade em camundongos submetidos à GVHD

Nossos dados expostos até agora demonstraram que a via de 5-lipoxigenase contribui para o desenvolvimento da GVHD de forma sistêmica e a intervenção nesta via, tanto pelo transplante de leucócitos deficientes em 5-LO quanto pela inibição farmacológica utilizando zileuton resultou em redução da resposta inflamatória em órgãos linfoides e em órgãos alvo da doença, e na proteção intestinal e hepática. Uma vez que a inflamação sistêmica associada à GVHD seguida da lesão grave do intestino e fígado estão associadas à alta morbidade e mortalidade observada na doença, nosso próximo passo foi avaliar se o transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou o tratamento com zileuton poderia resultar em menor morbidade e mortalidade dos animais. Para tanto, experimentos de análise da sobrevida e sinais clínicos da GVHD foram realizados.

Para a avaliação da sobrevida e dos sinais clínicos em camundongos que receberam células deficientes em 5-LO, foi realizado um primeiro experimento onde camundongos do grupo controle não desenvolveram a doença e apresentaram 100% de sobrevivência até o final do experimento. Camundongos que receberam esplenócitos e células da medula óssea de camundongos selvagens desenvolveram GVHD aguda, o que foi confirmado por 100% de letalidade no vigésimo quarto dia após a indução da doença (Figura 17A), acentuada perda do peso corporal (Figura 17B) e graduação clínica elevada, atingindo uma escala de 13 pontos (Figura 17C). Em contraste, o grupo que recebeu células deficientes em 5-LO apresentou efetiva proteção da doença, resultando em 83% de sobrevivência e significativa redução da perda de peso e graduação clínica da doença quando comparado aos animais submetidos ao transplante de células selvagens (Figura 17A-C). É interessante notar que os animais que receberam células deficientes em 5-LO mantiveram-se vivos (83% de sobrevivência) até o 38º dia pós-transplante, quando foram sacrificados (Figura 17A).

Posteriormente, para avaliação da sobrevida e sinais clínicos da doença associado ao tratamento com zileuton, realizamos um segundo experimento onde a indução da GVHD foi realizada com leucócitos de camundongos WT e um grupo foi tratado com zileuton por gavagem (30mg/kg/100µl de CMC 0,1% de 12 em 12hs), iniciada no dia do transplante e mantida até o início dos sinais clínicos da GVHD (10 dias após o transplante) e o outro grupo foi tratado apenas com veículo. Camundongos do grupo controle não desenvolveram a doença e apresentaram 100% de sobrevivência até o final do experimento. Camundongos submetidos à GVHD e tratados apenas com veículo desenvolveram a doença, o que foi confirmado por 100% de letalidade no trigésimo dia após o transplante (Figura 17D), acentuada perda do peso corporal (Figura 17E) e graduação clínica elevada, atingindo uma escala de 12

pontos (Figura 17F). Em contraste, o grupo que foi submetido à GVHD e tratado com zileuton, apresentou efetiva proteção da doença de forma semelhante aos animais que receberam células deficientes em 5-LO resultando em 100% de sobrevivência e significativa redução da perda de peso e graduação clínica da doença quando comparado aos animais do grupo não tratado (Figura 17D-F). Os animais tratados com zileuton mantiveram-se vivos (100% de sobrevivência) até o 40º dia pós-transplante, quando foram sacrificados (Figura 17D).

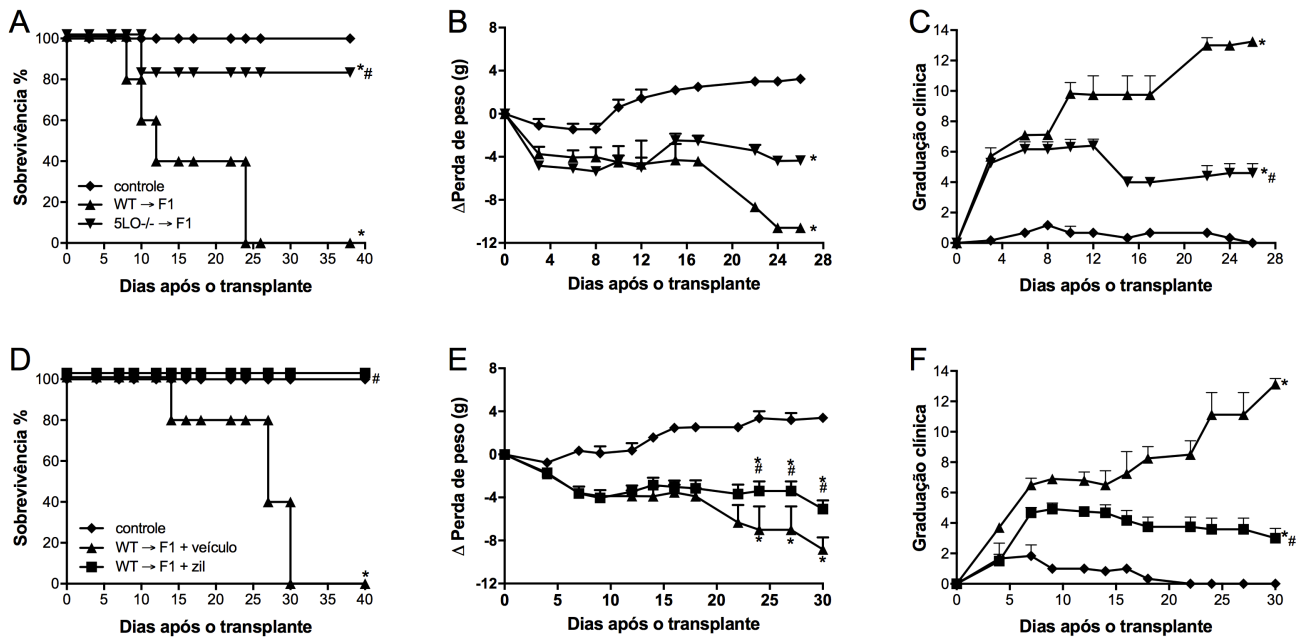


Figura 17. Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou tratamento com zileuton estão associados à redução da mortalidade, controle da perda de peso corporal e melhora dos sinais clínicos da GVHD. A GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos e células da medula de camundongos doadores semialogênicos WT ou WT 5LO-/- para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos e células da medula de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. O grupo tratado com zileuton (inibidor de 5-LO) recebeu a droga por gavagem (30mg/kg/100µl de CMC 0,1% 12 em 12hs), iniciada no dia do transplante e mantida até o início dos sinais clínicos da GVHD (10 dias após o transplante). No primeiro experimento (A-C), após indução da GVHD com leucócitos deficientes ou não para 5-LO, os camundongos foram monitorados a cada 2 dias para sobrevivência (A), controle do peso corporal (B) e ocorrência dos sinais clínicos da GVHD (C) e os grupos foram representados como segue: grupo controle (♦, n=4); grupo WT → F1 (▲, n=6) e grupo 5LO-/- → F1 (▼, n=6). No segundo experimento (D-F), após a indução da GVHD com leucócitos de WT e tratamento com zileuton ou veículo, os camundongos foram monitorados a cada 2 dias para sobrevivência (D), controle do peso corporal (E) e ocorrência dos sinais clínicos da GVHD (F) e os grupos foram representados como segue: grupo controle (♦, n=4); grupo WT → F1 + veículo (▲, n=6) e grupo WT → F1 + zil (■, n=6). Os resultados são apresentados como média ± SEM e * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo controle e ao grupo WT → F1 ou WT → F1 + veículo, respectivamente.

4.8 Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou tratamento com zileuton controla a GVHD sem interferir na reconstituição da medula óssea

Nosso próximo experimento teve como objetivo avaliar a proporção de células $H2^{D^+}H2^{B^+}$ (marcadores de superfície das células de camundongos B6D2F1) e a proporção de células $H2^{B^+}$ (marcador de superfície das células de camundongos C57BL/6 e SV129) no baço e na medula óssea de camundongos submetidos à GVHD para avaliar a “pega do enxerto”. O grupo controle, que recebeu células singênicas, apresentou predominantemente, células $H2^{D^+} H2^{B^+}$ (Figura 18B, 18E e 18G). Já os animais dos grupos que receberam células semialogênicas selvagens ou deficientes em 5-LO e foram tratados ou não com zileuton, apresentaram em sua maioria, células $H2^{B^+}$ (Figura 18A, 18E e 18G) e uma menor proporção de células $H2^{D^+} H2^{B^+}$ tanto no baço quanto na medula óssea (Figura 18B, 18E e 18G). Estes resultados demonstram que o transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou o tratamento com zileuton não interferem na reconstituição da medula óssea. Após o transplante, todos os grupos que foram submetidos à GVHD apresentaram predominantemente células advindas do doador, tanto no baço quanto na medula, confirmando a capacidade de reconstituição da medula óssea nestes animais.

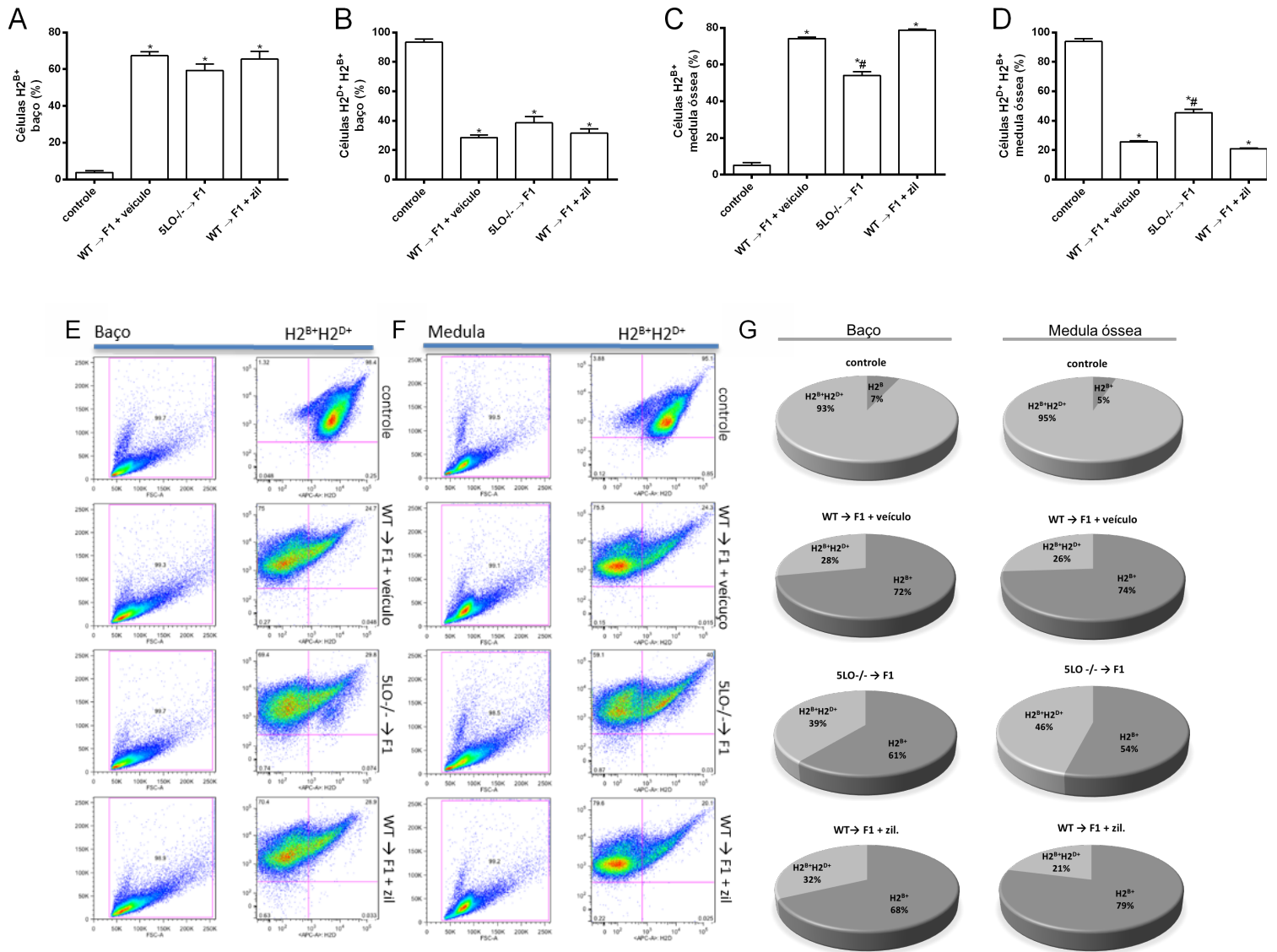


Figura 18. Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou tratamento com zileuton não altera a reconstituição de células doadas nos órgãos hematopoiéticos. A GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos e células da medula de camundongos doadores semialogênicos WT ou WT 5LO^{-/-} para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos e células da medula de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. O grupo tratado com zileuton (inibidor de 5-LO) recebeu a droga por gavagem (30mg/kg/100µl de CMC 0,1% 12 em 12hs), iniciada no dia do transplante e mantida até o início dos sinais clínicos da GVHD (10 dias após o transplante). No início da mortalidade, os camundongos foram sacrificados e a porcentagem de células H2^{B+} H2^{D+} (marcadores de células B6D2F1) (B, D, E, F e G) e de células H2^{B+} (marcadores de células de C57BL/6 e SV129) (A, C, E, F e G) no baço e na medula óssea foram avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados são apresentados como média ± SEM e * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo controle e ao grupo WT → F1 ou WT → F1 + veículo, respectivamente.

4.9 Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou tratamento com zileuton mantém a resposta benéfica do GVL

Uma vez que observamos um controle da doença do enxerto-versus-hospedeiro em camundongos que receberam o transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou foram tratados com zileuton, nós realizamos um experimento para avaliar a resposta do enxerto-versus-leucemia nesses animais. No grupo controle, submetido ao transplante de células singênicas associado à infusão de células tumorais, cerca de 62% das células analisadas no baço eram GFP⁺, demonstrando o crescimento dessas células no órgão (Figura 19A e 19B). O grupo controle submetido ao transplante de células singênicas associado à infusão de células tumorais e tratado com zileuton apresentou uma redução na proporção das células P815 GFP⁺, evidenciando um possível efeito anti-tumoral da droga (Figura 19A e 19C). Animais submetidos à GVHD e não tratados apresentaram uma grande redução na proporção de células tumorais, representada por cerca de 15% das células do baço (Figura 19A e 19D). Os animais que receberam células deficientes em 5-LO ou foram tratados com zileuton mantiveram a capacidade de reação contra as células tumorais, apresentando uma proporção de células P815 GFP⁺ semelhante ao grupo que recebeu células selvagens e não foi tratado (Figura 19A e 19E-F).

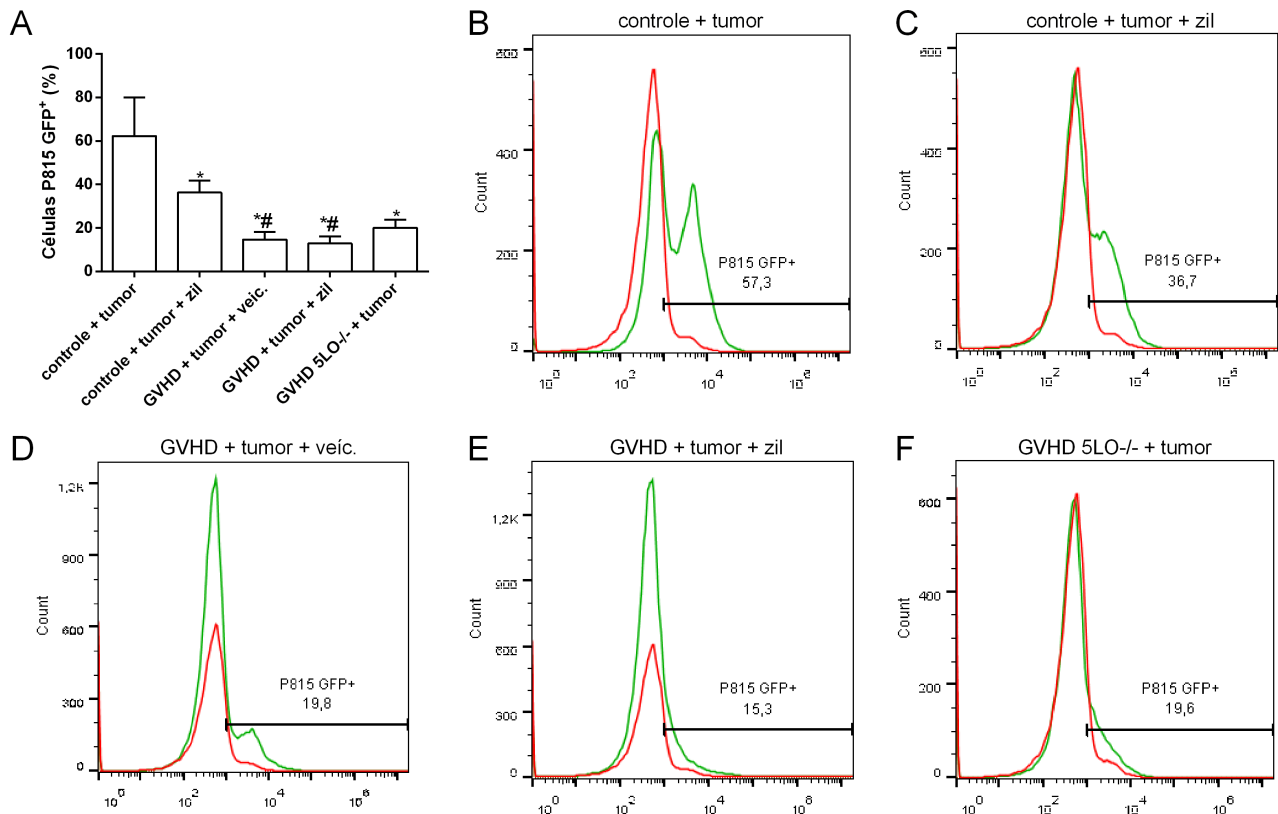


Figura 19. Transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou tratamento com zileuton mantém a resposta benéfica do GVL. A GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos e células da medula de camundongos doadores semialogênicos WT ou WT 5LO^{-/-} para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos e células da medula de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram GVHD e foram denominados como grupo controle. No mesmo dia do transplante, todos os grupos receberam a infusão intravenosa de 6000 células tumorais P815 GFP⁺. Os grupos tratados com zileuton (inibidor de 5-LO) receberam a droga por gavagem (30mg/kg/100μl de CMC 0,1% 12 em 12hs), iniciada no dia do transplante e mantida até o 5^o dia após o início do experimento. Após 5 dias, os camundongos foram sacrificados e a porcentagem de células P815 GFP⁺ no baço foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados são apresentados como média ± SEM e * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo controle + tumor e ao grupo controle + tumor + zil, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

A doença do enxerto-versus-hospedeiro ainda é a complicação mais grave do transplante de células-tronco hematopoiéticas. Vários estudos sobre o papel das células T regulatórias, células T efetoras e citotóxicas e células apresentadoras de antígenos têm levado a uma melhor compreensão da fisiopatologia da GVHD. No entanto, pouco progresso tem sido observado em relação a estratégias terapêuticas utilizadas no manejo da doença (CHOI; REDDY, 2014). Apesar da profilaxia padrão que consiste geralmente na administração endovenosa de ciclosporina A associada ou não ao metotrexato e à prednisona (drogas imunossupressoras) no dia anterior ao transplante e mantida por até 3 meses, a GVHD ainda se desenvolve em aproximadamente 40 a 60% dos receptores de transplante de medula óssea (BLAZAR et al., 2012; CHOI; REDDY, 2014). Nesse contexto, novas drogas têm sido desenvolvidas tanto para serem utilizadas como primeira linha de tratamento como para terapêutica da doença do enxerto-versus-hospedeiro refratária a esteroides. Ainda assim, não existe um consenso sobre a melhor estratégia para manejo da GVHD, sendo de grande relevância o estudo da fisiopatologia da doença. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi compreender a participação da via metabólica envolvendo a atividade enzimática da 5-lipoxigenase no desencadeamento e na progressão da GVHD.

Nós observamos neste trabalho que o transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou o tratamento com zileuton (1) reduziu a lesão intestinal e hepática associada à GVHD, (2) diminuiu o acúmulo de leucócitos em órgãos linfoides e órgãos alvo da doença, além de (3) reduzir a concentração de citocinas e quimiocinas intestinais e hepáticas, (4) os níveis séricos e hepáticos de LTB₄ e (5) o recrutamento e a adesão de leucócitos em vênulas mesentéricas. A redução da resposta inflamatória sistêmica e lesão de órgãos alvo no grupo que recebeu células deficientes em 5-LO ou no grupo tratado com zileuton resultou na (6) redução dos sinais clínicos e mortalidade, sem (7) interferir na reconstituição da medula óssea e (8) no efeito benéfico do enxerto-versus-leucemia.

A via metabólica envolvendo a enzima 5-lipoxigenase tem sido alvo de muitos estudos, incluindo a sua participação na patogênese da doença de Alzheimer (JOSHI; PRATICÒ, 2015), aterosclerose (MEHRABIAN; ALLAYEE, 2003), doenças do sistema cardiovascular (OSHER; WEISINGER; LIMOR, 2006), lesão pancreática (KNAB et al., 2015) e colite (ZINGARELLI et al., 1993; BREGANÓ et al., 2014). Entretanto, a sua participação na doença do enxerto-versus-hospedeiro ainda não foi descrita. Em nosso trabalho, nós observamos que o bloqueio genético ou farmacológico da via de 5-LO contribuiu para uma menor lesão intestinal e hepática de camundongos submetidos à GVHD. Este dado é relevante, uma vez que cerca de 50% dos pacientes que desenvolvem GVHD apresentam lesão no intestino e no fígado e isto está associado à morbidade da doença. A apoptose de células desses órgãos resulta em perda de função e, conseqüentemente,

sintomas clínicos que incluem diarreia e hiperbilirrubinemia, demonstrando que a intervenção nesta via pode ser importante para o manejo clínico da GVHD (ROBB; HILL, 2012).

Além de observamos uma menor lesão intestinal e hepática nos animais que receberam leucócitos deficientes em 5-LO, nós observamos uma redução na proporção de LT CD4 e T CD8 no baço e na medula destes animais. Vários estudos já demonstraram que o baço pode ser considerado um órgão alvo da GVHD (SCHATTENFROH et al.,1995; KATAOKA et al., 2001; NEW et al., 2002). A GVHD esplênica é caracterizada por atrofia linfóide, desorganização estrutural, necrose focal, aumento de IFN- γ , CCL3, CCL2, CXCL2 e CXCL9. Isto ocorre porque após o transplante de medula óssea, LT CD4 e LT CD8 doados migram inicialmente para os órgãos linfóides e se proliferam em resposta aos aloantígenos, além de induzirem a morte de LT do receptor por apoptose mediada por Fas/FasL. Modelos animais vêm estabelecendo também a medula óssea como um órgão alvo da GVHD, mostrando que a doença afeta a hematopoiese e o desenvolvimento linfóide (MULLER et al., 2010; von BONIN; BORNHÄUSER, 2014; SZYSKA; NA, 2016). Assim como observado no baço, foi demonstrado em modelo animal de GVHD que linfócitos T advindos do doador migram para a medula óssea aonde são ativados, prejudicam a hematopoiese e destroem nichos de formação de células, incluindo osteoblastos e células do endotélio vascular por aumento da expressão de Fas (YAO et al., 2014). Resultados semelhantes foram obtidos em pacientes com GVHD, que apresentaram grande infiltrado de LT doados na medula óssea e redução de osteoblastos (MENSEN et al, 2014). A GVHD de medula óssea está associada ainda à produção de TNF- α e IL-1 que estimulam o aumento da expressão de MHC de classe II, CD40, moléculas de adesão e aumento da permeabilidade vascular, facilitando a ativação e chegada de células do sistema imune inato, além de linfócitos alorreativos no órgão (SZYSKA; NA, 2016). Após a proliferação dos linfócitos T doados no baço e na medula, ocorre a migração dessas células para o intestino e para o fígado, desencadeando grave resposta inflamatória e lesão nesses órgãos (SCHATTENFROH et al.,1995; KATAOKA et al., 2001; NEW et al., 2002). Dessa forma, nós acreditamos que a redução de LT CD4 e LT CD8 no baço e na medula de camundongos que receberam leucócitos deficientes em 5-LO pode ter contribuído na fase inicial do desencadeamento da GVHD, reduzindo a ativação e proliferação dessas células nestes órgãos linfóides e conseqüentemente, reduzindo a migração posterior para os demais órgãos alvo.

Corroborando com os resultados de redução de LT CD4 e CD8 na medula e no baço, nós também observamos uma redução dessas células no intestino e no fígado de camundongos que receberam leucócitos deficientes em 5-LO. Apesar de zileuton não reduzir a proporção de LT CD4 no baço, na medula ou no intestino, houve uma redução de LT CD8 no fígado após o bloqueio da via metabólica de 5-LO causado por esta droga. A manipulação farmacológica de linfócitos T permanece sendo a principal estratégia para profilaxia da doença. A depleção destas células é uma maneira efetiva

para prevenção da GVHD, uma vez que evita a sua proliferação e ativação nos órgãos linfoides e posterior migração para os órgãos alvo (CHOI; REDDY, 2014). Já no regime de condicionamento, a lesão do intestino e do fígado causada pela irradiação ativa APC's do receptor. A interação destas células com linfócitos T do doador na fase de ativação da GVHD em resposta a diferenças de MHC de classe II induz a diferenciação dessas células em LT CD4 enquanto que as diferenças de MHC de classe I induz a diferenciação das células em LT CD8 (JAMIL; MINEISHI, 2015). A produção exacerbada de diferentes citocinas, tais como IL-6, 1L-4, 1L-12 e TGF-B observada nesta fase, induz a diferenciação dessas células nos subtipos Th1, Th2, Th17, Tc1 e Tc17 e agravam ainda mais a lesão destes órgãos, seja por produção de mais citocinas e recrutamento de outros leucócitos, seja pela citotoxicidade direta mediada por linfócitos T citotóxicos e seus subtipos, resultando na perpetuação da GVHD e à morte caso não sejam utilizadas medidas terapêuticas eficazes para o controle da doença (BLAZAR; MURPHY; ABEDI, 2012; MARKEY, MACDONALD, HILL, 2014). Nesse contexto, a redução de LT CD4 e LT CD8 no intestino e no fígado após o bloqueio da via de 5-LO é coerente com os nossos resultados de proteção intestinal e hepática observada em camundongos que receberam células deficientes em 5-LO ou foram tratados com zileuton.

O tratamento com zileuton ou o transplante de leucócitos deficientes em 5-LO reduziu ainda a proporção de macrófagos no baço, na medula, no fígado e no intestino dos camundongos submetidos à GVHD. Macrófagos contribuem de forma significativa na fisiopatologia da doença, uma vez que atuam como célula fagocitária, participam da apresentação de antígenos para linfócitos T, expressam numerosos receptores para citocinas pró-inflamatórias e produzem mediadores inflamatórios importantes como espécies reativas de oxigênio e várias citocinas, incluindo TNF- α (FIEREN, 2012). Dessa forma, a redução da quantidade dessas células nos animais tratados com zileuton ou transplantados com células deficientes em 5-LO pode ter contribuído para o controle da doença. Corroborando com os nossos resultados de redução de macrófagos no fígado após bloqueio de 5-LO, um trabalho recente publicado por Li et al. (2014) demonstrou que 5-lipoxigenase participa da falência hepática aguda induzida por D-galactosamina em ratos, associada à necrose hepática, níveis elevados de LTB4 e elevado número de macrófagos. Por outro lado, a inibição da via melhorou a falência hepática aguda e isto foi associado à redução de macrófagos no órgão. Luz et al. (2014) também demonstraram que a inibição de 5-LO através de MK886 (inibidor da enzima FLAP) inibiu o recrutamento de neutrófilos e macrófagos para a cavidade peritoneal de camundongos estimulados com eotaxina, demonstrando a importância da via de 5-lipoxigenase para o recrutamento e acúmulo destas células. Monteiro e colaboradores (2011) também demonstraram a importância da via de 5-LO e da produção de LTB4 para o recrutamento de neutrófilos induzido por heme para a cavidade peritoneal. Estes autores observaram uma redução da migração destas células em animais deficientes em 5-LO, em

animais tratados com inibidores da enzima e também por meio de tratamento com inibidores dos receptores BLT1. Neste trabalho, nós também observamos um menor acúmulo de neutrófilos no baço, na medula e no fígado de camundongos que receberam transplante de leucócitos deficientes em 5-LO. O papel dos neutrófilos na GVHD ainda é pouco conhecido. Em um estudo recente publicado por Schwab et al., (2014) foi demonstrado um acúmulo importante de neutrófilos no íleo de camundongos submetidos à GVHD, associado a dano intestinal e ativação de linfócitos T efetores pela produção de ROS por essas células. Por outro lado, a depleção de neutrófilos reduziu a mortalidade associada à doença. Os autores demonstraram ainda que a gravidade da GVHD intestinal em humanos foi correlacionada ao aumento do número de neutrófilos nas lesões do órgão. Apesar de termos observado uma redução de neutrófilos em outros órgãos que não o intestino após o transplante de leucócitos deficientes em 5-LO, talvez em nosso modelo, a redução do número de neutrófilos em outros órgãos alvo esteja contribuindo para o controle da doença a partir de uma menor ativação de linfócitos T.

Além disso, o tratamento com zileuton ou o transplante de leucócitos deficientes em 5-LO resultou na manutenção da proporção de células dendríticas tanto no baço quanto no jejuno-íleo dos camundongos destes grupos. O papel das células dendríticas na GVHD é controverso, mas estudos mais atuais têm demonstrado a importância dessas células em controlar a doença. Weber et al. (2014) demonstraram que células dendríticas do hospedeiro protegem da GVHD e a ausência destas células leva à lesão intestinal grave e morte precoce de camundongos submetidos à doença. Outro estudo realizado em humanos por Elze et al. (2014) destacou a importância da reconstituição de células dendríticas após transplante de medula óssea realizado em crianças para aumentar a taxa de sobrevivência e reduzir a gravidade da GVHD aguda nestes pacientes.

A resposta inflamatória sistêmica observada na GVHD é causada não só pelo acúmulo de células pró-inflamatórias, mas também pela persistente redução do número de células T regulatórias (BERES; DROBYSKI, 2013). Vários estudos demonstraram que a retirada destas células piora a doença e que por outro lado, a infusão destas células tem papel importante em modular a GVHD (ERMANN et al., 2001; BERES; DROBYSKI, 2013). Em 2011, Brunstein e colegas, publicaram um estudo demonstrando que a infusão de células Treg associada ao transplante de células tronco do cordão umbilical em humanos diminuiu a incidência da GVHD aguda. Dessa forma, acreditamos que a manutenção da proporção de células Treg no jejuno-íleo observada na ausência de 5-LO pode ter contribuído para a redução da lesão intestinal observada no grupo tratado com zileuton ou no grupo que recebeu leucócitos deficientes em 5-LO.

Além da diminuição de lesão de órgãos alvo e do acúmulo de leucócitos pró-inflamatórios em animais submetidos ao transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou tratados com zileuton,

observamos uma redução nos níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias nestes dois grupos. Foi observada uma redução intestinal da quimiocina CCL3 e das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-17. Estes resultados são relevantes, uma vez que um estudo prévio publicado por nosso grupo, já demonstrou a participação de CCL3 na GVHD, onde a sua ausência nas células doadas ou o bloqueio farmacológico de seu receptor também reduz a mortalidade e lesão em órgãos alvo associados à doença do enxerto-versus-hospedeiro diminuindo o acúmulo de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no baço e intestino, além de inibir o recrutamento de macrófagos para o intestino (CASTOR et al., 2010). As citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α , também têm importante papel na fisiopatologia da GVHD (ROBB; HILL, 2012). A produção aumentada destas citocinas precede as manifestações clínicas da doença (KOIDE et al., 1997) e estão relacionadas a uma síndrome sistêmica de perda de peso, diarreia, alterações na pele e alta mortalidade (PIGUET et al., 1987; BAKER et al., 1995; KOIDE et al., 1997; SCHROEDER; DIPERSIO, 2011). Quantidades elevadas de IFN- γ contribuem para o dano intestinal por diferentes vias, incluindo efeitos citopáticos diretos da citocina no trato gastrointestinal e ativação de monócitos/macrófagos que passam a secretar quantidades de linfotóxina e TNF- α , potencializando o dano ao órgão (ROBB; HILL, 2012). Por sua vez, o TNF- α tem um papel importante em todas as fases da fisiopatologia da GVHD, desde a fase inicial de ativação das células apresentadoras de antígeno e efeitos diretos da citocina em lesar os órgãos alvo até efeitos indiretos no aumento da proliferação de linfócitos T citotóxicos e recrutamento de mononucleares ao longo da doença. Vários estudos vêm explorando o envolvimento de células T produtoras de IL-17 na patogênese da GVHD. Ambos os linfócitos T CD4 e T CD8 produtores de IL-17 estão associados à resposta Th1 à doença e agravamento da inflamação tecidual, iniciando e perpetuando a GVHD (van der WAART et al., 2014). O tratamento com zileuton também reduziu os níveis de IL-12, CCL2 e CCL5 no intestino, além de CCL2, IFN- γ e IL-17 no fígado. Trabalhos anteriores demonstram que a neutralização in vivo de IL-12 melhora a GVHD aguda por meio da redução da atividade de células NK no baço, diminuição da produção de IFN- γ , menor perda de peso e menor mortalidade (WILLIAMSON et al., 1996; WILLIAMSON et al., 1997). As quimiocinas CCL2 e CCL5 têm papel central na lesão associada à GVHD por direcionar o influxo de leucócitos para os órgãos alvo da doença (WYSOCKI et al., 2005; SERODY et al., 2000; TERWEY et al., 2005). Dessa forma, os dados discutidos até agora nos possibilita inferir que a diminuição no acúmulo de células inflamatórias associada à redução de importantes citocinas e quimiocinas que participam da fisiopatologia da GVHD contribuiu para a menor lesão dos órgãos alvo observada nos animais que receberam leucócitos deficientes em 5-LO ou foram tratados com zileuton.

Além da redução da concentração de quimiocinas e citocinas intestinais no grupo que recebeu leucócitos deficientes em 5-LO, demonstramos um aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 no intestino dos animais que receberam células deficientes para a enzima em comparação ao grupo que

recebeu células selvagens e ao grupo controle. No fígado, apesar de não observarmos diminuição de nenhuma citocina ou quimiocina pró-inflamatória, o nível da citocina IL-10 permaneceu semelhante ao do grupo controle, enquanto que no grupo que recebeu o transplante de células selvagens houve uma redução dessa citocina. A IL-10 é uma citocina regulatória importante na GVHD. Weber e colaboradores (2014) demonstraram que o transplante de leucócitos deficientes em IL-10 levou ao agravamento da doença com aumento da resposta de linfócitos T alogênicos, o que foi associado à alta mortalidade. Outro trabalho realizado por Lin e colaboradores (2014) demonstrou ainda que IL-10 produzida por T regs é fundamental para que esta célula reduza o tempo de interação entre as células T convencionais do doador e as células dendríticas do hospedeiro, o que culmina na atenuação da GVHD. Estes dados em conjunto, nos conduzem à hipótese de que a manutenção das células T reg observadas no intestino dos animais que receberam leucócitos deficientes em 5-LO podem estar contribuindo para o aumento da IL-10 e proteção de lesão intestinal observada nesses animais. Além disso, acreditamos que a manutenção hepática de IL-10 nos animais que receberam leucócitos deficientes em 5-LO pode ter também contribuído para a redução da lesão hepática observada neste grupo.

Possíveis mecanismos que podem estar associados ao menor acúmulo de leucócitos na doença do enxerto-versus-hospedeiro incluem a falha no recrutamento ou a redução da proliferação de linfócitos efetores nos órgãos alvo. Linfócitos T CD4 e linfócitos T CD8 naíves expressam baixos níveis de BLT1, receptor de maior afinidade pelo LTB4. Após estímulos inflamatórios, estas células se diferenciam em efetoras, passam a expressar maiores níveis de BLT1 e a interagir com LTB4. Leucotrieno B4 é um potente mediador inflamatório que recruta leucócitos de órgãos linfóides para órgãos periféricos inflamados, induzindo a firme adesão dessas células e finalmente a transmigração para o tecido afetado (TAGER et al., 2003; LUSTER; TAGER, 2004). Assim, um dos mecanismos que pode estar contribuindo para a redução da resposta inflamatória associada à GVHD em camundongos tratados com zileuton é a significativa redução do rolamento e da adesão de leucócitos observada em vênulas mesentéricas dos animais tratados. Isto pode estar ocorrendo por uma menor expressão de BLT1 nessas células, o que interfere na resposta à liberação de LTB4 e altera a interação com o endotélio, modificando tanto o recrutamento quanto o acúmulo de leucócitos nos órgãos alvo. Vários trabalhos têm demonstrado que camundongos deficientes no receptor BLT1 apresentam uma redução significativa da resposta inflamatória em modelo de asma, artrite reumatoide, aterosclerose, osteoporose e peritonite (YOKOMIZO, 2015). Dessa forma, estudos que explorem a expressão de BLT1 e o efeito de seu bloqueio na GVHD podem estabelecer novas perspectivas para o manejo da doença. Possivelmente, a redução das quimiocinas CCL2, CCL3 e CCL5 destacadas anteriormente e já classicamente descritas em contribuir para a migração de células nos órgãos alvo da GVHD também

está contribuindo para este fenômeno. Além disso, estamos avaliando a possibilidade da via de 5-LO interferir diretamente na proliferação de linfócitos T e isto contribuir para a redução da GVHD.

Uma vez que o bloqueio farmacológico ou genético da via de 5-LO foi associado à proteção da GVHD, nós também hipotetizamos que poderia estar ocorrendo o aumento da expressão da enzima e consequentemente o aumento de LTB4 em animais submetidos à doença, o que desencadearia, por conseguinte, a intensa resposta inflamatória observada. Nós demonstramos neste trabalho que apesar de não ocorrer um aumento do mRNA da enzima 5-lipoxigenase nos órgãos alvo, foi observado um maior nível de LTB4 intestinal e sérico no 3º dia após o transplante em camundongos submetidos à GVHD em comparação ao grupo controle, o qual recebeu transplante singênico. No fígado, este aumento de LTB4 em camundongos submetidos à GVHD ocorreu mais tardiamente, no início da mortalidade. A produção de LTB4 é controlada não só pela modulação da expressão de 5-LO, mas também por sua ativação, que ocorre a partir da translocação de 5-LO das células ativadas para a posição perinuclear e posterior interação com a proteína FLAP (HANAKA; SHIMIZU; IZUMI, 2005; RADMARK; SAMUELSSON, 2010). Dessa forma, nós acreditamos que a produção de LTB4 pela enzima 5-LO na GVHD pode estar associada à ativação da enzima e não ao aumento de sua expressão. Esta hipótese será testada em breve por meio de experimentos de microscopia confocal em animais submetidos à GVHD para verificar se a enzima 5-LO apresenta localização perinuclear. É interessante notar que nos animais do grupo controle houve também um aumento de LTB4 em todos os órgãos analisados, no 10º dia após o transplante em comparação aos níveis observados no 3º dia. Isto sugere que o regime de condicionamento seguido do transplante parece induzir um aumento de leucotrieno B4, o que pode ser importante para a reconstituição da medula óssea por meio da interação de LTB4/BLT1 e recrutamento de linfócitos, além de contribuir para a recuperação de outros órgãos lesados pela irradiação, incluindo a pele e o intestino pela interação de LTB4 com BLT2, receptor com o qual interage com menor afinidade. Em camundongos, a expressão do receptor BLT2 é restrita às células epiteliais do intestino e aos queratinócitos da epiderme e é fundamental para aumentar a função de barreira tanto no intestino quanto na pele, por regular proteínas da junção oclusiva nas células epiteliais (YOKOMIZO, 2015). Camundongos deficientes em BLT2 apresentam maior perda de água transepidérmica e maior sensibilidade cutânea (ISHII et al., 2016) e BLT2 presente nas células das criptas do cólon protege contra a colite induzida por DSS (IIZUKA et al., 2010). A produção de LTB4 é importante ainda, para estimular a proliferação das células intestinais (CABRAL; MARTÍN-VELEGAS, MORENO, 2013). Outro dado relevante foi a ausência de leucotrieno B4 no soro de camundongos que receberam leucócitos deficientes em 5-LO no 3º dia após o transplante e valores de leucotrieno hepático abaixo do basal nessa fase da doença, sugerindo que a enzima 5-LO presente nas células doadas pode estar sendo ativada nos primeiros dias após o transplante e contribuir

significativamente para a produção de LTB₄ observada no soro e no fígado de camundongos submetidos à GVHD, ocasionando posteriormente, lesões nos órgãos alvo da doença. Esta ideia é corroborada por Takatsuka et al. (2000), que demonstrou a correlação entre níveis séricos de LTB₄ aumentados no regime de condicionamento e ocorrência de GVHD intestinal grave. O transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou o tratamento com zileuton por sua vez, controlou de forma significativa o aumento desse leucotrieno tanto no soro quanto no fígado no início da mortalidade, apresentando resultados menores do que aqueles observados nos camundongos do grupo controle e dos camundongos submetidos à GVHD que não receberam tratamento. Este resultado indica que o tratamento com zileuton inibe efetivamente a via de 5-LO e conseqüentemente reduz o nível de leucotrieno B₄ no soro e no fígado de animais submetidos à GVHD, e isso pode contribuir para o controle da doença.

Tanto o transplante de leucócitos deficientes em 5-LO quanto o tratamento com zileuton foram eficazes em controlar a doença do enxerto-versus-hospedeiro através da redução da resposta inflamatória sistêmica e proteção de órgãos alvo, o que culminou no aumento da sobrevida e redução dos sinais clínicos associados à GVHD. Entretanto, várias terapias que são efetivas em prevenir a GVHD reduzem a pega do enxerto e o efeito do enxerto-versus-leucemia, que consiste na capacidade dos linfócitos transplantados reagirem contra células leucêmicas do indivíduo receptor, invalidando a aplicação terapêutica do transplante de medula. De forma importante, nós observamos neste trabalho que o transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou o tratamento com zileuton não prejudicou a reconstituição da medula óssea ou a resposta benéfica do GVL. É interessante notar que neste trabalho nós demonstramos uma potencial atividade antitumoral de zileuton, uma vez que animais que receberam o tumor e foram tratados com este fármaco apresentaram menor proliferação das células tumorais em comparação aos animais que desenvolveram o tumor e não foram tratados. Este resultado é coerente com diferentes estudos que exploram a participação da enzima 5-lipoxigenase e a possibilidade de intervenção farmacológica em sua via no desenvolvimento de tumores. Pouco depois de zileuton ser introduzido na prática clínica para tratamento de pacientes asmáticos, foi demonstrada que a inibição da via de 5-LO causava efeitos antiproliferativos e proapoptóticos em diferentes linhagens de células tumorais (STEELE et al., 1998). Os estudos mais atuais reforçam esses dados e demonstram que existe uma expressão aumentada de 5-LO em diferentes tipos de tumores sólidos, incluindo câncer de mama (AVIS et al., 2001), próstata (GUPTA et al., 2001), esôfago (HOQUE et al., 2005) pâncreas (HENNING et al., 2002; ZHOU et al., 2014) e carcinoma hepatocelular (XU et al., 2011). No adenocarcinoma pancreático, os níveis de expressão de 5-LO se correlacionam com as características clínicas do paciente, a extensão anatômica do tumor e o risco de desenvolvimento de metástases. O tratamento in vitro com zileuton em uma linhagem de células isoladas de câncer

pancreático humanas por sua vez, resultou em redução da proliferação dessas células e aumento de apoptose (ZHOU et al., 2015). Além disso, linhagens de célula de câncer de mama tratadas in vitro com MK886, inibidora de FLAP, apresentaram uma redução na proliferação por aumento da apoptose e interrupção do ciclo celular em G1 (AVIS et al., 2001). O tratamento com zileuton foi capaz ainda de reduzir a metástase do câncer de próstata em camundongos por aumento da expressão de E-caderina (molécula importante para o processo de adesão celular) e paxilina (importante para adesão, mobilidade e proliferação celular) (MENG et al., 2013). O tratamento de adenocarcinogênese esofágica induzida em ratos com zileuton também reduziu este tipo de tumor e isto foi associado a uma diminuição nos níveis de LTB4 e PGE2 (CHEN et al., 2004). Resultado semelhante foi obtido com zileuton no tratamento de camundongos com hepatocarcinoma, que apresentaram redução do número destas células tumorais. O tratamento in vitro com a droga também reduziu a viabilidade e induziu a apoptose de linhagem de células humanas de hepatocarcinoma (XU et al., 2011). Além de participar do crescimento de tumores sólidos, o gene de 5-LO é um regulador importante para o desenvolvimento de células tronco leucêmicas na leucemia mieloide crônica (LMC) induzida em camundongos. Camundongos deficientes em 5-LO não desenvolveram leucemia mieloide crônica, mantendo a produção normal de células-tronco hematopoiéticas não leucêmicas. Além disso, o tratamento com zileuton em camundongos que desenvolveram LMC foi capaz de inibir a atividade destas células leucêmicas (CHEN et al., 2009).

Diante dos resultados obtidos em nosso trabalho, nós acreditamos que o manejo clínico da via de 5-LO com zileuton pode contribuir para o tratamento de pacientes submetidos ao transplante de medula óssea e que desenvolvem GVHD.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstra a participação da enzima 5-lipoxigenase na fisiopatologia da GVHD. Camundongos que receberam leucócitos deficientes em 5-LO ou foram tratados com zileuton apresentaram menor lesão intestinal e hepática e diminuição da resposta inflamatória observada na doença, o que culminou no aumento de sobrevida e na redução dos sinais clínicos da GVHD. Além disso, o transplante de leucócitos deficientes em 5-LO ou o tratamento com zileuton não interferiu na reconstituição da medula óssea e na resposta benéfica do enxerto-versus-leucemia. Dessa forma, acreditamos que zileuton tem potencial aplicação terapêutica para pacientes que desenvolvem a doença do enxerto-versus-hospedeiro.

REFERÊNCIAS

Amaral, F.A., Costa, V.V., Tavares, L.D., Sachs, D., Coelho, F.M., Fagundes, C.T., Soriani, F.M., Silveira, T.N., Cunha, L.D., Zamboni, D.S., Quesniaux, V., Peres, R.S., Cunha, T.M., Cunha, F.Q., Ryffel, B., Souza, D.G., Teixeira, M.M. NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B(4) in a murine model of gout. **Arthritis Rheum.** Feb;64(2):474-84, 2012.

Aparoy, P., Reddy, K. K., Reddanna, P. Structure and Ligand Based Drug Design Strategies in the Development of Novel 5- LOX Inhibitors. **Current Medicinal Chemistry**, 19, 3763-3778, 2012.

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 Tissue Res.** 290:61-69, 1997.

Avis, I., Hong, S., Martinez, A., Moody, T., Choi, Y., Trepel, J., Das, R., Jett, M., Mulshine, J. Five-lipoxygenase inhibitors can mediate apoptosis in human breast cancer cell lines through complex eicosanoid interactions. **FASEB J.** 15:2007–2009, 2001.

Backer, M.B., Altman, N.H., Podack, E.R., Levy, R.B. The role of cell-mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic bone marrow transplantation in mice. **J Exp Med.**183:2645-2656, 1996.

Ball, L.M., Egeler, R.M. On behalf of the EBMT Pediatric Working Party Acute GvHD: pathogenesis and classification. **Bone Marrow Transplantation.** 41, S58–S64, 2008.

Ballen, K.K., Koreth, J., Chen, Y.B., Dey, B. R., Spitzer, T. R. Selection of optimal alternative graft source: mismatched unrelated donor, umbilical cord blood, or haploidentical transplant. **Blood,** 119:1972-80, 2012.

Bell, R., Young, P., Albert, D., Lanni, C., Summers, J., Brooks, D., Rubin, P., Carter G. The discovery and development of zileuton: an orally active 5-lipoxygenase inhibitor. **Int J Immunopharmacol.** Apr;14(3):505-10, 1992.

Beres, A.J., Drobyski, W.R. The role of regulatory T cells in the biology of graft versus host disease. **Front Immunol.** Jun 24;4:163, 2013.

Berger, W., De Chandt, M., Cairns, C. Zileuton: clinical implications of 5-Lipoxygenase inhibition in severe airway disease. **Int J Clin Pract.** Apr;61(4):663-76, 2007.

Bernardes, P.T., Rezende, B.M., Resende, C.B., De Paula, T.P., Reis, A.C., Gonçalves, W.A., Vieira, E.G., Pinheiro, M.V., Souza, D.G., Castor, M.G., Teixeira, M.M., Pinho, V. Nanocomposite treatment reduces disease and lethality in a murine model of acute graft-versus-host disease and preserves anti-tumor effects. **PLoS One.** Apr 13;10(4):e0123004, 2015.

Blazar, B. R., Murphy, W. J., Abedi, M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. **Nature Reviews Immunology** 12, 443–458, 2012.

Breganó, J.W., Barbosa, D.S., El Kadri, M.Z., Rodrigues, M.A., Cecchini, R., Dichi, I. Comparison of selective and non selective cyclo-oxygenase 2 inhibitors in

experimental colitis exacerbation: role of leukotriene B4 and superoxide dismutase. **Arq Gastroenterol.** Jul-Sep;51(3):226-34, 2014.

Brunstein, C.G., Miller, J.S., McKenna, D.H., Hippen, K.L., DeFor, T.E., Sumstad, D., Curtsinger, J., Verneris, M.R., MacMillan, M.L., Levine, B.L., Riley, J.L., June, C.H., Le, C., Weisdorf, D.J., McGlave, P.B., Blazar, B.R., Wagner, J.E. Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics, toxicity profile, and clinical effect. **Blood.** Feb 25;127(8):1044-51, 2016.

Cabral, M., Martín-Venegas, R., Moreno, J. Role of arachidonic acid metabolites on the control of non-differentiated intestinal epithelial cell growth. **Int J Biochem Cell Biol.** Aug;45(8):1620-8, 2013.

Castor, M. G., Rezende, B., Resende, C. B., Alessandri, A. L., Fagundes, C. T., Sousa, L. P., Arantes, R. M., Souza, D. G., Silva, T. A., Proudfoot, A. E., Teixeira, M. M., Pinho, V. The CCL3/macrophage inflammatory protein-1-binding protein evasin-1 protects from graft-versus-host disease but does not modify graft-versus-leukemia in mice. **J. Immunol.** 184, 2646–2654, 2010.

Castor, M. G., Rezende, B. M., Resende, C.B., Bernardes, P.T., Cisalpino, D., Vieira, A.T., Souza, D.G., Silva, T.A., Teixeira, M.M., Pinho, V. Platelet-activating factor receptor plays a role in the pathogenesis of graft-versus-host disease by regulating leukocyte recruitment, tissue injury, and lethality. **J Leukoc Biol.** 91(4):629-39, 2012.

Chen, M., Lam, B.K., Kanaoka, Y., Nigrovic, P.A., Audoly, L.P., Austen, K.F., Lee, D.M. Neutrophil-derived leukotriene B4 is required for inflammatory arthritis. **J Exp Med** 203: 837–842, 2006.

Chen, X., Wang, S., Wu, N., Sood, S., Wang, P., Jin, Z., Beer, D., Giordano, T., Lin, Y., Shih, W., Lubet, R., Yang, C. Overexpression of 5-lipoxygenase in rat and human esophageal adenocarcinoma and inhibitory effects of zileuton and celecoxib on carcinogenesis. **Clin Cancer Res.** Oct 1;10(19):6703-9, 2004.

Chen, Y., Li, D., Li, S. The Alox5 gene is a novel therapeutic target in cancer stem cells of chronic myeloid leukemia. **Cell Cycle.** Nov 1;8(21):3488-92, 2009.

Choi, S.W., Reddy, P. Current and emerging strategies for the prevention of graft-versus-host disease. **Nat Rev Clin Oncol.** Sep;11(9):536-47, 2014.

Colson, Y.L., Christopher, K., Glickman, J., Taylor, K.N., Wrigth, R., Perkins, D.L. Absence of clinical GVHD and the in vivo induction of regulatory T cells after transplantation of facilitating cells. **Blood.** 104:3829-3835, 2004.

Cooke, K.R., Gerbitz, A., Crawford, J.M., Teshima, T., Hill, G.R., Tesolin, A., Rossignol, D.P., Ferrara, J.L. LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. **J Clin Invest.** 107(12):1581-9, 2001.

de Hoog, V.C., Bovens, S.M., de Jager, S.C., van Middelaar, B.J., van Duijvenvoorde, A., Doevendans, P.A., Pasterkamp, G., de Kleijn, D.P., Timmers, L. BLT1 antagonist LSN2792613

reduces infarct size in a mouse model of myocardial ischaemia-reperfusion injury. **Cardiovasc Res.** Dec 1;108(3):367-76, 2015.

Dignan, F. L., Clark, A., Amrolia, P., Cornish, J., Jackson, G., Mahendra, P. Scarisbrick, J.J., Taylor, P.C., Hadzic, N., Shaw, B.E., Potter, M.N. Diagnosis and management of acute graft-versus-host disease. **British Journal of Haematology.** 158(1), 30–45, 2012.

El-Hayek, J. M., Rogers, T. E., Brown, J. R. The role of TNF in hepatic histopathological manifestations and hepatic CD8 T cell alloresponses in murine MHC class I disparate GVHD. **J. Leukoc. Biol.** 78, 1001–1007, 2005.

Elze, M.C., Ciocarlie, O., Heinze, A., Kloess, S., Gardlowski, T., Esser, R., Klingebiel, T., Bader, P., Huenecke, S., Serban, M., Köhl, U., Hutton, J.L. Dendritic cell reconstitution is associated with relapse-free survival and acute GVHD severity in children after allogeneic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant.** Feb;50(2):266-73, 2015.

Ermann, J., Hoffmann, P., Edinger, M., Dutt, S., Blankenberg, F.G., Higgins, J.P., Negrin, R.S., Fathman, C.G., Strober, S. Only the CD62L⁺ subpopulation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. **Blood.** Mar 1;105(5):2220-6, 2005.

Ferrara, J.L., Yanik, G. Acute graft versus host disease: Pathophysiology, risk factors, and prevention strategies. **Clin Adv Hematol Oncol** 3: 415–419, 428, 2005.

Ferrara J. L. Novel strategies for the treatment and diagnosis of graft-versus-host disease. **Best Practice & Research Clinical Haematology.** 20: 91-97, 2007.

Ferrara, J. L., Levine, J. E., Reddy, P., Holler, E. Graft-versus-host disease. **Lancet**, 373, 1550 – 1561, 2009.

Fieren, M. W. The local inflammatory responses to infection of the peritoneal cavity in humans: their regulation by cytokines, macrophages, and other leukocytes. **Mediators Inflamm.**, 1450-1462, 2012.

Filgueiras, L. R., Serezani, C.H., Jancar, S. Leukotriene B4 as a Potential Therapeutic Target for the Treatment of Metabolic Disorders. **Front Immunol.** Oct 8;6:515, 2015.

Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A., Doig, M.V., Shipley, M.E., Smith, M.J. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. **Nature**, 286(5770): 264-265, 1980.

Funk, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science** 294, 1871–1875, 2001.

Goker, H., Hanznedaroglu, I. C., Chao, N. J. Acute graft-versus- host disease: pathobiology and management. **Exp. Hematol.** 29, 259 –277, 2001.

Gounaris, E., Heiferman, M.J., Heiferman, J.R., Shrivastav, M., Vitello, D., Blatner, N.R., Knab, L.M., Phillips, J.D., Cheon, E.C., Grippo, P.J., Khazaie, K., Munshi, H.G., Bentrem, D.J. Zileuton, 5-lipoxygenase inhibitor, acts as a chemopreventive agent in intestinal polyposis, by modulating polyp and systemic inflammation. **PLoS One.** Mar 6;10(3):e0121402, 2015.

Gupta, S., Srivastava, M., Ahmad, N., Sakamoto, K., Bostwick, D., Mukhtar, H. Lipoxygenase-5 is overexpressed in prostate adenocarcinoma. **Cancer.** 91:737–743, 2001.

Hackshaw, K., Shi, Y., Brandwein, S., Jones, K., Westcott, J. A pilot study of zileuton, a novel selective 5-lipoxygenase inhibitor, in patients with systemic lupus erythematosus. **J Rheumatol.** Mar;22(3):462-8, 1995.

Hanaka, H., Shimizu, T., Izumi, T. Stress-induced nuclear export of 5-lipoxygenase. **Biochem Biophys Res Commun.** Dec 9;338(1):111-6, 2005.

Hebert, M.J., Takano, T., Holthofer, H., Brady, H.R. Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils. Modulation by lipoxygenase-derived eicosanoids. **J Immunol.** 157(7): 3105-3115, 1996.

Hennig, R., Ding, X., Tong, W., Schneider, M., Standop, J., Friess, H., Büchler, M., Pour, P., Adrian, T. 5-Lipoxygenase and leukotriene B(4) receptor are expressed in human pancreatic cancers but not in pancreatic ducts in normal tissue. **Am J Pathol.** 161:421–428, 2002.

Hoque, A., Lippman, S., Wu, T., Xu, Y., Liang, Z., Swisher, S., Zhang, H., Cao, L., Ajani, J., Xu, X. Increased 5-lipoxygenase expression and induction of apoptosis by its inhibitors in esophageal cancer: a potential target for prevention. **Carcinogenesis.** 26:785–791, 2005.

Hill, G. R., Crawford, J. M., Cooke, K. R., Brinson, Y. S., Pan, L., Ferrara, J. L. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. **Blood**, n. 90, p. 3204–13, 1997.

Hill, G.R., Ferrara, J.L. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. **Blood.** 95:2754–2759, 2000.

Holtan, S.G., MacMillan, M.L. A risk-adapted approach to acute GVHD treatment: are we there yet?. **Bone Marrow Transplant.** Feb;51(2):172-5, 2016.

Horowitz, M.M., Gale, R.P., Sondel, P.M., Goldman, J.M., Kersey, J., Kolb, H.J., Rimm, A.A., Ringden, O., Rozaman, C., Speck, B., Truitt, R.L., Zwaan, F.E., Bortin, M.M. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. **Blood.** 75:555-561, 1990.

Howard, J. G., Woodruff, M. F. A. Effect of the graft-versus-host reaction on the immunological responsiveness of the mouse. **Proc. R. Soc. Lond**, n. 154, p. 532-9., 1961.

Iizuka, Y., Okuno, T., Saeki, K., Uozaki, H., Okada, S., Misaka, T., Sato, T., Toh, H., Fukayama, M., Takeda, N., Kita, Y., Shimizu, T., Nakamura, M., Yokomizo, T. Protective role of the leukotriene B4 receptor BLT2 in murine inflammatory colitis. **FASEB J.** Dec;24(12):4678-90, 2010.

Ishii, Y., Saeki, K., Liu, M., Sasaki, F., Koga, T., Kitajima, K., Meno, C., Okuno, T., Yokomizo, T. Leukotriene B4 receptor type 2 (BLT2) enhances skin barrier function by regulating tight junction proteins. **FASEB J.** Feb;30(2):933-47, 2016.

Jaksch, M., Mattsson, J. The pathophysiology of graft-versus-host disease. **Scand J Immunol.** 61:398-409, 2005.

Jamil, M., Mineishi, S. State-of-the-art acute and chronic GVHD treatment. **Int J Hematol.** May;101(5):452-66, 2015.

Jampilek, J., Dolezal, M., Opletalova, V., Hartl, J. 5-Lipoxygenase, leukotrienes biosynthesis and potential antileukotrienic agents. **Curr Med Chem,** 13(2): 117-129, 2006.

Johnson, B. D., Hanke, C. A., Truitt, R. L. The graft-versus-leukemia effect of post-transplant donor leukocyte infusion. **Leuk. Lymphoma** 23, 1–9, 1996.

Joshi, Y.B., Praticò, D. The 5-lipoxygenase pathway: oxidative and inflammatory contributions to the Alzheimer's disease phenotype. **Front Cell Neurosci.** Jan 14;8:436. 2015.

Kataoka, Y., Iwasaki, T., Kuroiwa, T., Seto, Y., Iwata, N., Hashimoto, N., Ogata, A., Hamano, T., Kakishita, E. The role of donor T cells for target organ injuries in acute and chronic graft-versus-host disease. **Immunology**, 103(3):310-8, 2001.

Ketelhuth, D.F., Hermansson, A., Hlawaty, H., Letourneur, D., Yan, Z.Q., Bäck, M. The leukotriene B4 receptor (BLT) antagonist BIIL284 decreases atherosclerosis in ApoE(-/-) mice. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.** Sep;121(Pt A):105-9. 2015.

Kim, N.D., Chou, R.C., Seung, E., Tager, A.M., Luster, A.D. A unique requirement for the leukotriene B4receptor BLT1 for neutrophil recruitment in inflammatory arthritis. **J Exp Med** 203: 829–835, 2006.

Kittan, N. A., Hildebrandt, G. C. The chemokine system: a possible therapeutic target in acute graft-versus-host disease. **Curr Top Microbiol Immunol.** v. 341, p.97-120, 2010.

Knab, L.M., Schultz, M., Principe, D.R., Mascarinas, W.E., Gounaris, E., Munshi, H.G., Grippo, P.J., Bentrem, D.J. Ablation of 5-lipoxygenase mitigates pancreatic lesion development. **J Surg Res.** Apr;194(2):481-487, 2015.

Koide, S., McVay, L.D., Frankel, W.L., Betling, C.A., Zhou, E.D., Shimada, T., Zhang, W., Rombeau, J.L. Increased expression of tissue cytokines in graft- versus- host disease after small bowel transplantation in the rat. **Transplantation.** 64:518-24, 1997.

Krenger, W., G. R. Hill, J. L. Ferrara. Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease. **Transplantation** 27: 553–558, 1997.

Krijanovski, O., Hill, G.R., Cooke, K.R., Teshima, T., Crawford, J.M., Brinson, Y.S., Ferrara, J.L. Keratinocyte growth factor separates graft-versus-leukemia effects from graft-versus-host disease. **Blood.** Jul 15;94(2):825-31, 1999.

Li, J.M., Giver, C.R., Lu, Y., Hossain, M.S., Akhtari, M., Waller, E.K. Separating graft-versus-leukemia from graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Immunotherapy.** 1(4):599-621, 2009.

Li, L., Liu, Y.R., Gao, S., Li, J.F., Li, S.S., Zhang, D.D., Liu, S., Bai, L., Zheng, S.J., Duan, Z.P., Qi, M., Chen, Y. Inhibition of 5-lipoxygenase pathway attenuates acute liver failure by inhibiting macrophage activation. **J Immunol Res.** 2014; 2014:697560, 2014.

Lin, K.L., Fulton, L.M., Berginski, M., West, M.L., Taylor, N.A., Moran, T.P., Coghill, J.M., Blazar, B.R., Bear, J.E., Serody, J.S. Intravital imaging of donor allogeneic effector and regulatory T cells with host dendritic cells during GVHD. **Blood.** Mar 6;123(10):1604-14, 2014.

Luster, A.D., Tager, A.M. T cell trafficking in asthma: lipid mediators grease the way. **Nat Rev Immunol.** Sep;4(9):711-24, 2004.

Luz, R.A., Xavier-Elsas, P., de Luca, B., Masid-de-Brito, D., Cauduro, P.S., Arcanjo, L.C., dos Santos, A.C., de Oliveira, I.C., Gaspar-Elsas, M.I. 5-lipoxygenase-dependent recruitment of neutrophils and macrophages by eotaxin-stimulated murine eosinophils. **Mediators Inflamm.** 2014:102160, 2014.

Mapara, M. Y., Leng, C., Kim, Y., Bronson, R., Lokshin, A., Luster, A., Sykes, M. Expression of chemokines in GVHD target organs is influenced by conditioning and genetic factors and amplified by GVHR. **Biology of blood and marrow transplantation**, n. 12, p. 623-634, 2006.

Markey, K., MacDonald, K., Hill, G. The biology of graft-versus-host disease: experimental systems instructing clinical practice. **Blood**, Jul 17; 124(3): 354–362, 2014.

Martin, P.J.J., Rizzo, D., Wingard, J. R., Ballen, K. et al. (2012). First- and Second-Line Systemic Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease: Recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, 2012.

Mastalerz, L., Kumik, J. Antileukotriene drugs in the treatment of asthma. **Pol Arch Med Wewn.** Mar;120(3):103-8, 2010.

Mehrabian, M., Allayee, H. 5-lipoxygenase and atherosclerosis. **Curr Opin Lipidol.** Oct;14(5):447-57, 2003.

Meng, Z., Cao, R., Yang, Z., Liu, T., Wang, Y., Wang, X. Inhibitor of 5-lipoxygenase, zileuton, suppresses prostate cancer metastasis by upregulating E-cadherin and paxillin. **Urology.** Dec;82(6):1452.e7-14, 2013.

Mensen, A., Jöhrens, K., Anagnostopoulos, I., Demski S., Oey, M., Stroux, A., Hemmati, P., Westermann, J., Blau, O., Wittenbecher, F., Movassaghi, K., Szyska M., Thomas, S., Dörken, B., Scheibenbogen, C., Arnold, R., Na, IK. Bone marrow T-cell infiltration during acute GVHD is associated with delayed B-cell recovery and function after HSCT. **Blood**, 7;124(6):963-72, 2014.

Monteiro, A.P., Pinheiro CS, Luna-Gomes T, Alves LR, Maya-Monteiro CM, Porto BN, Barja-Fidalgo C, Benjamim CF, Peters-Golden M, Bandeira-Melo C, Bozza MT, Canetti C. Leukotriene B4 mediates neutrophil migration induced by heme. **J Immunol.** 2011 Jun 1;186(11):6562-7.

Müller, A., Linderman, J., Florek, M., Miklos, D., Shizuru, J. Allogeneic T cells impair engraftment and hematopoiesis after stem cell transplantation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 107:14721, 2010.

Murai, M. Yoneyama, H. Ezaki T, Suematsu4, M., Terashima1, Y., Harada1, A., Hamada5, H., Asakura2, H., Ishikawa5, H., Matsushima,1K., Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. **Nat. Immunol.**, n. 4, p. 154-160, 2003.

New, J., Li B., Koh, W., Ng, H., Tan, S., Yap, E., Chan, S., Hu, H. T cell infiltration and chemokine expression: relevance to the disease localization in murine graft-versus-host disease. **Bone Marrow Transplant.**, 29(12):979-86, 2002.

Osher, E., Weisinger, G., Limor, R., Tordjman, K., Stern, N. The 5 lipoxygenase system in the vasculature: emerging role in health and disease. *Mol Cell Endocrinol.* Jun 27;252(1-2):201-6, 2006.

Pasquini, M. C., Wang, Z., Horowitz, M. M. & Gale, R. P. 2010 report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR): current uses and outcomes of hematopoietic cell transplants for blood and bone marrow disorders. *Clin. Transpl.*, 87–105, 2010.

Peters-Golden, M., Henderson, W.R., Jr. Leukotrienes. *N Engl J Med.* 357(18): 1841-1854, 2007.

Piguet, P.F., Grau, G.E., Allet, B., Vassalli, P. Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-versus-host disease. *J experimental medicine*, 166, 1280–1289, 1987.

Qian, L., Wu, Z., Shen, J. Advances in the treatment of acute graft-versus-host disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(8), 966–975, 2013.

Rådmark, O., Samuelsson, B. Regulation of the activity of 5-lipoxygenase, a key enzyme in leukotriene biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* May 21;396(1):105-10, 2010.

Ramadan, A., Paczesny, S. Various Forms of Tissue Damage and Danger Signals Following Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *Frontiers in Immunology.* 6:14, 2015.

Rask-Madsen, J., Bukhave, K., Laursen, L., Lauritsen, K. 5-Lipoxygenase inhibitors for the treatment of inflammatory bowel disease. *Agents Actions.* Spec No:C37-46, 1992.

Rezende, B., Bernardes, P., Resende, C., . Arantes, R., Souza, D., Braga, F., Castor, M., Teixeira M., Pinho, V. Lithothamnion muelleri Controls Inflammatory Responses, Target Organ Injury and Lethality Associated with Graft-versus-Host Disease in Mice. *Mar. Drugs* , 11, 2595-2615, 2013.

Robb, R. J., Hill, G. R. The interferon-dependent orchestration of innate and adaptive immunity after transplantation. *Blood*, v119, 5351-5358, 2012.

Schattenfroh, N., Hoffman R., McCarthy, S., Simmons, R. Phenotypic analysis of donor cells infiltrating the small intestinal epithelium and spleen during graft-versus-host disease. *Transplantation*, 27;59(2):268-73, 1995.

Schroeder, M. A., DiPersio, J.F. Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Dis Model Mech.* 4(3):318-33, 2011.

Schwab, L., Goroncy, L., Palaniyandi, S., Gautam, S., Triantafyllopoulou, A., Mocsai, A., Reichardt, W., Karlsson, F., Radhakrishnan, S., Hanke, K., Schmitt-Graeff, A., Freudenberg, M., von Loewenich, F., Wolf, P., Leonhardt, F., Baxan, N., Pfeifer, D., Schmah, O., Schönle, A., Martin, S., Mertelsmann, R., Duyster, J., Finke, J., Prinz, M., Henneke, P., Häcker, H., Hildebrandt, G., Häcker, G., Zeiser, R. Neutrophil granulocytes recruited upon translocation of intestinal bacteria enhance graft-versus-host disease via tissue damage. *Nat Med.* Jun;20(6):648-54, 2014.

Serody, J. S., Burkett, S. E., Panoskaltsis-Mortari, A., Ng-Cashin, J., McMahon, E., Matsushima, G. R., Lira, S. A., Cook, D. N., Blazar, B. R. T-lymphocyte production of macrophage inflammatory protein-1 is critical to recruitment of CD8T cells to the liver, lung, and spleen during graft-versus-host disease. *Blood.* 96, 2973- 2980, 2000.

Shahid, R.A., Vigna, S.R., Layne, A.C., Romac, J.M., Liddle, R.A. Acinar Cell Production of Leukotriene B4 Contributes to Development of Neurogenic Pancreatitis in Mice. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol.** Jan;1(1):75-86, 2015.

Shimizu, T. Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 49: 123-150, 2009.

Shlomchik, W.D. Graft-versus-host disease. **Nat Rev Immunol.** 7(5):340-52., 2007.

Steele, V., Holmes, C., Hawk, E., et al Lipoxygenase inhibitors as potential cancer chemopreventives. **Cancer Epidemiol Biom Prev** ;8:467-83, 1999.

Steinhilber, D., Hofmann, B. Recent advances in the search for novel 5-lipoxygenase inhibitors. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** Jan;114(1):70-7, 2014.

Szyska, M., Na, Il-K. Bone Marrow GvHD after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Front Immunol.**, 117:118, 2016.

Tager, A., Bromley, S., Medoff, B., Islam, S., Bercury, S., Friedrich, E., Carafone, A., Gerszten, R., Luster, A. Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. **Nat Immunol.** Oct;4(10):982-90, 2003.

Takatsuka, H., Yamada, S., Okamoto, T., Fujimori, Y., Wada, H., Iwata, N., Kanamaru, A., Kakishita, E. Predicting the severity of intestinal graft-versus-host disease from leukotriene B4 levels after bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant.** Dec; 26(12):1313-6, 2000.

Terwey, T.H., Kim, T.D., Kochman, A.A., Hubbard, V.M., Lu, S., Zakrzewski, J.L., Ramirez-Montagut, T., Eng, J.M., Muriglan, S.J., Heller, G., Murphy, G.F., Liu, C., Budak-Alpdogan, T., Alpdogan, O., van den Brink, M.R. CCR2 is required for CD8-induced graft-versus-host disease. **Blood.** Nov 1;106(9):3322-30, 2005.

Teshima, T., Hill, G.R., Pan, L., Brinson, Y.S., van den Brink, M.R., Cooke, K.R., Ferrara, J.L. IL-11 separates graft-versus-leukemia effects from graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. **J Clin Invest.** Aug;104(3):317-25, 1999.

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. **J. Clin. Invest.** 84:1947-1956, 1989.

Tonnesen, M.G., Anderson, D.C., Springer, T.A., Knedler, A., Avdi, N., Henson, P.M. Adherence of neutrophils to cultured human microvascular endothelial cells. Stimulation by chemotactic peptides and lipid mediators and dependence upon the Mac-1, LFA-1, p150,95 glycoprotein family. **J Clin Invest**, 83(2): 637-646, 1989.

van der Waart, A., van der Velden, W., Blijlevens, N., Dolstra, H. Targeting the IL17 pathway for the prevention of graft-versus-host disease. **Biol Blood Marrow Transplant.** Jun;20(6):752-9, 2014.

Villa, N., Rahman, M., McFadden, G., Cogle, C. Therapeutics for Graft-versus-Host Disease: From Conventional Therapies to Novel Virotherapeutic Strategies. **Viruses.** Mar 22;8(3):85, 2016.

Vodanovic-Jankovic S., Hari P., Jacobs P., Komorowski R. Drobyski W. R. NF-Kb as target for the prevention of graft-versus-host disease: comparative efficacy of bortezomib and PS-1145. **Blood**,107(2) 827-34, 2006.

von Bonin, M., Bornhäuser, M. Concise review: the bone marrow niche as a target of graft versus host disease. **Stem Cells.**, 32(6):1420-8, 2014.

Vriesendorp, H., Heidt, P., History of Graft-versus-Host Disease, **Experimental Hematology** (2016).

Xu, X., Deng, J., Yuan, G., Yang, F., Guo, H., Xiang, M., Ge, W., Wu, Y. 5-Lipoxygenase contributes to the progression of hepatocellular carcinoma. **Mol Med Rep.** Nov-Dec;4(6):1195-200, 2011.

Weber, M., Stein, P., Prüfer, S., Rudolph, B., Kreft, A., Schmitt, E., Bopp, T., Roers, A., Schild, H., Fillatreau, S., Radsak, M.P. Donor and host B cell-derived IL-10 contributes to suppression of graft-versus-host disease. **Eur J Immunol.** Jun;44(6):1857-65, 2014.

Weinblatt, M., Kremer, J., Coblyn, J., Helfgott, S., Maier, A., Petrillo, G., Henson, B., Rubin, P., Sperling, R. Zileuton, a 5-lipoxygenase inhibitor in rheumatoid arthritis. **J Rheumatol.** Oct;19(10):1537-41, 1992.

Wenzel, S., Kamada, A. Zileuton: the first 5-lipoxygenase inhibitor for the treatment of asthma. **Ann Pharmacother.** Jul-Aug;30(7-8):858-64, 1996.

Westin, J.R., Saliba, R.M. , De Lima, M., Alousi, A., Hosing, C., Qazilbash, M. H., Khouri, I. F., Shpall, E. J., Anderlini, P., Rondon, G., Andersson, B.S., Champlin, R., Couriel, D. R. Steroid-Refractory Acute GVHD: Predictors and Outcomes. **Advances in Hematology**, vol. 2011.

Will, A., Wynn, R. Diagnosis of acute graft-versus-host disease. **Transplantation** 81, 505–506, 2006.

Williamson, E., Garside, P., Bradley, J.A., Mowat, A.M. L-12 is a central mediator of acute graft-versus-host disease in mice. **J Immunol.** Jul 15;157(2):689-99, 1996.

Williamson, E., Garside, P., Bradley, J.A., More, I.A., Mowat, A.M. Neutralizing IL-12 during induction of murine acute graft-versus-host disease polarizes the cytokine profile toward a Th2-type alloimmune response and confers long term protection from disease. **J Immunol.** Aug 1;159(3):1208-15, 1997.

Wolf, D., von Lilienfeld-Toal, M., Wolf, A.M., Schleuning, M., von Bergwelt-Baildon, M., Held, S.A., Brossart, P. Novel treatment concepts for graft-versus-host disease. **Blood.** 5;119(1):16-25, 2012.

Wysocki, C. A., Panoskalis-Mortari, A., Blazar, B. R., Serody, J. S. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. **Blood**, 105, 4191– 4199, 2005.

van Bekkum, D.W., de Vries, M.J. Radiation Chimeras. **Logos/Academic Press**, London, 1967.

van Bekkum, D.W. Graft-versus-Host disease. Chapter 3 in **Bone marrow transplantation. Biological mechanisms and clinical practice.** van Bekkum, D.W., Löwenberg, B. (eds.). Marcel Dekker, New York; pp. 148-212, 1985.

Yao, Y., Song, X., Cheng, H., Tang, G., Hu, X., Zhou, H. et al. Dysfunction of bone marrow vascular niche in acute graft-versus-host disease after MHC-haploidentical bone marrow transplantation. **PLoS One**, 13;9(8):e104607, 2014.

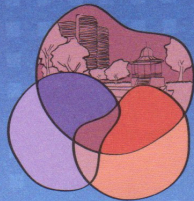
Yokomizo, T. Two distinct leukotriene B4 receptors, BLT1 and BLT2. **J Biochem.** Feb;157(2):65-71, 2015.

Zingarelli, B., Squadrito, F., Graziani, P., Camerini, R., Caputi, A. Effects of zileuton, a new 5-lipoxygenase inhibitor, in experimentally induced colitis in rats. **Agents Actions.** Jul;39(3-4):150-6, 1993.

Zhou, G., Ding, X., Wu, S., Zhang, H., Cao, W., Qu, L., Zhang, H. Inhibition of 5-lipoxygenase triggers apoptosis in pancreatic cancer cells. **Oncol Rep.** Feb;33(2):661-8, 2015.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO

Prêmio Mary Flowers de melhor trabalho do XVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea (SBTMO 2014)



SBTMO 2014

XVIII Congresso da Sociedade Brasileira
de Transplante de Medula Óssea
XIV Encontro Anual de Histocompatibilidade e Imunogenética

14 a 17 de agosto de 2014

Hotel Mercure Lourdes - Belo Horizonte, MG

www.congressosbtmo.com.br

Certificamos que

Rezende, B. M. ; Bernardes, P. T. T. ; Esper, L. , Resende, C. B. ; Castor, M. G. M. ,
Teixeira, M. M. , Machado, F. S. and Pinho, V.

participou

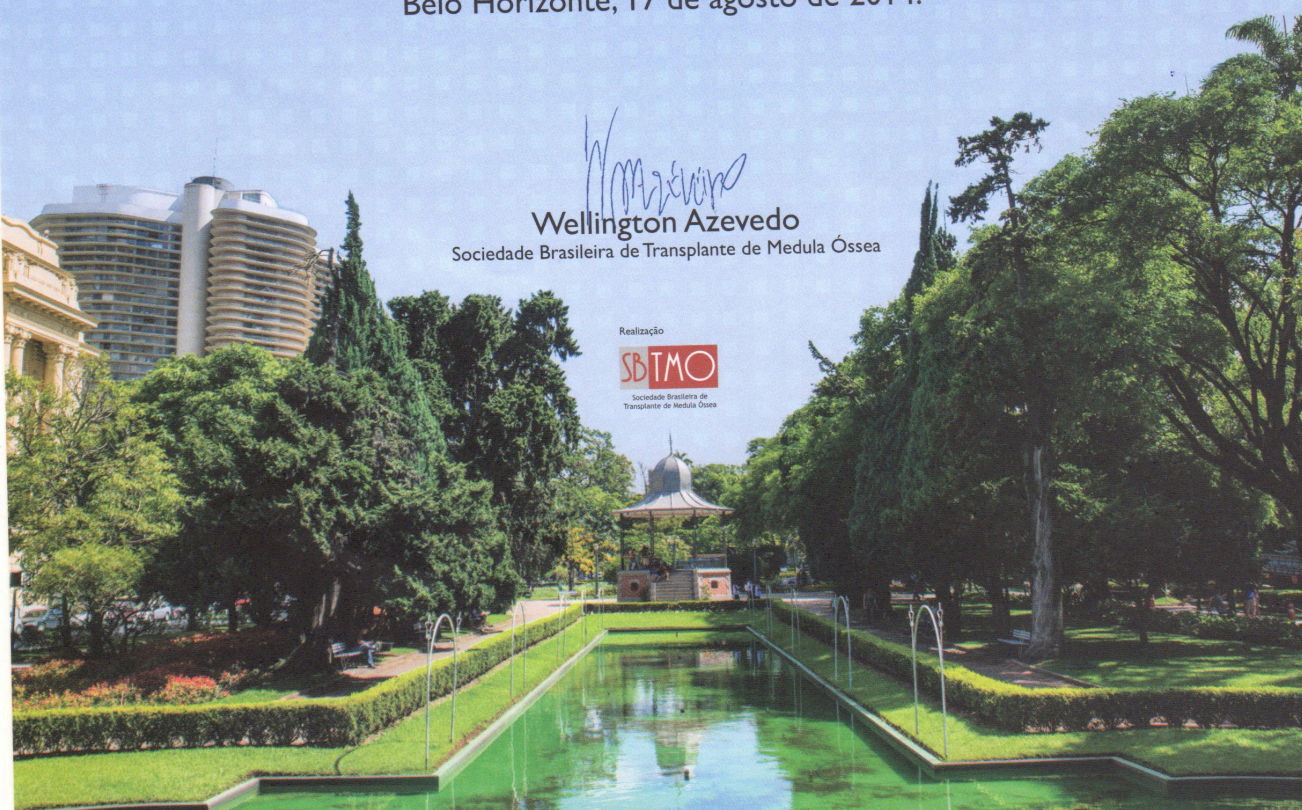
Como **AUTOR** e **Co-autores** do Trabalho Científico "The role of 5-lipoxygenase pathway in the development of graft-versus-host disease. Zileuton: a new therapeutic strategy for GVHD?" ganhador do Prêmio **MARY FLOWERS** de **MELHOR TRABALHO**

Belo Horizonte, 17 de agosto de 2014.

Wellington Azevedo

Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea

Realização





Treadmill Exercise Induces Neutrophil Recruitment into Muscle Tissue in a Reactive Oxygen Species-Dependent Manner. An Intravital Microscopy Study

Albená Nunes-Silva¹, Priscila T. T. Bernardes¹, Bárbara M. Rezende¹, Fernando Lopes¹, Elisa C. Gomes⁴, Pedro E. Marques², Paulo M. A. Lima³, Cândido C. Coimbra³, Gustavo B. Menezes², Mauro M. Teixeira⁴, Vanessa Pinho^{1*}

1 Laboratório de Resolução da Resposta Inflamatória, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Laboratório de Imunobiofotônica, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **3** Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **4** Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Abstract

Intense exercise is a physiological stress capable of inducing the interaction of neutrophils with muscle endothelial cells and their transmigration into tissue. Mechanisms driving this physiological inflammatory response are not known. Here, we investigate whether production of reactive oxygen species is relevant for neutrophil interaction with endothelial cells and recruitment into the quadriceps muscle in mice subjected to the treadmill fatiguing exercise protocol. Mice exercised until fatigue by running for 56.3 ± 6.8 min on an electric treadmill. Skeletal muscle was evaluated by intravital microscopy at different time points after exercise, and then removed to assess local oxidative stress and histopathological analysis. We observed an increase in plasma lactate and creatine kinase (CK) concentrations after exercise. The numbers of monocytes, neutrophils, and lymphocytes in blood increased 12 and 24 hours after the exercise. Numbers of rolling and adherent leukocytes increased 3, 6, 12, and 24 hours post-exercise, as assessed by intravital microscopy. Using LysM-eGFP mice and confocal intravital microscopy technology, we show that the number of transmigrating neutrophils increased 12 hours post-exercise. Mutant $gp91^{phox-/-}$ (non-functional NADPH oxidase) mice and mice treated with apocynin showed diminished neutrophil recruitment. SOD treatment promoted further adhesion and transmigration of leukocytes 12 hours after the exercise. These findings confirm our hypothesis that treadmill exercise increases the recruitment of leukocytes to the postcapillary venules, and NADPH oxidase-induced ROS plays an important role in this process.

Citation: Nunes-Silva A, Bernardes PTT, Rezende BM, Lopes F, Gomes EC, et al. (2014) Treadmill Exercise Induces Neutrophil Recruitment into Muscle Tissue in a Reactive Oxygen Species-Dependent Manner. An Intravital Microscopy Study. PLoS ONE 9(5): e96464. doi:10.1371/journal.pone.0096464

Editor: Masuko Ushio-Fukai, University of Illinois at Chicago, United States of America

Received: October 23, 2013; **Accepted:** April 8, 2014; **Published:** May 5, 2014

Copyright: © 2014 Nunes-Silva et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: vpinho@icb.ufmg.br

Article

***Lithothamnion muelleri* Controls Inflammatory Responses, Target Organ Injury and Lethality Associated with Graft-versus-Host Disease in Mice**

Barbara M. Rezende ^{1,†}, Priscila T. T. Bernardes ^{1,†}, Carolina B. Resende ¹, Rosa M. E. Arantes ², Danielle G. Souza ³, Fernão C. Braga ⁴, Marina G. M. Castor ¹, Mauro M. Teixeira ⁵ and Vanessa Pinho ^{1,*}

¹ Laboratory of Resolution of Inflammatory Response, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil; E-Mails: babirez@hotmail.com (B.M.R.); priscilatb@yahoo.com.br (P.T.T.B.); carolbresende@gmail.com (C.B.R.); marinacastor@gmail.com (M.G.M.C.)

² Laboratory of Experimental Neuro-Immunopathology, Department of Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil; E-Mail: rosa@icb.ufmg.br

³ Host-Microbes Interaction Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil; E-Mail: souzadg@gmail.com

⁴ Department of Pharmaceutical Products, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil; E-Mail: fernao@netuno.lcc.ufmg.br

⁵ Immunopharmacology, Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil; E-Mail: mmtex.ufmg@gmail.com

[†] These authors contributed equally to this work.

RESEARCH ARTICLE

Nanocomposite Treatment Reduces Disease and Lethality in a Murine Model of Acute Graft-versus-Host Disease and Preserves Anti-Tumor Effects

Priscila T. T. Bernardes¹*, Bárbara M. Rezende¹*, Carolina B. Resende¹, Talles P. De Paula², Alesandra C. Reis¹, William A. Gonçalves¹, Elias G. Vieira³, Maurício V. B. Pinheiro³, Danielle G. Souza², Marina G. M. Castor¹, Mauro M. Teixeira⁴, Vanessa Pinho¹*



click for updates

1 Laboratório de Resolução da Resposta Inflamatória, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Laboratório de Interação Microorganismo e Hospedeiro, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **3** Laboratório de Ressonância Paramagnética, Departamento de Física Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **4** Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

 OPEN ACCESS

Citation: Bernardes PTT, Rezende BM, Resende CB, De Paula TP, Reis AC, Gonçalves WA, et al. (2015) Nanocomposite Treatment Reduces Disease and Lethality in a Murine Model of Acute Graft-versus-Host Disease and Preserves Anti-Tumor Effects. PLoS ONE 10(4): e0123004. doi:10.1371/journal.pone.0123004

Academic Editor: Markus M. Heimesaat, Charité, Campus Benjamin Franklin, GERMANY

Received: June 3, 2014

Accepted: February 26, 2015

Published: April 13, 2015

Copyright: © 2015 Bernardes et al. This is an open access article distributed under the terms of the

 These authors contributed equally to this work.
* vpinho@icb.ufmg.br

Abstract

Graft versus host disease (GVHD) is an immunological disorder triggered by bone marrow transplantation that affects several organs, including the gastrointestinal tract and liver. Fullerenes and their soluble forms, fullerols, are nanocomposites with a closed symmetrical structure with anti-inflammatory and anti-oxidant properties. The present study evaluated the effects of treatment with the fullerol (C60(OH)18-20) in the development and pathogenesis of GVHD in a murine model. Mice with experimental GVHD that were treated with the fullerol showed reduced clinical signs of disease and mortality compared with untreated