

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**Bárbara Betônico Berg**

**Efeitos do tratamento com endocanabinóides na resposta inflamatória associada à doença do enxerto-contra-hospedeiro em camundongos**

Belo Horizonte

2022

Bárbara Betônico Berg

**Efeitos do tratamento com endocanabinóides na resposta inflamatória associada à doença do enxerto-contra-hospedeiro em camundongos**

**Versão Final**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

**Orientadora:** Profa. Dra. Marina Gomes Miranda e Castor Romero

Belo Horizonte

2022

043

Berg, Bárbara Betônico.

Efeitos do tratamento com endocanabinóides na resposta inflamatória associada à doença do enxerto-contra-hospedeiro em camundongos [manuscrito] / Bárbara Betônico Berg. – 2022.

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

Orientadora: Profa. Dra. Marina Gomes Miranda e Castor Romero.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Farmacologia. 2. Canabinoides. 3. Inflamação. 4. Doença Enxerto-Hospedeiro. I. Romero, Marina Gomes Miranda e Castor. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE N° 363 DE **BÁRBARA BETÔNICO BERG**  
"Efeitos do Tratamento Com Endocannabinóides na Resposta Inflamatória Associada  
À Doença do Enxerto-contra-hospedeiro em Camundongos"

**BÁRBARA BETÔNICO BERG**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **25 de outubro de 2022**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

**Prof. Dr. Rômulo Gonçalves Galvani**, Fiocruz/RJ  
**Profa. Dra. Aline Cristina de Campos**, FMRP/USP  
**Profa. Dra. Lucíola da Silva Barcelos**, ICB/UFMG  
**Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes**, ICB/UFMG  
**Profa. Dra. Marina Gomes Miranda e Castor Romero**, ICB/UFMG - Orientadora

**Belo Horizonte, 25 de outubro de 2022.**

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Caio Tavares Fagundes**, Professor do Magistério Superior, em 31/10/2022, às 14:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciola da Silva Barcelos**, Professora do Magistério Superior, em 31/10/2022, às 16:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rômulo Gonçalves Galvani**, Usuário Externo, em 31/10/2022, às 20:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marina Gomes Miranda e Castor Romero**, Professora do Magistério Superior, em 01/11/2022, às 17:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aline Cristina de Campos**, Usuário Externo, em 08/11/2022, às 14:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1864622** e o código CRC **2AA2F94F**.

***“To boldly go”***

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à minha orientadora Marina, que me apoiou, escutou, aconselhou e guiou durante os últimos seis anos. Não consigo descrever a sorte que tive em tê-la como orientadora. Saiba que carregarei comigo tudo que aprendi contigo durante o resto de minha vida, não apenas como pesquisadora, mas também como pessoa. Obrigada por ter tolerado meus momentos de stress, por ter sentado comigo pra me mostrar que havia um projeto lindo em meio aos meus resultados e me guiado para que juntas pudemos elucidar mecanismos e abordagens. Serei sempre muito grata por tudo.

Existem pessoas que marcam nossas vidas, amizades que sabemos que nunca poderão ser desfeitas, pois se tratam de laços profundos e eternos. Uma dessas pessoas é minha capivara, a Karla, minha companheira de laboratório. A pessoa que sempre me esperava para finalizar os protocolos, que me dizia para ter calma. Para confiar no meu trabalho e que tudo daria certo. Não sei como os últimos anos teriam sido sem você no laboratório, mas para mim é algo inimaginável não ter você logo ali. Obrigada por ser o coração do laboratório, mesmo que isso significasse que eu precisava ser a razão.

Sempre que um experimento desse errado, que o café acabasse ou que eu só estivesse exausta existiam três pessoas que eu sabia que me dariam conselhos e que seriam meu porto seguro para os momentos mais complexos, além de me apoiar e aconselhar nos momentos de felicidade. Obrigada Renata, Paula e Wallace. Principalmente as duas primeiras por terem sido meus guias e modelos nessa caminhada acadêmica. Muitos colegas e amigos da PGFisFar ficarão sempre na minha lembrança e estarei sempre aqui para o que precisarem. Anna Luiza, Ana Carolina Nicoleti, Ana Flávia, Carol, Gabi, Filipe (Decs), Héric, Adma, Amanda, Anna Paula, Emylle, Ildernandes, Katyana, Marla, Melissa, Nats (pequena e grande), Forbes, Roberta e principalmente meu grande amigo André. Um agradecimento especial a Marcelle, pela amizade, por me trazer ao laboratório e por ser a melhor amiga que se poderia ter. Mãe do meu afilhado. Esposa do Rafa. A pessoa mais calma que já conheci. Obrigada por existir.

Agradeço a todos os professores do departamento de Fisiologia e Farmacologia pelos ensinamentos. Ao Stêfany por toda a sua paciência e carinho, ao Webster por me salvar em diversas ocasiões e pelos abraços cheios de ternura e acolhimento. Ao professor Antônio pela orientação de carreira e nos projetos de comportamento animal. Ao professor Fabrício pelas discussões em português e alemão. Professores Steyner, Virgínia, Miriam, André Klein, Lucíola, Cibele, Maristela, vocês contribuíram diariamente para meu crescimento e me

acolheram de forma que me senti parte da PGFisFar, sentirei falta de tê-los a alguns passos de distância. Professora Silvia Guatimosim e Professor Márcio, obrigada pela oportunidade na representação discente, aprendi muito durante esses anos e não consigo mensurar a oportunidade que foi e quanto conhecimento adquirir trabalhando com vocês. E aos professores Mauro M. Teixeira, Vanessa Pinho e ao professor Thiago Romero por todo o apoio no desenvolvimento deste projeto.

Agradeço também ao meu pai, que muitas vezes mesmo sem compreender meu trabalho, me apoiou em todos os passos, mesmo que isso significasse uma ligação no meio da madrugada para o outro lado do mundo só pra me dizer que temos que manter o foco e que no fim tudo dá certo. E acima de tudo sempre me trouxe uma visão lógica e me forçou a definir metas de curto e longo prazo que me ajudaram a traçar meus objetivos.

Durante meu doutorado tivemos que passar pela pandemia, e logo no início perdi a pessoa que sempre foi meu porto-seguro, aquela que me criou e educou, que me ensinou a ser cientista. Obrigada vovó Soninha por me levar todos os dias ao jardim, por me ensinar evolução, filogenética, anatomia, o amor pela leitura e muito mais, mesmo que parecessem apenas curiosidades do dia-a-dia essas foram as bases que me levaram para o mundo da pesquisa.

Agradeço a meu amigo Dr. Douglas Thomaz, um dos pesquisadores mais brilhantes que já conheci, obrigada por me ensinar e auxiliar nos ensaios de docking, além de todo o apoio em seguir para a farmacologia. É uma imensa honra tê-lo como amigo. Gostaria de agradecer também ao meu melhor amigo, companheiro e apoiador: Douglas Faleiro. Obrigada por estar comigo nos momentos mais obscuros dos últimos anos e por me ofertar também os mais felizes.

Por fim, gostaria de agradecer às agências de fomento que colaboraram com este projeto, CAPES, FAPEMIG, PRPQ e CNPQ, sem as quais este trabalho não seria possível. Agradeço também ao Laboratório de Radiação Gamma localizado no CDTN e através do qual foi possível realizar a irradiação dos animais e ao Instituto René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz que doou animais SPF derivados de colônias do Biotério Central da UFMG para esta pesquisa, principalmente à Fernanda Trindade, Elem Maria dos Santos Mendes e Cleyson Viana Soares.



## RESUMO

A doença do enxerto-contra-hospedeiro (*'graft-versus-host disease'* - GVHD) é uma complicação secundária ao transplante de medula óssea e leva o receptor a desenvolver uma inflamação sistêmica com alta mortalidade e morbidade. Terapias atuais apresentam baixa efetividade profilática e comumente falham em promover um balanço entre inflamação e imunossupressão. O endocanabinóide Anandamida (AEA) e seu análogo mais saturado Palmitoiletanolamida (PEA) são moléculas imunomoduladoras endógenas produzidas sob demanda e rapidamente hidrolisadas. Neste trabalho, investigamos os efeitos destas N-acetiletanolaminas (NAEs) na complexa patologia da GVHD. Primeiramente avaliamos os efeitos de um inibidor seletivo e irreversível da hidrolase amida de ácido graxo (FAAH) o MAFP que, a partir da inibição desta enzima, leva ao aumento dos níveis endógenos das NAEs. Este tratamento levou a um aumento de 80% na sobrevida dos animais com GVHD. Em seguida os animais foram tratados com AEA exógena, que aumentou a sobrevida em 60%, reduzindo também os sinais clínicos da doença. O tratamento com AEA levou também à redução no número de células CD3, CD4 e CD8, reduzindo também a ativação destas duas últimas, sem reduzir citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Entretanto, AEA levou a um aumento de IL10 no intestino dos animais. De forma interessante, AEA reduz Mac-1 $\alpha$ , reduzindo desta forma a adesão das células transplantadas, nos vasos mesentéricos. Este efeito foi abolido por antagonista CB<sub>2</sub> e foi reproduzido pelo JWH133, um agonista seletivo deste receptor, cujo efeito foi também abolido pelo antagonismo de CB<sub>2</sub>. Em seguida, testamos a similaridade entre AEA e PEA e a capacidade de ligação à CB<sub>2</sub> de PEA para compreender se está seria uma molécula interessante para estudo. Encontramos uma similaridade de 63-85% entre estas moléculas a partir do refinamento energético, e 82-93% de similaridade após refinamento de ancoragem molecular, sendo que encontramos predominância da força eletrostática sobre a força estérica em relação à contribuição destas para comparação de sobreposição. Posteriormente, investigamos os efeitos do PEA e o tratamento levou a um aumento de 80% na sobrevida. Ademais, PEA protegeu o intestino de dano, reduzindo o número de células CD8 e a ativação de células CD4 e CD8. Assim como AEA, PEA não reduziu a liberação de citocinas, mas levou ao aumento de IL-10 e interferiu tanto no processo de adesão quanto de rolamento. Entretanto, seu efeito sob o aumento na sobrevida parece ser dependente de CB<sub>1</sub> e não CB<sub>2</sub>, e PEA levou à redução da diarreia dos animais, efeito este que foi abolido pelo tratamento com antagonista CB<sub>1</sub>. Desta forma, este estudo demonstra que existem outros fatores determinantes para interação farmacológica *in vivo*, além da similaridade molecular de dois fármacos. E ambos os receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> podem participar diferentemente na regulação e proteção contra a GVHD através de sua interação com endocanabinóides.

**Palavras-chave:** Inflamação, canabinóides, doença do enxerto-contra-hospedeiro

## ABSTRACT

Graft-versus-host disease (GVHD) —a secondary complication of bone marrow transplantation—leads the host to develop a systemic inflammatory illness with high mortality and morbidity. Current therapies lack prophylactic effectiveness and commonly fail to provide an immunological balance between inflammation and immunosuppression. The endocannabinoid, Anandamide (AEA) and its saturated analogue Palmitoylethanolamide (PEA) are immunomodulatory endogenous molecules produced on demand and rapidly hydrolyzed. In this present work, we investigate the effects of these N-Acetylethanolamines (NAEs) in the complex pathology of GVHD. First, we evaluated the effects of fatty acid amine hydrolase (FAAH) irreversible inhibitor (MAFP) that upon inhibition of FAAH leads to an increase of endogenous NAEs. This treatment led to an increase in survival of 80%. Next, mice were treated with exogenous AEA and it increased survival to 60% and reduce GVHD's clinical signs. Treatment with AEA also led to a reduction of the number of CD3, CD4, and CD8 cells while reducing the activation of CD4 and CD8 cells but it does not reduce inflammatory cytokines; however, it increases IL-10 in the intestines of mice. Interestingly, AEA reduces Mac-1 $\alpha$ , thus lowering adhesion of transplanted cells in mesenteric veins. Furthermore, the effects caused by anandamide treatment are due to CB<sub>2</sub> receptor, whereas AEA effects were abolished by CB<sub>2</sub> antagonist. These effects are mimicked by JWH133 - a CB<sub>2</sub> selective agonist – an, again, abolished by treatment with CB<sub>2</sub> antagonist. Therefore, we tested the level of similarity between AEA and PEA, and capability of docking in CB<sub>2</sub> receptor of PEA to understand if this would be an interesting target. We found a 63-85% similarity between these molecules in following energy refinement and 82-93% after docking refinement, and a found a predominance of the electrostatic force over the steric regarding their contributions in the overlay of the molecules. Subsequently, we investigate the effect of PEA and the treatment led to an increase of 80% in survival. Furthermore, PEA protected the intestine against damage, reduced the number of CD8 cells and reduced the activation of both CD4 and CD8. It also did not alter pro-inflammatory cytokine release, but increased IL10 and it did interfere with both rolling and adhesion of cells. Interestingly, however, the survival effect appears to be related to CB<sub>1</sub> interaction and not CB<sub>2</sub> and PEA led to a reduction in mice diarrhea and this effect was abolished by CB<sub>1</sub> antagonist. Thus, this study shows that molecular similarity is not the only factor determinant to its interaction *in vivo*, and other factors could interplay in this response. Furthermore, both CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors can play different roles in the protection against GVHD by endocannabinoids.

**Key-words:** Inflammation, cannabanoids, graft-versus-host disease

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - A GÊNESE DA DOENÇA DO ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO. O DANO AOS DIVERSOS ÓRGÃOS E TECIDOS DO HOSPEDEIRO, INCLUINDO OS ÓRGÃOS-ALVO, DURANTE O REGIME DE CONDICIONAMENTO INSTAURA UM AMBIENTE PRÓ-INFLAMATÓRIO ANTES MESMO QUE OCORRA O TRANSPLANTE DE MEDULA. APÓS O TRANSPLANTE ESTAS CÉLULAS ENCONTRARÃO UM AMBIENTE COM CÉLULAS REMANESCENTES JÁ ATIVADAS E HAVERÁ TAMBÉM APRESENTAÇÃO CRUZADA DE APCs DO DOADOR APÓS MATURAÇÃO E APCs REMANESCENTES DO RECEPTOR AOS LINFÓCITOS CD4 E CD8, ATRAVÉS DE MHC II E I, RESPECTIVAMENTE. POR FIM, AS CÉLULAS T ALOREATIVAS PASSARÃO POR EXPANSÃO CLONAL E MIGRARÃO PARA OS TECIDOS E ÓRGÃOS-ALVO PERPETUANDO A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E CAUSANDO DANOS. BASEADO EM SCHROEDER E DIPERSIO (2011). ..... 27
- FIGURA 2. O POTENCIAL CURATIVO DO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA. DIVERSAS DOENÇAS DE ORIGEM HEMATOPOIÉTICA (VERMELHO), DOENÇAS MALÍGNAS (AZUL) E DOENÇAS AUTO-IMUNES (AMARELO). ADEMAIS O TRANSPLANTE ALÔNICO, APESAR DE APRESENTAR UM MAIOR GVT/GVL LEVA À ALTO RISCO DE GVHD COM ATÉ 50% DE MORTALIDADE. TENDO COMO PRINCIPAIS ÓRGÃOS ALVO, DURANTE A GVHD AGUDA, O FÍGADO E O INTESTINO. .... 29
- FIGURA 3. FORMULAS QUÍMICAS DOS PRINCIPAIS CANABINOIDES COM POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO. AS ESTRUTURAS BIDIMENSIONAIS ENCONTRAM-SE SIMPLIFICADAS E NÃO SÃO A ÚNICA CONFORMAÇÃO POSSÍVEL PARA ESTAS MOLÉCULAS. NA PORÇÃO SUPERIOR DA FIGURA ENCONTRAM-SE DOIS FITOCANABINOIDES DERIVADOS DA *CANNABIS SATIVA*, O CANABIDIOL (CBD -  $C_{21}H_{30}O_2$ ) E O TETRAHIDROCANABINOL (THC -  $C_{21}H_{30}O_2$ ). NA PORÇÃO INFERIOR DA FIGURA ENCONTRAM-SE QUATROS DOS ENDOCANABINOIDES MAIS CONHECIDOS E ESTUDADOS, A ANANDAMIDA (AEA -  $C_{22}H_{37}NO_2$ ), O PALMITOILETANOLAMIDA (PEA -  $C_{18}H_{37}NO_2$ ), O 2-ARAQUIDONILGLICEROL (2-AG -  $C_{23}H_{38}O_4$ ) E A OLEOILETANOLAMIDA (OEA -  $C_{20}H_{39}NO_2$ ). ADAPTADO DE BURSTEIN E ZURIER (2009) E GUZMAN (2003). ..... 34
- FIGURA 4. SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE AEA E PEA. AQUI ILUSTRAM-SE SIMPLIFICAÇÕES DAS PRINCIPAIS VIAS DE SÍNTESE E DEGRADAÇÃO COMUNS À AEA E PEA. ABREVIATURAS UTILIZADAS: NAT – N-ACETILTRANSFERASE DEPENDENTE DE CÁLCIO; INAT - N-ACETILTRANSFERASE INDEPENDENTE DE CÁLCIO; NAPE – N-ACILFOSFATIDILETANOLAMINA; NAPE-PLZ – FOSFOLIPASE HIDROLIZADORA DE NAPE; GDE – GLICEROLFOSFODISTERASE; NAE – N-ACETILETANOLAMIDA, OEA – OLEOILETANOLAMIDA; COX-2 – CICLO-OXIGENASE 2. .... 36
- FIGURA 5. LOCALIZAÇÃO DOS RECEPTORES CANABINOIDES. DISTRIBUIÇÃO CLÁSSICA DOS RECEPTORES CB<sub>1</sub> E CB<sub>2</sub> PELO CORPO HUMANO. É IMPORTANTE SALIENTAR QUE ESTA DISTRIBUIÇÃO ENCONTRA-SE SIMPLIFICADA E INDICA O PREDOMÍNIO DE EXPRESSÃO DE UM RECEPTOR OU OUTRO NO SISTEMA OU ÓRGÃO INVESTIGADO. ADAPTADO DE (MUKHOPADHYAY *ET AL.*, 2016; ZHOU *ET AL.*, 2018) ..... 37

FIGURA 6. OBTENÇÃO DE ESLENÓCITOS E MEDULA DE CAMUNDONGOS DOADORES. APÓS A EUTÁNSIA DE DOADORES C57BL/6J OU BALB/C OS BAÇOS FORAM COLETADOS POR INCISÃO LATERAL, PORQUANTO AS MEDULAS FORAM OBTIDAS DO FÊMUR E TÍBIA DESTES ANIMAIS. (A) O BAÇO FOI REMOVIDO, MACERADO E FILTRADO EM CELLSTRAINER DE 70 $\mu$ M SENDO MANTIDO EM RPMI1640. (B) A MEDULA FOI OBTIDA DE FÊMUR OU TÍBIA ATRAVÉS DA INSERÇÃO DE UMA AGULHA DE 22G ACOPLADA A UMA SERINGA DE 3ML CONTENDO RPMI1640, PERMITINDO A EXPULÇÃO DA MEDULA DIRETAMENTE PARA UMA PLACA DE PETRI CONTENDO TAMBÉM MEIO DE CULTURA. IMAGEM ELABORADA COM AUXÍLIO DO SOFTWARE BIORENDER. ....	42
FIGURA 7. MODELO EXPERIMENTAL. ANIMAIS BALB/C PASSARAM POR ABLAÇÃO TOTAL DE SUA MEDULA RESIDENTE ATRAVÉS DE DUAS DOSES DE 3,5GY. EM SEGUIDA ESTES ANIMAIS RECEBERAM TRANSPLANTE DE $3 \times 10^7$ ESLENÓCITOS E $1 \times 10^7$ CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA DE (A) DOADORES SINGÊNICOS BALB/C OU (B) ALOGÊNICOS C57BL/6J, DE FORMA QUE ESTE SEGUNDO GRUPO FOI DIVIDIDO EM ANIMAIS QUE RECEBERAM VEÍCULO OU O FÁRMACO DE INTERESSE. ....	43
FIGURA 8. ANÁLISE DE SIMILARIDADE ENTRE AEA E PEA. (A) DESENHO ESTRUTURAL SIMPLIFICADO DA AEA SEGUIDA DE SEU SMILES E FÓRMULA MOLECULAR. (B) DESENHO ESTRUTURAL SIMPLIFICADO DA PEA SEGUIDA DE SEU SMILES E FÓRMULA MOLECULAR. (C) EXEMPLIFICAÇÃO DE COMO FOI CONDUZIDA A ANÁLISE DE SIMILARIDADE POR SOBREPOSIÇÃO DAS MOLÉCULAS, UTILIZANDO AS FORMAS DE MELHOR CLASSIFICAÇÃO DE AMBAS AS MOLÉCULAS PARA AVALIAR A INFLUÊNCIA DA CONTRIBUIÇÃO ESTÉRICA E ELETROSTÁTICA. IMAGEM OBTIDA ATRAVÉS DO SOFTWARE BIOVIA DISCOVERY STUDIO 2020. ....	47
FIGURA 9. ESTRUTURAS CRISTALOGRÁFICAS DO RECEPTORES CANABINOIDES. REPRESENTAÇÃO SIMPLIFICADA DAS ESTRUTURAS DOS RECEPTORES CANABINOIDES (A) CB <sub>1</sub> E (B) CB <sub>2</sub> , OBTIDOS ATRAVÉS DE CRISTALOGRAFIA POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X. AS IMAGENS FORAM GERADAS COM AUXÍLIO DO SOFTWARE BIOVIA DISCOVERY STUDIO 2020 E A IDENTIFICAÇÃO DE AMBAS AS ESTRUTURAS NO PROTEIN DATA BANK ENCONTRAM-SE ABAIXO DA IDENTIFICAÇÃO DAS ESTRUTURAS. ....	48
FIGURA 10. CÁLCULO DE AMBER. A FORMULA ACIMA É UMA SIMPLIFICAÇÃO DA FÓRMULA MATEMÁTICA UTILIZADA PARA O REFINAMENTO ENERGÉTICO ATRAVÉS DO AMBER. OS PARÂMETROS BASE PARA ESTE CÁLCULO SÃO AS LIGAÇÕES ENTRE ÁTOMOS, OS ÂNGULOS FORMADOS PELA LIGAÇÃO DE UMA TRINCA DE ÁTOMOS, AS POSSÍVEIS TORÇÕES ENTRE ESTAS LIGAÇÕES E A FORÇA DE VAN DER WAALS E FORÇA ELETROSTÁTICA. ....	50
FIGURA 11 . ANCORAGEM MOLECULAR. ATRAVÉS DAS COORDENADAS OBTIDAS PELO CONTROLE POSITIVO DE AGONISTA CB <sub>2</sub> FOI POSSÍVEL AVALIAR A CAPACIDADE DE LIGAÇÃO E AS INTERAÇÕES OCASIONADAS POR ESTA LIGAÇÃO TANTO PARA (A) AEA, DEMOSTRADA PRIMEIRAMENTE À DISTÂNCIA E DEPOIS EM DETALHE (B); QUANTO PARA PEA, TAMBÉM À DISTÂNCIA (C) E EM DETALHE (D). (E) SOBREPOSIÇÃO DAS MOLÉCULAS COM SUAS RESPECTIVAS FORMAS DE MAIOR CLASSIFICAÇÃO. É IMPORTANTE RESSALTAR QUE O RECEPTOR NÃO É APRESENTADO POR COMPLETO, UMA VEZ QUE O FOCO AQUI É DEMONSTRAR SEU SÍTIO ORTOSTÉRICO. IMAGENS OBTIDAS COM SOFTWARE BIOVIA DISCOVERY STUDIO 2020. ....	51
FIGURA 12.SOBREPOSIÇÃO DAS FORMAS DE MAIOR CLASSIFICAÇÃO APÓS ANÁLISE DE ANCORAGEM MOLECULAR. AEA	

(LARANJA) E PEA (ROXO) PODEM SER VISTAS EM SOBREPOSIÇÃO ATRAVÉS DA IMAGEM 3D GERADA PELO SOFTWARE BIOVIA DISCOVERY STUDIO 2020. OXIGÊNIOS SÃO REPRESENTADOS EM VERMELHO E NITROGÊNIOS EM AZUL. .... 52

FIGURA 13. ESTRATÉGIA DE GATE. (A) AMOSTRA INICIAL SEPARADA POR GRANULOSIDADE E TAMANHO. (B) SEPARAÇÃO DE CÉLULAS ÚNICAS DENTRO DA POPULAÇÃO DE GRANULÓCITOS. (C) SEPARAÇÃO DE CÉLULAS ÚNICAS DENTRO DA POPULAÇÃO DE MONÓCITOS. (D) SEPARAÇÃO DE CÉLULAS ÚNICAS DENTRO DA POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS. (E) IDENTIFICAÇÃO DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS CD3<sup>+</sup>. (F) IDENTIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE CÉLULAS CD4<sup>+</sup> E CD8<sup>+</sup>. (G) INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA DE CÉLULAS CD28 DENTRO DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. (H) INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA DE CÉLULAS CD28 DENTRO DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. .... 61

FIGURA 14 - ANÁLISE DE FOXP3. (A) AMOSTRA INICIAL DE CÉLULAS DO INTESTINO COM SELEÇÃO DE LINFÓCITOS TOTAIS. (B) IDENTIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE CÉLULAS CD4<sup>+</sup> E CD25<sup>+</sup>. (C - D) INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA DE CÉLULAS FOXP3 DENTRO DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. .... 62

FIGURA 15. INTRAVITAL EM MICROSCÓPIO CONFOCAL. (A) DESENHO ESQUEMÁTICO DE COMO O MESENTÉRIO FOI EXPOSTO DURANTE O PROCEDIMENTO, DE FORMA QUE O ANIMAL ENCONTRAVA-SE SOB EFEITO DE ANESTESIA EM ALOCADO EM UMA PLACA DE 37°C. (B) ZOOM DE VASO PARA EXEMPLIFICAR COMO FOI REALIZADA A ANÁLISE DE ROLAMENTO DURANTE UM MINUTO DE VÍDEO. (C) IMAGEM REPRESENTATIVA DE COMO FOI REALIZADA A ANÁLISE DE ADESÃO DAS CÉLULAS. .... 63

FIGURA 16 - TRATAMENTO COM MAFP, INIBIDOR SELETIVO NÃO-REVERSÍVEL DA ENZIMA FAAH. (A) O TRATAMENTO COM MAFP LEVOU AO AUMENTO DE SOBREVIDA QUANDO COMPARADO AO GRUPO VEÍCULO. (B) O TRATAMENTO LEVOU À REDUÇÃO DOS SINAIS CLÍNICOS QUANDO COMPARADO AO GRUPO VEÍCULO. (C) NÃO HOUVE DIFERENÇA ENTRE GRUPO MAFP E GRUPO VEÍCULO EM RELAÇÃO À VARIAÇÃO DE PESO. N=5 PARA TODOS OS GRUPOS. A SOBREVIDA FOI VERIFICADA ATRAVÉS DO TESTE DE LOG-RANK (MANTEL-COX), SENDO OS GRUPOS CONSIDERADOS DIFERENTES PARA P<0,05. ANOVA DE DUAS VIAS COM POS-TESTE DE BONFERRONI FOI UTILIZADO EM ANÁLISE DE MULTIPLAS COMPARAÇÕES PARA ENTRONTRAR DIFERENÇAS (P<0,05) ENTRE OS GRUPOS. \* REPRESENTA DIFERENÇA EM RELAÇÃO AO GRUPO SINGÊNICO E # EM RELAÇÃO AO GRUPO VEÍCULO..... 67

FIGURA 17. TRATAMENTO COM ANANDAMIDA EXÓGENA. ANIMAIS QUE RECEBERAM TRANSPLANTE ALOGÊNICO FORAM TRATADOS COM VEÍCULO OU AEA, NAS CONCENTRAÇÕES DE 2,5MG/KG, 5 MG/KG, 10MG/KG. (A) EFEITO DOS TRATAMENTOS NA SOBREVIDA. (B) ESCALA CLÍNICA. (C) VARIAÇÃO DE PESO EM GRAMAS. N=5 PARA TODOS OS GRUPOS. A SOBREVIDA FOI VERIFICADA ATRAVÉS DO TESTE DE LOG-RANK (MANTEL-COX), SENDO OS GRUPOS CONSIDERADOS DIFERENTES PARA P<0,05. ANOVA DE DUAS VIAS COM POS-TESTE DE BONFERRONI FOI UTILIZADO EM ANÁLISE DE MULTIPLAS COMPARAÇÕES PARA ENTRONTRAR DIFERENÇAS (P<0,05) ENTRE OS GRUPOS. \* REPRESENTA DIFERENÇA EM RELAÇÃO AO GRUPO SINGÊNICO E # EM RELAÇÃO AO GRUPO VEÍCULO. .... 70

FIGURA 18. PROCESSO DE ENXERTAMENTO. (A) ETAPAS DO PROCESSO DE ENXERTAMENTO, ESSENCIAL PARA QUE OCORRA O QUIMERISMO DO ANIMAL COM GVHD. (B) PORCENTAGEM DE ENXERTAMENTO ANALISADA NA MEDULA DE

ANIMAIS QUE RECEBERAM TRANSPLANTE ALOGÊNICO, APÓS 7 DIAS DO TRANSPLANTE. (C) PORCENTAGEM DE EXERTAMENTO ANALISADA NO BAÇO DE ANIMAIS QUE RECEBERAM TRANSPLANTE ALOGÊNICO, APÓS 7 DIAS DO TRANSPLANTE. N=5 PARA TODOS OS GRUPOS. TESTE T DE STUDENT, PARAMÉTRICO, NÃO-PAREADO E BICAUDAL FOI UTILIZADO PARA AVALIAR SE HAVIA SIGNIFICANCIA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS (P<0,05). \* REPRESENTA DIFERENÇA EM RELAÇÃO AO GRUPO SINGÊNICO E # EM RELAÇÃO AO GRUPO VEÍCULO..... 71

FIGURA 19. CITOMETRIA DE FLUXO DE BAÇO. (A) NÚMERO DE MONÓCITOS. (B) NÚMERO DE GRANULÓCITOS. (C) NÚMERO DE LINFÓCITOS. (D) NÚMERO DE LINFÓCITOS CD3<sup>+</sup>. (E) NÚMERO DE LINFÓCITOS CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. (F) NÚMERO DE LINFÓCITOS CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. (G) INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA DE CD28 DENTRE A POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. (H) INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA DE CD28 DENTRE A POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. (I) NÚMERO DE LINFÓCITOS CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. (J) INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA DE FOXP3 DENTRE A POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. N=5 PARA TODOS OS GRUPOS. ANOVA DE DUAS VIAS COM POS-TESTE DE BONFERRONI FOI UTILIZADO EM ANÁLISE DE MULTIPLAS COMPARAÇÕES PARA ENTRONTRAR DIFERENÇAS (P<0,05) ENTRE OS GRUPOS. \*REPRESENTA NÍVEL DE SIGNIFICANCIA DE P. .... 72

FIGURA 20. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO INTESTINO. (A) IMAGEM REPRESENTATIVA DO GRUPO SINGÊNICO. (B) IMAGEM REPRESENTATIVA DO GRUPO VEÍCULO. (C) IMAGEM REPRESENTATIVA DO GRUPO TRATADO COM AEA. EM DETALHE OBSERVA-SE A EM DETALHE (D – F) A REGIÃO BASAL ONDE FOI ENCONTRADO AUMENTO DE INFILTRADO INFLAMATÓRIO NO GRUPO VEÍCULO (G) SCORE HISTOPATOLÓGICO BASEADO NAS LÂMINAS CORADAS EM H&E DOS TRÊS GRUPOS EXPERIMENTAIS. N=5 PARA TODOS OS GRUPOS. ANOVA DE DUAS VIAS COM POS-TESTE DE BONFERRONI FOI UTILIZADO EM ANÁLISE DE MULTIPLAS COMPARAÇÕES PARA ENTRONTRAR DIFERENÇAS (P<0,05) ENTRE OS GRUPOS. \*REPRESENTA NÍVEL DE SIGNIFICANCIA DE P. .... 74

FIGURA 21. ANÁLISE DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS TRAVÉS DE ELISA DE AMOSTRAS DE INTESTINO. FORAM ANALISADAS AS QUIMIOCINAS PRO-INFLAMATÓRIAS (A) CCL2, (B) CCL3, (C) CCL5. AS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS (D) TNFA E (E) IFN $\gamma$ . E TAMBÉM (F) IL-10, UMA INTERLEUCINA ANTI-INFLAMATÓRIA. N=5 PARA TODOS OS GRUPOS. ANOVA DE DUAS VIAS COM POS-TESTE DE BONFERRONI FOI UTILIZADO EM ANÁLISE DE MULTIPLAS COMPARAÇÕES PARA ENTRONTRAR DIFERENÇAS (P<0,05) ENTRE OS GRUPOS. \*REPRESENTA NÍVEL DE SIGNIFICANCIA DE P. .... 75

FIGURA 22. CITOMETRIA DE FLUXO DE INTESTINO. (A) NÚMERO DE LINFÓCITOS. (B) NÚMERO DE LINFÓCITOS CD3<sup>+</sup>. (C) NÚMERO DE LINFÓCITOS CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. (D) NÚMERO DE LINFÓCITOS CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. (E) INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA DE CD28 DENTRE A POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. (F) INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA DE CD28 DENTRE A POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. (G) NÚMERO DE LINFÓCITOS CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. (H) INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA DE FOXP3 DENTRE A POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. N=5 PARA TODOS OS GRUPOS. ANOVA DE DUAS VIAS COM POS-TESTE DE BONFERRONI FOI UTILIZADO EM ANÁLISE DE MULTIPLAS COMPARAÇÕES PARA ENTRONTRAR DIFERENÇAS (P<0,05) ENTRE OS GRUPOS. \*REPRESENTA NÍVEL DE SIGNIFICANCIA DE P. .... 76

FIGURA 23. ANÁLISE DE ROLAMENTO E ADESÃO ATRAVÉS DE MICROSCOPIA INTRAVITAL. (A) ILUSTRAÇÃO DO ENSAIO DE

MICROSCOPIA INTRAVITAL. O ANIMAL É ANESTESIADO E POSICIONADO EM PLACA QUENTE (37°C). É REALIZADA UMA INCISÃO MEDIAL NO ABDOME E PERITÔNIO EXPONDO O MESENTÉRIO. OS VASOS MESENTÉRICOS SÃO CUIDADOSAMENTE ABERTOS E IRRIGADOS COM PBS1X, PERMITINDO A VIZUALIZAÇÃO DO ROLAMENTO E ADEÃO DAS CÉLULAS EM TEMPO REAL. (B) NÚMERO DE CÉLULAS EM ROLAMENTO DURANTE UM MINUTO. (C) NÚMERO DE CÉLULAS ADERIDAS EM 100UM DE VASO. N=5 PARA TODOS OS GRUPOS. ANOVA DE DUAS VIAS COM POS-TESTE DE BONFERRONI FOI UTILIZADO EM ANÁLISE DE MULTIPLAS COMPARAÇÕES PARA ENTRONTRAR DIFERENÇAS (P<0,05) ENTRE OS GRUPOS. \*REPRESENTA NÍVEL DE SIGNIFICANCIA DE P. .... 77

FIGURA 24. PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR CANABINÓIDE DO TIPO 2 NA ADESÃO CELULAR. (A) NÚMERO DE CÉLULAS EM ROLAMENTO DURANTE UM MINUTO EM ANIMAIS TRATADOS COM VEÍCULO, AM630, AEA OU AM630+AEA. (B) NÚMERO DE CÉLULAS ADERIDAS EM 100UM DE VASO EM ANIMAIS TRATADOS COM VEÍCULO, AM630, AEA OU AM630+AEA. N=5 PARA TODOS OS GRUPOS. ANOVA DE DUAS VIAS COM POS-TESTE DE BONFERRONI FOI UTILIZADO EM ANÁLISE DE MULTIPLAS COMPARAÇÕES PARA ENTRONTRAR DIFERENÇAS (P<0,05) ENTRE OS GRUPOS. \*REPRESENTA NÍVEL DE SIGNIFICANCIA DE P. .... 78

FIGURA 25. INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA DE CD11B EM LINFÓCITOS. (A) MFI DE CD11B EM CÉLULAS CD3<sup>+</sup>. (B) MFI DE CD11B EM CÉLULAS CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. (C) MFI DE CD11B EM CÉLULAS CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. N=5 PARA TODOS OS GRUPOS. ANOVA DE DUAS VIAS COM POS-TESTE DE BONFERRONI FOI UTILIZADO EM ANÁLISE DE MULTIPLAS COMPARAÇÕES PARA ENTRONTRAR DIFERENÇAS (P<0,05) ENTRE OS GRUPOS. \*REPRESENTA NÍVEL DE SIGNIFICANCIA DE P. .... 79

FIGURA 26. ANÁLISE DOS EFEITOS DO AGONISTA SELETIVO DE CB<sub>2</sub> ATRAVÉS DE MICROSCOPIA INTRAVITAL. (A) NÚMERO DE CÉLULAS EM ROLAMENTO DURANTE UM MINUTO EM ANIMAIS TRATADOS COM VEÍCULO, AM630, JWH133 OU AM630+JWH133. (B) NÚMERO DE CÉLULAS ADERIDAS EM 100UM DE VASO EM ANIMAIS TRATADOS COM VEÍCULO, AM630, JWH133 OU AM630+JWH133. N=5 PARA TODOS OS GRUPOS. ANOVA DE DUAS VIAS COM POS-TESTE DE BONFERRONI FOI UTILIZADO EM ANÁLISE DE MULTIPLAS COMPARAÇÕES PARA ENTRONTRAR DIFERENÇAS (P<0,05) ENTRE OS GRUPOS. \*REPRESENTA NÍVEL DE SIGNIFICANCIA DE P. .... 80

FIGURA 27. ANÁLISE DE ALTERAÇÕES NO FÍGADO. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO (A) GRUPO SINGÊNICO, (B) GRUPO VEÍCULO, (C) GRUPO AEA, REPRESENTADAS NO GRÁFICO DE (D) SCORE HISTOPATOLÓGICO. ATRAVÉS DO ENSAIO DE ELISA FORAM AVALIADAS AS CITOCINAS (E) CCL2, (F) CCL3, (G) CCL5; AS QUIMIOCINAS (H) TNFA, (I) IFN $\gamma$ ; E A CITOCINA ANTI-INFLAMATÓRIA (J) IL-10. N=5 PARA TODOS OS GRUPOS. ANOVA DE DUAS VIAS COM POS-TESTE DE BONFERRONI FOI UTILIZADO EM ANÁLISE DE MULTIPLAS COMPARAÇÕES PARA ENTRONTRAR DIFERENÇAS (P<0,05) ENTRE OS GRUPOS. \*REPRESENTA NÍVEL DE SIGNIFICANCIA DE P. .... 81

FIGURA 28. - CITOMETRIA DE FLUXO DE FÍGADO. (A) NÚMERO DE LINFÓCITOS. (B) NÚMERO DE LINFÓCITOS CD3<sup>+</sup>. (C) NÚMERO DE LINFÓCITOS CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. (D) NÚMERO DE LINFÓCITOS CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. (E) INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA DE CD28 DENTRE A POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. (F) INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA DE CD28 DENTRE A POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. (G) NÚMERO DE LINFÓCITOS CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. (H) INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA DE FOXP3 DENTRE A POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. N=5 PARA TODOS OS GRUPOS. ANOVA DE DUAS VIAS COM POS-TESTE DE BONFERRONI FOI UTILIZADO EM ANÁLISE DE MULTIPLAS COMPARAÇÕES PARA ENTRONTRAR DIFERENÇAS (P<0,05) ENTRE OS GRUPOS. \*REPRESENTA NÍVEL DE SIGNIFICANCIA DE P. .... 82

FIGURA 29 - ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES CANABINÓIDES NA DOENÇA. (A) ANÁLISE DE SOBREVIDA DE ANIMAIS SINGÊNICOS E ANIMAIS TRATADOS COM VEÍCULO OU ANTAGONISTA DO RECEPTOR CANABINÓIDE DO TIPO 1 (CB<sub>1</sub>) – AM251. (B) ANÁLISE DE SOBREVIDA DE ANIMAIS SINGÊNICOS E ANIMAIS TRATADOS COM VEÍCULO OU ANTAGONISTA DO RECEPTOR CANABINÓIDE DO TIPO 2 (CB<sub>2</sub>) – AM630. N=10 PARA TODOS OS GRUPOS. A SOBREVIDA FOI VERIFICADA ATRAVÉS DO TESTE DE LOG-RANK (MANTEL-COX), SENDO OS GRUPOS CONSIDERADOS DIFERENTES PARA P<0,05. \* REPRESENTA A COMPARAÇÃO COM O GRUPO SINGÊNICO E # COM GRUPO VEÍCULO. .... 83

FIGURA 30 - AÇÃO DE ANANDAMIDA EM RECEPTORES CANABINÓIDES. ANÁLISE DE SOBREVIDA DE ANIMAIS SINGÊNICOS, OU ALOGÊNICOS, TRATADOS COM VEÍCULO, AEA, AM251+AEA OU AM630+AEA. N=10 PARA TODOS OS GRUPOS. A SOBREVIDA FOI VERIFICADA ATRAVÉS DO TESTE DE LOG-RANK (MANTEL-COX), SENDO OS GRUPOS CONSIDERADOS DIFERENTES PARA P<0,05. \* REPRESENTA A COMPARAÇÃO COM O GRUPO SINGÊNICO E # COM GRUPO VEÍCULO..... 84

FIGURA 31. ENSAIO DE ANCORAGEM MOLECULAR PARA COMPARAÇÃO DE LIGAÇÃO DE AEA E PEA. (A) A FORMA MOLECULAR DE AEA DE MENOR ENERGIA E QUE RECEBEU MAIOR CLASSIFICAÇÃO DE LIGAÇÃO AO RECEPTOR ESTÁ REPRESENTADA DENTRO DO SÍTIO DE LIGAÇÃO DE CB<sub>2</sub>. (B) A PRINCIPAL LIGAÇÃO ESTABELECIDADA POR AEA É COM A LEUCINA182, ALÉM DE REALIZAR TAMBÉM LIGAÇÕES ALQUIL E PI-AQUIL COM OUTRAS PARTES DO SÍTIO DE LIGAÇÃO. (C) A FORMA MOLECULAR DE PEA DE MENOR ENERGIA E QUE RECEBEU MAIOR CLASSIFICAÇÃO DE LIGAÇÃO AO RECEPTOR ESTÁ REPRESENTADA DENTRO DO SÍTIO DE LIGAÇÃO DE CB<sub>2</sub>. (D) A PRINCIPAL LIGAÇÃO ESTABELECIDADA POR PEA É COM A LEUCINA182, ALÉM DE REALIZAR TAMBÉM LIGAÇÕES DE VAN DER WAALS, LIGAÇÕES DE CARBONO E LIGAÇÕES ALQUIL E PI- ALQUIL COM OUTRAS PARTES DO SÍTIO DE LIGAÇÃO. (E) AM12033 FOI UTILIZADO COMO CONTROLE POSITIVO DE LIGAÇÃO, OBSERVA-SE SUA INTERAÇÃO PRINCIPAL COM LEUCINA182 E SERINA285, ALÉM DE SUAS LIGAÇÕES PI- ALQUIL E PI-PI. .... 87

FIGURA 32. ENSAIO DE SOBREPOSIÇÃO. (A) ANÁLISE DE SIMILARIDADE COM AUMENTO LINEAR DA ENERGIA ELETROSTÁTICA. (B) ANÁLISE DE SIMILARIDADE COM REDUÇÃO LINEAR DA ENERGIA ESTÉRICA..... 88

FIGURA 33. ENSAIO DE SOBREPOSIÇÃO APÓS MINIMIZAÇÃO ENERGÉTICA E REFINAMENTO POR ALGORÍTIMOS DE ANCORAGEM MOLECULAS. (A) ANÁLISE DE SIMILARIDADE COM AUMENTO LINEAR DA ENERGIA ELETROSTÁTICA. (B) ANÁLISE DE SIMILARIDADE COM REDUÇÃO LINEAR DA ENERGIA ESTÉRICA..... 89

FIGURA 34. TRATAMENTO COM PEA. ANIMAIS QUE RECEBERAM TRANSPLANTE ALOGÊNICO FORAM TRATADOS COM VEÍCULO OU PEA, NAS CONCENTRAÇÕES DE 1MG/KG, 5 MG/KG, 10MG/KG. (A) EFEITO DOS TRATAMENTOS NA SOBREVIDA. (B) ESCALA CLÍNICA. (C) VARIAÇÃO DE PESO EM GRAMAS. N=5 PARA TODOS OS GRUPOS. A SOBREVIDA FOI VERIFICADA ATRAVÉS DO TESTE DE LOG-RANK (MANTEL-COX), SENDO OS GRUPOS CONSIDERADOS DIFERENTES PARA P<0,05. \* REPRESENTA A COMPARAÇÃO COM O GRUPO SINGÊNICO E # COM GRUPO VEÍCULO. ANOVA DE DUAS VIAS COM POS-TESTE DE BONFERRONI FOI UTILIZADO EM ANÁLISE DE MULTIPLAS COMPARAÇÕES

PARA ENTRONTRAR DIFERENÇAS NOS TESTES DE ESCALA CLINICA E VARIAÇÃO DE PESO ( $P<0,05$ ) ENTRE OS GRUPOS.\*REPRESENTA NÍVEL DE SIGNIFICANCIA DE P. .... 91

FIGURA 35. CITOMETRIA DE FLUXO DE BAÇO. (A) NÚMERO DE MONÓCITOS. (B) NÚMERO DE GRANULÓCITOS. (C) NÚMERO DE LINFÓCITOS. (D) NÚMERO DE LINFÓCITOS  $CD3^+$ . (E) NÚMERO DE LINFÓCITOS  $CD3^+CD4^+$ . (F) NÚMERO DE LINFÓCITOS  $CD3^+CD8^+$ . (G) INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA DE CD28 DENTRE A POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS  $CD3^+CD4^+$ . (H) INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA DE CD28 DENTRE A POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS  $CD3^+CD8^+$ . (I) NÚMERO DE LINFÓCITOS  $CD4^+CD25^+$ . (J) INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA DE FOXP3 DENTRE A POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS  $CD4^+CD25^+$ . (K) PORCENTAGEM DE ENXERTAMENTO ANALISADA NO BAÇO DE ANIMAIS QUE RECEBERAM TRANSPLANTE ALOGÊNICO, APÓS 7 DIAS DO TRANSPLANTE. (L) PORCENTAGEM DE ENXERTAMENTO ANALISADA NA MEDULA DE ANIMAIS QUE RECEBERAM TRANSPLANTE ALOGÊNICO, APÓS 7 DIAS DO TRANSPLANTE. N=5 PARA TODOS OS GRUPOS. ANOVA DE DUAS VIAS COM POS-TESTE DE BONFERRONI FOI UTILIZADO EM ANÁLISE DE MULTIPLAS COMPARAÇÕES PARA ENTRONTRAR DIFERENÇAS ( $P<0,05$ ) ENTRE OS GRUPOS.\*REPRESENTA NÍVEL DE SIGNIFICANCIA DE P. O TESTE T DE STUDENT, BICAUDAL, PARAMETRICO E NÃO-PAREADO FOI UTILIZADO NA COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS PARA O TESTE DE ENXERTAMENTO, OS GRUPOS FORAM CONSIDERADOS DIFERENTES PARA  $P<0,05$ . .... 93

FIGURA 36. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS ÓRGÃOS-ALVO. IMAGENS REPRESENTATIVAS DE INTESTINO CORADAS COM H&E DOS GRUPOS (A) SINGÊNICO, (B) VEÍCULO, (C) PEA, (D) SCORE HISTOPATOLÓGICO DAS ALTERAÇÕES ENCONTRADAS. IMAGENS REPRESENTATIVAS DE FÍGADO CORADAS COM H&E DOS GRUPOS (E) SINGÊNICO, (F) VEÍCULO, (G) PEA, (H) SCORE HISTOPATOLÓGICO DAS ALTERAÇÕES ENCONTRADAS. N=8 OU 9 PARA OS OS GRUPOS. ANOVA DE DUAS VIAS COM POS-TESTE DE BONFERRONI FOI UTILIZADO EM ANÁLISE DE MULTIPLAS COMPARAÇÕES PARA ENTRONTRAR DIFERENÇAS ( $P<0,05$ ) ENTRE OS GRUPOS.\*REPRESENTA NÍVEL DE SIGNIFICANCIA DE P. .... 94

FIGURA 37. CITOMETRIA DE FLUXO DE FÍGADO. (A) NÚMERO DE LINFÓCITOS. (B) NÚMERO DE LINFÓCITOS  $CD3^+$ . (C) NÚMERO DE LINFÓCITOS  $CD3^+CD4^+$ . (D) NÚMERO DE LINFÓCITOS  $CD3^+CD8^+$ . (E) INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA DE CD28 DENTRE A POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS  $CD3^+CD4^+$ . (F) INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA DE CD28 DENTRE A POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS  $CD3^+CD8^+$ . (G) NÚMERO DE LINFÓCITOS  $CD4^+CD25^+$ . (H) INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA DE FOXP3 DENTRE A POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS  $CD4^+CD25^+$ . N=5 PARA TODOS OS GRUPOS. ANOVA DE DUAS VIAS COM POS-TESTE DE BONFERRONI FOI UTILIZADO EM ANÁLISE DE MULTIPLAS COMPARAÇÕES PARA ENTRONTRAR DIFERENÇAS ( $P<0,05$ ) ENTRE OS GRUPOS.\*REPRESENTA NÍVEL DE SIGNIFICANCIA DE P. .... 96

FIGURA 38. CITOMETRIA DE FLUXO DE INTESTINO. (A) NÚMERO DE LINFÓCITOS. (B) NÚMERO DE LINFÓCITOS  $CD3^+$ . (C) NÚMERO DE LINFÓCITOS  $CD3^+CD4^+$ . (D) NÚMERO DE LINFÓCITOS  $CD3^+CD8^+$ . (E) INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA DE CD28 DENTRE A POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS  $CD3^+CD4^+$ . (F) INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA DE CD28 DENTRE A POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS  $CD3^+CD8^+$ . (G) NÚMERO DE LINFÓCITOS  $CD4^+CD25^+$ . (H) INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA DE FOXP3 DENTRE A POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. N=5 PARA TODOS OS GRUPOS. ANOVA DE DUAS VIAS COM POS-TESTE DE BONFERRONI FOI UTILIZADO EM ANÁLISE DE MULTIPLAS COMPARAÇÕES PARA ENTRONTRAR DIFERENÇAS (P<0,05) ENTRE OS GRUPOS. \*REPRESENTA NÍVEL DE SIGNIFICANCIA DE P. .... 98

FIGURA 39. ANÁLISE EM MICROSCOPIA INTRAVITAL DOS EFEITOS DE PEA. (A) AVALIAÇÃO DE ROLAMENTO DAS CÉLULAS DURANTE UM MINUTO. (B) NÚMERO DE CÉLULAS ADERIDAS EM 100MM DE VASO. (C) MFI DE CD11B EM CÉLULAS CD3<sup>+</sup>. (D) MFI DE CD11B EM CÉLULAS CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>. (E) MFI DE CD11B EM CÉLULAS CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>. N=5 PARA TODOS OS GRUPOS. ANOVA DE DUAS VIAS COM POS-TESTE DE BONFERRONI FOI UTILIZADO EM ANÁLISE DE MULTIPLAS COMPARAÇÕES PARA ENTRONTRAR DIFERENÇAS (P<0,05) ENTRE OS GRUPOS. \*REPRESENTA NÍVEL DE SIGNIFICANCIA DE P. .... 99

FIGURA 40. EXPRESSÃO DE CD62L EM LINFÓCITOS CD4 E CD8 APÓS TRATAMENTO COM NAEs. PRIMEIRAMENTE OBSERVA-SE A EXPRESSÃO DE CD62L EM CÉLULAS DE ANIMAIS TRATADOS COM AEA. (A) MFI DE CD62L EM CÉLULAS CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> E (B) MFI DE CD62L EM CÉLULAS CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. EM SEGUIDA OBSERVA-SE A EXPRESSÃO DESSA MOLÉCULA EM CÉLULAS DE ANIMAIS TRATADOS COM PEA (C) MFI DE CD62L EM CÉLULAS CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> E (D) MFI DE CD62L EM CÉLULAS CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. N=5 PARA TODOS OS GRUPOS. ANOVA DE DUAS VIAS COM POS-TESTE DE BONFERRONI FOI UTILIZADO EM ANÁLISE DE MULTIPLAS COMPARAÇÕES PARA ENTRONTRAR DIFERENÇAS (P<0,05) ENTRE OS GRUPOS. \*REPRESENTA NÍVEL DE SIGNIFICANCIA DE P. .... 100

FIGURA 41. ANÁLISE DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS ATRAVÉS DE ELISA. NO FÍGADO FORAM AVALIADAS (A) CCL2, (B) CCL3, (C) CCL5, (D) TNFA, (E) IFN $\gamma$ , (F) IL-10. NO INTESTINO TAMBÉM FORAM AVALIADAS (G) CCL2, (H) CCL3, (I) CCL5, (J) TNFA, (K) IFN $\gamma$ , (L) IL-10. N=5 PARA TODOS OS GRUPOS. ANOVA DE DUAS VIAS COM POS-TESTE DE BONFERRONI FOI UTILIZADO EM ANÁLISE DE MULTIPLAS COMPARAÇÕES PARA ENTRONTRAR DIFERENÇAS (P<0,05) ENTRE OS GRUPOS. \*REPRESENTA NÍVEL DE SIGNIFICANCIA DE P. .... 102

FIGURA 42. AÇÃO DE PEA EM RECEPTORES CANABINÓIDES. ANÁLISE DE SOBREVIDA DE ANIMAIS SINGÊNICOS, OU ALOGÊNICOS, TRATADOS COM VEÍCULO, PEA, AM251+PEA OU AM630+PEA. \*INDICA ANÁLISE ESTATÍSTICA EM RELAÇÃO AO GRUPO SINGÊNICO E # INDICA ANÁLISE ESTATÍSTICA EM RELAÇÃO AO GRUPO VEÍCULO. N=10 PARA TODOS OS GRUPOS. A SOBREVIDA FOI VERIFICADA ATRAVÉS DO TESTE DE LOG-RANK (MANTEL-COX), SENDO OS GRUPOS CONSIDERADOS DIFERENTES PARA P<0,05. \* REPRESENTA A COMPARAÇÃO COM O GRUPO SINGÊNICO E # COM GRUPO VEÍCULO..... 103

FIGURA 43. A IMPORTÂNCIA DE CB<sub>1</sub> NO INTESTINO. (A) A ATIVAÇÃO DO RECEPTOR CB<sub>1</sub> ESTÁ ENVOLVIDA NO PROCESSO DE CONTROLE DA CONTRAÇÃO INTESTINAL ATRAVÉS DA INIBIÇÃO DA LIBERAÇÃO DE ACh (ADAPTADO DE DIPATRIZIO (2016)). (B) VARIAÇÃO DA QUALIDADE DAS FEZES DOS ANIMAIS APÓS TRANSPLANTE. O PRIMEIRO PONTO APÓS O TRANSPLANTE INDICA O PERÍODO DE ENXERTAMENTO EM QUE O DANO OCASIONADO PELO REGIME DE CONDICIONAMENTO É EVIDENTE E LEVA A DANOS INTESTINAIS OCASIONANDO EM FEZES LEVEMENTE PASTOSAS. APÓS ESTE PERÍODO OS ANIMAIS QUE RECEBERAM TRANSPLANTE SINGÊNICO APRESENTAM RETORNO AS CONDIÇÕES BASAIS, ENQUANTO ANIMAIS COM GVHD APRESENTAM AGRAVAMENTO DESTE QUADRO ATÉ A MORTALIDADE. O TRATAMENTO COM PEA PREVENIU ESTE AGRAVAMENTO. N=5 PARA TODOS OS GRUPOS.

ANOVA DE DUAS VIAS COM POS-TESTE DE BONFERRONI FOI UTILIZADO EM ANÁLISE DE MULTIPLAS COMPARAÇÕES PARA ENTRONTRAR DIFERENÇAS ( $P < 0,05$ ) ENTRE OS GRUPOS. \*REPRESENTA NÍVEL DE SIGNIFICANCIA DE P. 104

FIGURA 44. ANÁLISE INTRAVITAL PEA NA PRESENÇA DE ANTAGONISTAS CB<sub>1</sub> E CB<sub>2</sub>. (A) IMAGEM REPRESENTATIVA DA TÉCNICA DE MICROSCOPIA INTRAVITAL REALIZADA PELA APLICAÇÃO DE RODAMINA INTRAVENOSA. (B) NÚMERO DE CÉLULAS EM ROLAMENTO POR MINUTO. (C) NÚMERO DE CÉLULAS EM ADESÃO EM 100M DE VASO. N=3 PARA CADA GRUPO NESTE EXPERIMENTO. ANOVA DE DUAS VIAS COM PÓS-TESTE DE BONFERRONI FOI UTILIZADO PARA COMPARAR AS MÉDIAS ENTRE OS GRUPOS, OS GRUPOS FORAM CONSIDERADOS DIFERENTES QUANTO  $P < 0,05$ .  
..... 105

FIGURA 45. MIGRAÇÃO DE CÉLULAS GFP+ PARA OS ÓRGÃOS-ALVO. A IMAGEM DE MICROSCOPIA INTRAVITAL APRESENTA AS DIFERENÇAS DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS GFP+ (VERDE) TANTO NO FÍGADO QUANTO NO ÍLEO DE ANIMAIS QUE RECEBERAM TRANSPLANTE ALOGÊNICO E SINGÊNICO. ADAPTADA DE PANOSKALTSIS-MORTARI *ET AL.* (2004)..... 115

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. ESCALA CLÍNICA. A ESCALA, OU SCORE CLINICO, AVALIA A PROGRESSÃO E MANIFESTAÇÃO DOS SINAIS CLÍNICOS ASSOCIADOS À INFLAMAÇÃO DESENCADEADA PELA GVHD. ESTA TABELA REPRESENTA A CONVERSAÇÃO DE DADOS QUALITATIVOS EM DADOS QUANTITATIVOS ATRAVÉS DA PADRONIZAÇÃO DE PARÂMETROS QUE DEVEM SER OBSERVADOA NO ANIMAL. ESTA TABELA FOI ADAPTADA DE CASTOR ET AL. (2011).....	54
TABELA 2. CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE SECÇÕES DE JEJUNO-ÍLEO. A ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO INTESTINO TEVE POR FOCO A REGIÃO DO JEJUNO-ÍLEO E AS ALTERAÇÕES ENCONTRADAS EM SEU EPITÉLIO, LÂMINA PRÓPRIA, CAMADA MUSCULAR E SEROSA FORAM PONTUADAS. ....	57
TABELA 3. CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE SECÇÕES DE FÍGADO. A ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA NO FÍGADO TEVE COMO PRINCIPAIS ALVOS AS ALTERAÇÕES DO PARÊNQUIMA E ACHADO DE INFILTRADO INFLAMATÓRIO NAS REGIÕES PERIportal E INTRALOBULAR. ....	58
TABELA 4. QUANTIFICAÇÃO DE AEA. OS NÍVEIS DE AEA FORAM QUANTIFICADOS ATRAVÉS DE LC-MS/MS E ESTÃO EXPRESSOS EM PICOGRAMAS POR MILIGRAMA DE AMOSTRA OBTIDA.....	66
TABELA 5. RESULTADOS DE ANCORAGEM DE AEA. FORAM ANALISADAS AS PRIMEIRAS DEZ FORMAS DE MELHOR CLASSIFICAÇÃO DE AEA. OS VALORES ESTÃO REPRESENTADOS EM Kcal mol <sup>-1</sup> . ....	85
TABELA 6. RESULTADOS DE ANCORAGEM DE PEA. FORAM ANALISADAS AS PRIMEIRAS DEZ FORMAS DE MELHOR CLASSIFICAÇÃO DE PEA. OS VALORES ESTÃO REPRESENTADOS EM Kcal mol <sup>-1</sup> .....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-HT1A** - 5-hidroxitriptamina 1<sup>a</sup> ou receptor de serotonina 1A
- AEA** – Anandamida
- APCs** - células apresentadoras de antígenos
- BSA** – albumina do soro bovino
- CB<sub>1</sub>** – Receptor canabinoide central ou Receptor canabinoide tipo 1
- CB<sub>2</sub>** – Receptor canabinoide periférico ou Receptor canabinoide tipo 2
- CBD** - Canabidiol
- CCL2** –proteína quimioatraente para monócitos
- CCL3** – proteína inflamatória de macrófagos 1-alfa
- CCL5** – RANTES ou quimiocina ligante 5
- CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais
- Co-60** - Cobalto 60
- COX-2** – Ciclo-oxigenase 2
- DECH** - doença do enxerto-contra-hospedeiro
- DNBS** - ácido sulfônico dinitrobenzeno
- EBMT** - European Society of Blood and Marrow Transplantation
- ELISA** – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ou ensaio de imunoenzimático
- FoxP3** - Forkhead helix transcription factor p3
- GDE** – glicerolfosfodisterase
- GFP** - green fluorescent protein ou proteína verde fluorescente
- GVHD** - Graft-versus-Host-disease
- GVL** - Graft versus Leukemia
- H2Db** - complexo principal de histocompatibilidade classe I Db
- H2Dd** - complexo principal de histocompatibilidade classe I Dd

**HLA** - antígeno leucocitário humano

**HSCT** - Transplante alogênico de células hematopoiéticas

**iNAT** - N-acetiltransferase independente de cálcio

**INF- $\gamma$**  - interferon gama

**JI** – Jejuno-íleo

**MAGIC** - Consórcio Internacional para GVHD aguda Monte Sinai

**MGL** - monoacilglicerol lipase

**MHC** - complexo principal de histocompatibilidade

**miHA** - antígeno de histocompatibilidade menor

**NAE** – N-acetiletanolamida

**NAPE** – N-acilfosfatidiletanolamina

**NAPE-PL** – fosfolipase hidrolizadora de NAPE

**NAT** – N-acetiltransferase dependente de cálcio

**NIH** - National Institutes of Health

**OEA** – Oleoiletanolamida

**PBS** – tampão salina fosfato

**PEA** – palmitoiletanolamida

**PFA** - paraformaldeído

**PPAR** - receptor ativado por proliferador de peroxissoma

**rpm** - rotações por minuto

**RPMI 1640** – Meio 1640 desenvolvido pelo Instituto Roswell Park Memorial

**SBF** – Soro fetal bovino

**SMILES** - simplified molecular-input line-entry system

**TGI** – trato gastro intestinal

**TMO** – Transplante de Medula óssea

**TNBS** - ácido sulfônico 2,4,6-trinitrobenzeno

**TNF- $\alpha$**  - Fator de necrose tumoral alfa

**TRPV1** – Receptor de potencial transiente vanilóide do subtipo 1

**UFMG** - Universidade Federal de Minas Gerais

**$\Delta$ 9-THC** -  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>25</b>
1.1. A DOENÇA DO ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO OU GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE (GVHD)	25
1.2. OS ÓRGÃOS-ALVO DA GVHD AGUDA	27
1.3. PROFILAXIA E TRATAMENTO CONTRA A GVHD	30
1.4. O MODELO EXPERIMENTAL	31
1.5. O SISTEMA CANNABINÓIDE	32
<b>OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
<b>2. OBJETIVO GERAL</b>	<b>38</b>
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
<b>3. METODOLOGIA</b>	<b>40</b>
3.1. ANIMAIS	40
3.2. INDUÇÃO DA DOENÇA DO ENXERTO-VERSUS-HOSPEDEIRO	40
3.3. QUANTIFICAÇÃO DE ANANDAMIDA	43
3.4. TRATAMENTOS UTILIZADOS	44
3.5. ANÁLISE DE SIMILARIDADE MOLECULAR	46
3.5.3. <i>Preparação de Ancoragem: Refinamento energético com AMBER</i>	49
3.5.4. <i>Ancoragem molecular</i>	50
3.5.5. <i>Estudo de Sobreposição</i>	52
3.6. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS	53
3.7. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	55
3.7.1. <i>Detecção de citocinas e quimiocinas</i>	55
3.7.2. <i>Quantificação dos parâmetros histopatológicos da reação inflamatória ocasionada pela GVHD</i>	56
3.7.3. <i>Análise do acúmulo de células T por Citometria de fluxo</i>	58
3.7.4. <i>Estratégia de Gate para análise de Citometria de Fluxo</i>	61
3.8. ROLAMENTO E ADESÃO	62
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>66</b>
4.1. A GVHD NÃO ALTERA OS NÍVEIS DE AEA ENDÓGENA	66

4.2.	MAFP AUMENTA SOBREVIDA DE ANIMAIS COM GVHD .....	66
4.3.	TRATAMENTO COM ANANDAMIDA EXÓGENA AUMENTA A SOBREVIDA DE ANIMAIS COM GVHD.....	68
4.4.	TRATAMENTO COM AEA NÃO INTERFERE NO PROCESSO DE ENXERTAMENTO .....	70
4.5.	AEA NÃO ALTERA O PERFIL LINFOCITÁRIO NO BAÇO .....	71
4.6.	ANANDAMIDA PROTEGE O INTESTINO .....	73
4.6.1.	<i>Análise histopatológica.....</i>	73
4.6.2.	<i>Análise de mediadores pró-inflamatórios.....</i>	74
4.6.3.	<i>Análise de perfil linfocitário .....</i>	75
4.6.1.	<i>Anandamida interfere na adesão das células nos vasos mesentéricos .....</i>	76
4.7.	EFEITOS DO TRATAMENTO COM AEA NO FÍGADO.....	80
4.8.	O AUMENTO DE SOBREVIDA EM CONSEQUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ANANDAMIDA É DEPENDENTE DE CB <sub>2</sub> E NÃO CB <sub>1</sub> 82	
4.9.	PEA APRESENTA POTENCIAL DE LIGAÇÃO AO RECEPTOR CB <sub>2</sub> .....	85
4.10.	PEA AUMENTA A SOBREVIDA E MELHORA PARÂMETROS CLÍNICOS DE ANIMAIS COM GVHD .....	90
4.11.	O PERFIL LINFOCITÁRIO NO BAÇO E ENXERTAMENTO APÓS TRATAMENTO COM PEA .....	91
4.12.	O TRATAMENTO COM PEA PROTEGE FÍGADO E INTESTINO .....	94
4.13.	PEA NÃO ALTERA O PERFIL LINFOCITÁRIO DO FÍGADO.....	95
4.14.	EFEITO DO TRATAMENTO COM PEA NO PERFIL LINFOCITÁRIO DO INTESTINO.....	97
4.15.	ANÁLISE DE ROLAMENTO E ADESÃO EM VASOS MESENTÉRICOS.....	98
4.16.	O EFEITO DO TRATAMENTO COM PEA EM CITOCINAS E QUIMIOCINAS .....	100
4.17.	O AUMENTO DE SOBREVIDA DECORRENTE DO TRATAMENTO COM PEA .....	102
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>107</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>119</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>121</b>
<b>8.</b>	<b>NOTA DE AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO: .....</b>	<b>140</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXO I – TRABALHOS PUBLICADOS RELACIONADOS AO TRABALHO .....</b>	<b>141</b>

# Introdução

## 1. Introdução

### 1.1. A doença do enxerto-contrá-hospedeiro ou Graft-versus-host disease (GVHD)

A medula óssea é onde se originam todas as células da linhagem hematopoiética (SZYSKA; NA, 2016). Desta forma, o transplante de medula óssea consiste em uma terapia curativa para uma série de doenças de origem hematopoiética, como leucemia, linfomas, talassemias, anemias (aplásica, falciforme e outras); doenças de ordem imunológica, como doenças autoimunes (lúpus); e também certos tipos de tumores malignos, sólidos e linfomas (CURTIS *et al.*, 1997; GALE, 1981; GLADSTONE *et al.*, 2017; HARTMANN *et al.*, 1997; LOCASCIULLI *et al.*, 2007; LUCARELLI *et al.*, 1990; MARMONT, 1994; WALTERS *et al.*, 1996).

Contudo, o sucesso desta terapia torna-se incerto em decorrência de uma doença secundária ao transplante conhecida como doença do enxerto-contrá-hospedeiro (DECH) ou Graft-versus-host disease (GVHD) (FERRARA *et al.*, 2009). A GVHD é uma doença sistêmica de rápida evolução, que ocorre devido a disparidades antigênicas entre doador e hospedeiro (organismo que recebe o transplante), caracterizando-se por exacerbada resposta inflamatória e lesão tecidual sistêmica, de forma que os principais órgãos-alvo são o intestino, a pele, o fígado e os pulmões (BEATTY *et al.*, 1995; FERRARA; YANIK, 2005; FERRARA *et al.*, 2009). A GVHD é também caracterizada por extenso dano tecidual e tempestade de citocinas (SHULMAN *et al.*, 2015). Em humanos, esta doença está, portanto, associada à significativa morbidade e mortalidade (BLAZAR *et al.*, 2012), sendo a principal causa de mortalidade não-relacionada à recidiva tumoral (MAJOR-MONFRIED *et al.*, 2018), gerando resistência médica em optar por esta terapia (BARTON-BURKE *et al.*, 2008).

Para que seja realizado o transplante de medula de um doador compatível geneticamente idêntico (transplante singênico) ou de um doador compatível

geneticamente distinto, aparentado ou não (transplante alogênico), é necessário que a medula residente sofra ablação, a este processo dá-se o nome de regime de condicionamento (LJUNGMAN *et al.*, 2006). Este processo pode ser realizado através de fármacos ou de radiação (MAPARA *et al.*, 2006). O regime de condicionamento é parte fundamental para que haja menor risco de rejeição ao transplante e para que ocorra a quimerização entre hospedeiro e a medula transplantada (GONZALEZ *et al.*, 2002). Durante o regime de condicionamento haverá dano tecidual no hospedeiro com liberação de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas. Há também aumento da expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (MCH) e moléculas co-estimulatórias de células apresentadoras de antígenos (APCs), gerando um ambiente favorável à GVHD (JAKSCH; MATTSSON, 2005).

A doença ocorre, portanto, pela ativação dos linfócitos T, sendo estes ativados por APCs que reconhecem disparidades entre as células do doador e hospedeiro, tanto aquelas remanescentes do hospedeiro quanto aquelas derivadas da medula transplantada (WYSOCKI *et al.*, 2005). Esta apresentação cruzada ocorre através de MHC-I no caso de linfócitos T CD8 e por MHC-II em células como os linfócitos T CD4 (SCHROEDER; DIPERSIO, 2011). Desta forma, a expansão de células T aloreativas citotóxicas efetoras, com tempestade de citocinas, e a decorrente migração destas células para os órgãos-alvo perpetuam a resposta inflamatória e caracterizam os estágios iniciais da GVHD (YANG *et al.*, 2017) (Figura 1).

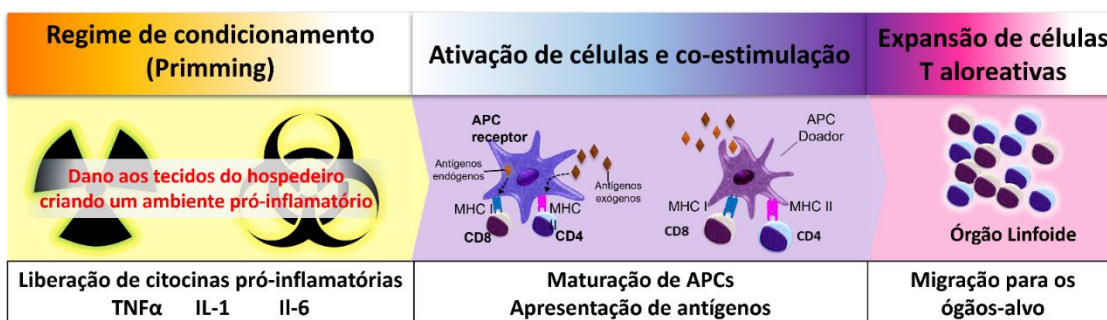


Figura 1 - A gênese da doença do enxerto-contra-hospedeiro. O dano aos diversos órgãos e tecidos do hospedeiro, incluindo os órgãos-alvo, durante o regime de condicionamento instaura um ambiente pró-inflamatório antes mesmo que ocorra o transplante de medula. Após o transplante estas células encontrarão um ambiente com células remanescentes já ativadas e haverá também apresentação cruzada de APCs do doador após maturação e APCs remanescentes do hospedeiro aos linfócitos CD4 e CD8, através de MHC II e I, respectivamente. Por fim, as células T aloreativas passarão por expansão clonal e migrarão para os tecidos e órgãos-alvo perpetuando a resposta inflamatória e causando danos. Baseado em SCHROEDER e DIPERSIO (2011).

## 1.2. Os órgãos-alvo da GVHD aguda

Em 2016 HARRIS *et al.* (2016) publicaram junto ao Consórcio Internacional para GVHD aguda Monte Sinai (MAGIC) uma padronização para caracterização da GVHD aguda em pacientes que receberam transplante de medula óssea. Estas diretrizes são consideradas como critério básico e internacional para o registro e definição da doença em humanos. Com base nestes critérios, GVHD aguda e crônica são diferenciadas principalmente pela sintomatologia e órgãos acometidos, sendo que na GVHD aguda sua gravidade é atribuída através da quantificação da intensidade de sintomas como a extensão do *rash* cutâneo, níveis de bilirrubina e volume de diarreia, permitindo a melhor avaliação do acometimento de pele, fígado e intestino; os principais órgãos-alvo da GVHD aguda (HARRIS *et al.*, 2016).

A pele é comumente relacionada à GVHD, entretanto diversas causas potenciais estão relacionadas ao aparecimento de rash cutâneo, caracterizado por eritema inflamatório, em pacientes com GVHD, como efeito adverso da medicação ou infecções oportunistas (FERRARA *et al.*, 2009). Desta forma, o grau de acometimento da pele será decidido pela presença de eritema generalizado, porcentagem de superfície corporal acometida, aparecimento de bolhas e descamação. A presença de todos estes fatores com acometimento maior que 5% da superfície corporal caracteriza o estágio 4 de acometimento da pele por GVHD (HARRIS *et al.*, 2016).

O fígado, por sua vez, é o menos frequente órgão-alvo envolvido na GVHD, entretanto, a detecção de alterações neste órgão está frequentemente

relacionada a um prognóstico desfavorável (LEVINE *et al.*, 2015; ROBIN *et al.*, 2009). O acometimento do fígado é determinado principalmente pelos níveis de bilirrubina, biópsia e níveis de transaminases. Entretanto, o aumento de bilirrubina pode ocorrer devido à toxicidade do regime de condicionamento e outros fatores, de forma que este fator só é determinante quando o acometimento de outros órgãos pela GVHD já foi comprovado (HARRIS *et al.*, 2016).

O envolvimento do trato gastrointestinal (TGI) pode ser dividido em acometimento da porção superior que corresponde ao esôfago, estômago e duodeno (24-60% dos pacientes) (MARTIN *et al.*, 2004) e a porção inferior que corresponde ao intestino grosso, apêndice, cólon, reto, ânus; sendo este o mais acometido pela GVHD aguda e mais frequentemente associado à mortalidade não-relacionada à reincidência tumoral. Os sintomas associados ao acometimento do TGI superior são anorexia, náusea, vômitos e dispepsia, mas suas causas podem ser relacionadas à mucosite, infecções oportunistas, toxicidade do regime de condicionamento e até mesmo efeito adverso de medicação (MACMILLAN *et al.*, 2015). O acometimento da porção inferior do TGI está, por sua vez, associada à diarreia, presença de hematoquezia e grave dor abdominal (PRZEPIORKA *et al.*, 1995). O acometimento do TGI leva a perda de peso que pode ser superior a 10%, já nos primeiros três meses após transplante e, nestes casos, é associada a um prognóstico negativo e aumento de mortalidade (FUJI *et al.*, 2015).

Por fim, YANG *et al.* (2017) encontraram uma incidência de 49.29% e 27.3%, para GVHD aguda e crônica, respectivamente em humanos adultos submetidos ao transplante alogênico. Mas em pacientes pediátricos a incidência de GVHD agudo pode variar de 40 à 80%. (FARACI *et al.*, 2012). E mesmo em transplantes singênicos a GVHD pode ocorrer em até 27% dos pacientes pediátricos e 18% dos pacientes adultos, sendo, entretanto, autolimitante, com prognóstico positivo e geralmente relacionada ao regime de condicionamento, sendo mediada por

linfócitos auto-reativos (ADAMS *et al.*, 2004; FARACI *et al.*, 2012; GATZA *et al.*, 2020; HERNANDEZ-NUNEZ *et al.*, 2003; LATIF *et al.*, 2003). É importante ressaltar, entretanto, que a incidência da GVHD depende de diversos fatores etiológicos, como o tipo de transplante realizado, compatibilidade entre o doador e o hospedeiro, regime de condicionamento, idade, medicação preventiva, doença prévia, dentre outros. Dentre os pacientes que desenvolvem GVHD, a taxa de mortalidade também é alta, chegando a 50% dos casos em adultos (Margaret Barton-burke *et al.*, 2008), mas podendo variar de 30% a 60% segundo RASHIDI *et al.* (2019), estando diretamente correlacionada ao grau de acometimento dos órgãos-alvo (PENACK *et al.*, 2020) (Figura 2).

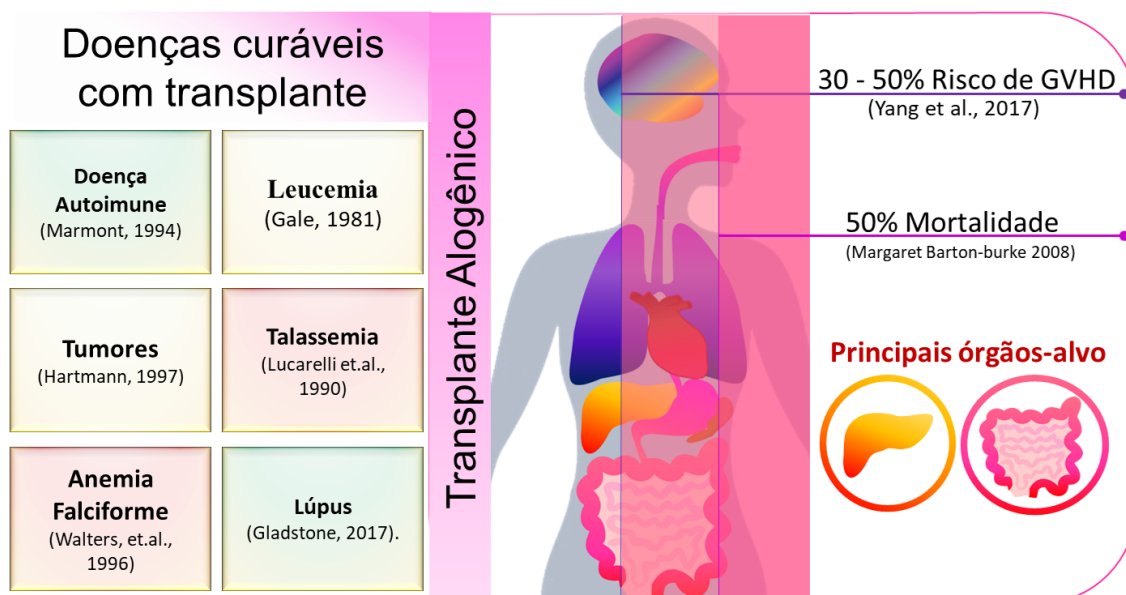


Figura 2. O potencial curativo do transplante de medula óssea. Diversas doenças de origem hematopoiética (vermelho), doenças malignas (azul) e doenças auto-íunes (amarelo). Ademais o transplante alôncico, apesar de apresentar um maior GVT/GVL leva à alto risco de GVHD com até 50% de mortalidade. Tendo como principais órgãos alvo, durante a GVHD aguda, o fígado e o intestino.

### 1.3. Profilaxia e tratamento contra a GVHD

A GVHD é, portanto, uma desordem imunológica que pode ocorrer mesmo quando há profilaxia agressiva com fármacos imunossupressores, dentre eles destacam-se os corticoides. Mesmo com constantes progressos na medicina o principal tratamento para esta doença permanece sendo o uso prolongado de imunossupressores e corticoides (JAMIL et al., 2015; DEVETTEN et al., 2004). Os corticoides são os fármacos usados na prevenção e na primeira linha de tratamento da DECH (JAMIL et al., 2015), pois eles apresentam um amplo efeito anti-inflamatório e imunossupressor (DEVETTEN et al., 2004). Entretanto, o tratamento pode causar inúmeros efeitos adversos, como degastes musculares, osteoporose e a Síndrome de Cushing (Poetker et al., 2010; Peppia et al., 2011). Além dos efeitos adversos e doenças secundárias que podem decorrer da imunossupressão a longo prazo os corticoides apresentam ainda mais uma complicação: os pacientes podem apresentar GVHD refratária a corticoides (DEVERGIE; JANIN, 2008). Além de seu uso como profilaxia pós-transplante, o uso de altas doses de corticoides é considerado o tratamento padrão inicial para a GVHD aguda (HILL *et al.*, 2018). Entretanto, a resposta ao tratamento não é uniforme e a taxa de sobrevida após dois anos de tratamento é de cerca de 55% (MACMILLAN *et al.*, 2020).

Além disso, cerca de 60% dos pacientes tratados com corticoides tornam-se, portanto, tolerantes ao tratamento e desenvolvem a GVHD refrataria a corticoides, apresentando uma taxa de sobrevida entre 30 a 40% (DEVERGIE; JANIN, 2008; XHAARD *et al.*, 2012). Imunossupressores também vêm sendo utilizados como profilaxia e durante o regime de condicionamento. Este é o caso do fármaco alemtuzumab, um anticorpo anti-CD32 (RESENDE *et al.*, 2017; TEIXEIRA *et al.*, 2015) e outros fármacos, como Sirolimus (SANDMAIER *et al.*, 2019), ciclosporina (ZEISER; BLAZAR, 2017) ou tacrolimus (GANETSKY *et al.*, 2016).

Novas terapias têm sido propostas, tanto como complementares ao uso de corticoides como até mesmo substitutivas, como o uso de CAR-T cells ou anticorpos monoclonais, como o Inolimomab (CD25). As CAR-T cells são células modificadas que passam a expressar antígenos quiméricos, permitindo que elas tenham como alvo receptores e tipos celulares específicos, no intuito de reduzir a resposta inflamatória (SANBER *et al.*, 2021). O principal viés desta terapia e também da terapia com anticorpos monoclonais é a toxicidade alta, com possível acometimento por síndrome de liberação de citocinas e síndromes neurológicas desencadeadas por células imune-efetoras (LEE *et al.*, 2019; SCHUSTER *et al.*, 2019). E, independentemente destes efeitos ainda há risco de GVHD e, neste caso, o uso de corticoides volta a ser a terapia padrão (ANWER *et al.*, 2017).

Apesar dos tratamentos profiláticos a alta incidência da GVHD evidencia a necessidade de desenvolver um tratamento que não somente reduza a taxa de mortalidade e os extensos danos teciduais em pacientes com GVHD, mas que não leve o paciente a um estado de imunossupressão. Uma maneira de realizar este *screening* inicial por novos fármacos é através de modelos experimentais que mimetizem a doença clínica em humanos.

#### **1.4. O modelo experimental**

A GVHD foi primeiramente descrita por Dirk van Bekkum em 1956, como uma doença secundária ao transplante de medula óssea, este médico e pesquisador foi também responsável por identificar variáveis e fatores de maior propensão à doença. Van Bekkum também estabeleceu o primeiro modelo animal para estudo da GVHD, utilizando-se de cães da raça Beagle (DICKE; VAN BEKKUM, 1973). Desde a década de 70 diversos modelos experimentais foram propostos, sendo que o primeiro modelo agudo foi realizado através do transplante alogênico de esplenócitos para camundongos previamente irradiados (WILL; WYNN, 2006).

Atualmente, diversos grupos estudam a GVHD aguda através do transplante alogênico de medula óssea e esplenócitos de animais C57BL/6j para camundongos BALB/c previamente irradiados (BERG *et al.*, 2021b; CASTOR *et al.*, 2010; CASTOR *et al.*, 2011; CASTOR *et al.*, 2012; REZENDE *et al.*, 2013). A irradiação previa permite a ablação da medula residente para que possa haver enxertamento da medula transplantada. O transplante de esplenócitos em associação com as células derivadas da medula óssea irão garantir que o animal venha a desenvolver GVHD.

### **1.5. O sistema canabinóide**

Atualmente, as principais terapias farmacológicas disponíveis para o tratamento da GVHD falham em gerar equilíbrio imunológico, levando o paciente a um estado de imunossupressão. Neste contexto, terapias baseadas em moléculas com conhecido efeito imunomodulatório, como os canabinóides, tornam-se interessantes alvos terapêuticos.

A sinalização via sistema canabinóide regula a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, de forma que a resposta deve variar de acordo com os alvos moleculares e o contexto (GALVE-ROPERH *et al.*, 2013). É especialmente interessante investigar se agonistas deste sistema teriam efeito imunomodulador com resultados positivos, principalmente na sobrevivência, na GVHD.

O sistema endocanabinóide é composto, portanto, de receptores canabinóides do tipo 1 e 2 (CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, respectivamente), agonistas endógenos também conhecidos como endocanabinóides e enzimas responsáveis pela hidrólise, recaptção e metabolismo dos endocanabinóides. Ademais, moléculas exógenas podem interagir com este sistema, como fitocanabinóides e canabinóides sintéticos, que incluem agonistas e antagonistas dos receptores canabinóides. (GUZMAN, 2003; MECHOULAM; HANUS, 2002; MENDIZÁBAL; ADLER-GRASCHINSKY, 2003; PERTWEE; ROSS, 2002)

O primeiro canabinóide a ser investigado, em modelo experimental de GVHD em camundongos, foi o  $\Delta^9$ -THC (PANDEY *et al.*, 2011). Neste estudo os autores relatam que o tratamento com este fármaco reduziu os danos no fígado e intestino dos animais, reduziu o número de linfócitos T e promoveu células T regulatórias. De forma muito interessante neste estudo os efeitos do  $\Delta^9$ -THC se mostraram parcialmente dependentes do receptor CB<sub>1</sub> e de CB<sub>2</sub>, mas os efeitos foram completamente abolidos quando foi realizada a inibição simultânea dos dois receptores.

O segundo canabinóide a ser estudado na GVHD foi o Canabidiol (CBD), dentre os diversos estudos, YESHURUN *et al.* (2015) se destacam por terem desenvolvido um estudo clínico, chegando à fase 2 em que os pacientes foram tratados com CBD de forma complementar, havendo redução dos sinais clínicos e prevenção da perda de peso. Em trabalho anterior nosso grupo demonstrou em modelo murino de GVHD aguda que os mecanismos de ação de CBD estão associados ao receptor CB<sub>2</sub> e não CB<sub>1</sub>, de forma que este fármaco levou também ao aumento de células T regulatórias (BERG *et al.*, 2021a).

O Canabidiol é uma molécula exógena, (fitocanabinoide) capaz de interagir com o sistema endocanabinóide através de receptores canabinóides, inibindo a FAAH e promovendo o aumento de Anandamida endógena (MECHOULAM; HANUS, 2002). Desta forma, torna-se interessante a investigação de endocanabinóides e seu papel na fisiopatologia da GVHD, já que estas moléculas endógenas são diferentemente seletivas para receptores CB<sub>1</sub> (presente majoritariamente em tecido nervoso) e CB<sub>2</sub> (periferia e células imunes) (ALBERICH JORDA *et al.*, 2004; IZZO *et al.*, 2001; ROBINSON *et al.*, 2015) (Figura 3). O receptor CB<sub>2</sub> está amplamente expresso no sistema imunológico, principalmente em linfócitos B e T, células NK, monócitos e neutrófilos, de forma que agonistas canabinóides podem modular a liberação de citocinas e a migração destas células (JIANG *et al.*, 2011).

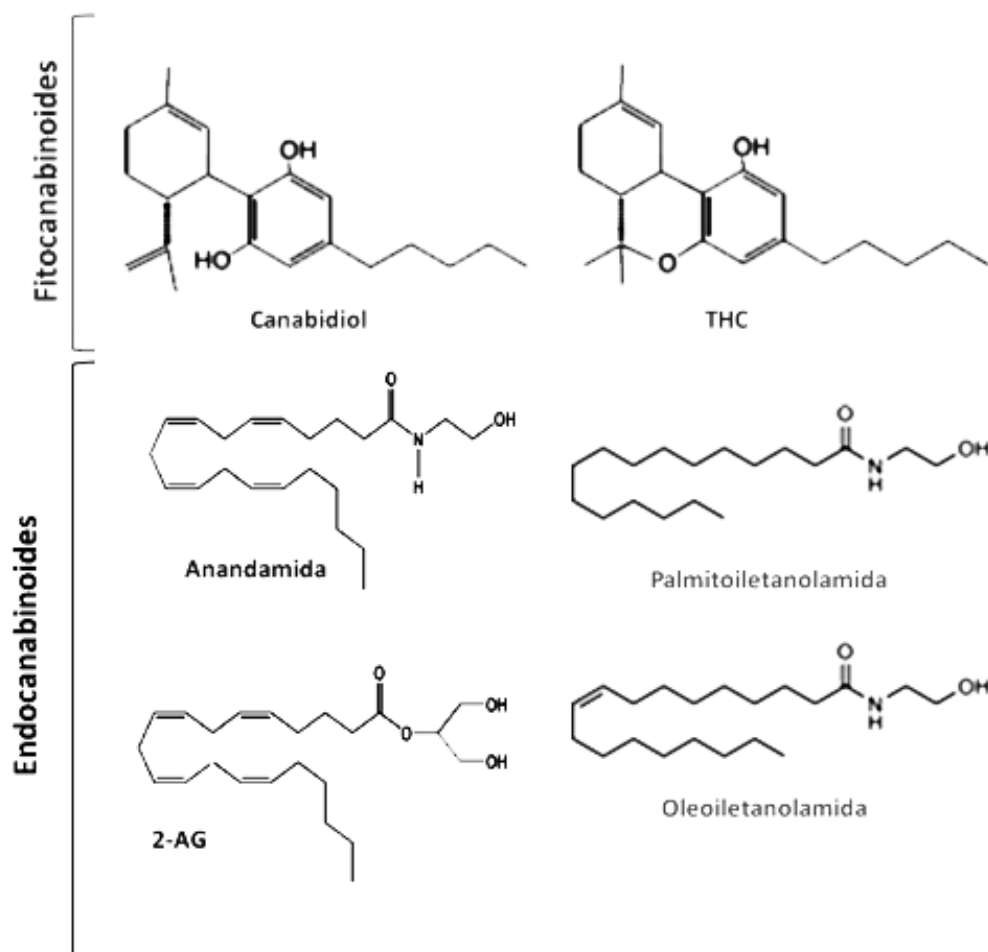


Figura 3. Formulas químicas dos principais canabinoides com potencial anti-inflamatório. As estruturas bidimensionais encontram-se simplificadas e não são a única conformação possível para estas moléculas. Na porção superior da figura encontram-se dois fitocannabinoides derivados da *Cannabis sativa*, o Canabidiol (CBD -  $C_{21}H_{30}O_2$ ) e o Tetrahydrocannabinol (THC -  $C_{21}H_{30}O_2$ ). Na porção inferior da figura encontram-se quatro dos endocannabinoides mais conhecidos e estudados, a Anandamida (AEA -  $C_{22}H_{37}NO_2$ ), o Palmitoiletanolamida (PEA -  $C_{18}H_{37}NO_2$ ), o 2-araquidonilglicerol (2-AG -  $C_{23}H_{38}O_4$ ) e a Oleoiletanolamida (OEA -  $C_{20}H_{39}NO_2$ ). Adaptado de BURSTEIN e ZURIER (2009) e GUZMAN (2003).

O primeiro endocanabinóide a ser isolado, em 1992, foi a Anandamida (AEA), sendo o primeiro ligante endógeno dos receptores canabinóides a ser identificado. Sua descoberta reacendeu a busca por outros ligantes endógenos deste sistema, que posteriormente passaram a incluir as N-acetiletanolaminas (NAEs), grupo que inclui AEA e outras moléculas como a Palmitoiletanolamina (PEA), uma versão mais curta e saturada, análoga à AEA (Figura 4); além de

outros endocanabinóides como a Oleoetanolamina (OEA), Stearoylethanolamide (SEA) e inúmeros outros (LAMBERT et al., 2002). As NAEs são encontradas em quase todos os tecidos de mamíferos e são normalmente produzidas sob demanda, podendo se acumular durante processos inflamatórios, de forma que seus efeitos anti-inflamatórios e imunomodulatórios já foram descritos em inúmeras patologias humanas e modelos experimentais (LAMBERT et al., 2002), como a colite (HARVEY *et al.*, 2014) e dor inflamatória (GUINDON *et al.*, 2006).

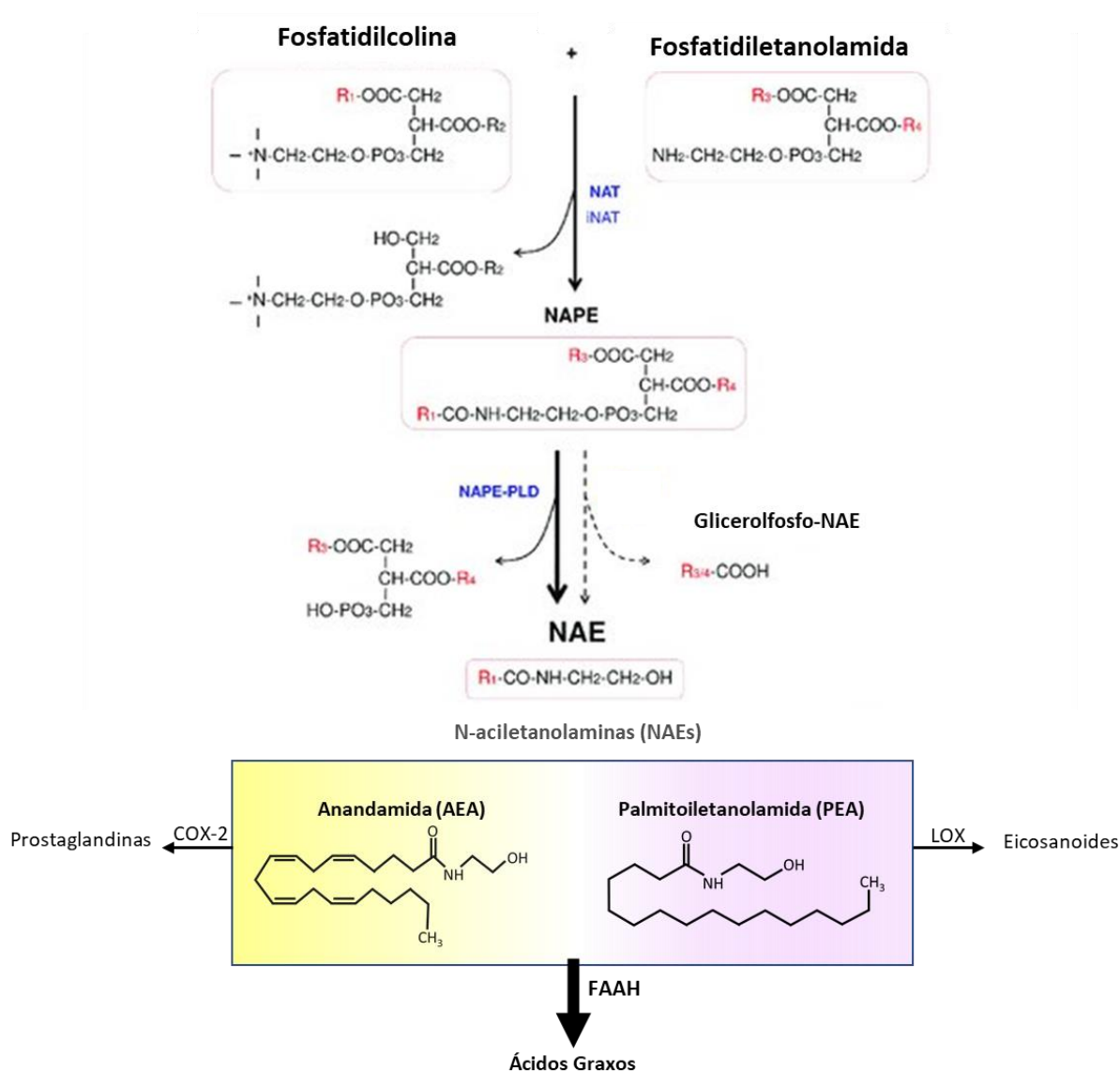


Figura 4. Síntese e degradação de AEA e PEA. Aqui ilustram-se simplificações das principais vias de síntese e degradação comuns à AEA e PEA. Abreviaturas utilizadas: NAT – N-acetiltransferase dependente de cálcio; iNAT - N-acetiltransferase independente de cálcio; NAPE – N-acylfosfatidiletanolamina; NAPE-PLZ – fosfolipase hidrolizadora de NAPE; GDE – glicerolfosfodisterase; NAE – N-aciletanolamida, OEA – Oleoiletanolamida; COX-2 – ciclo-oxigenase 2.

Desta forma, tornam-se interessante a investigação de endocanabinóides e seu papel na fisiopatologia da GVHD, já que estas moléculas endógenas são diferentemente seletivas para receptores CB<sub>1</sub> (presente majoritariamente em tecido nervoso) e CB<sub>2</sub> (periferia e células imunes) (ALBERICH JORDA *et al.*, 2004; IZZO *et al.*, 2001; ROBINSON *et al.*, 2015) (Figura 5).

Portanto, a hipótese deste projeto é que o tratamento com endocanabinóides possa modular a migração de leucócitos para os tecidos alvo da doença, bem como a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, controlando a amplificação da resposta inflamatória, evolução da doença e mortalidade. Para tanto, decidimos investigar dois endocanabinóides que apresentam conhecida capacidade de se ligar à receptores CB<sub>2</sub>, Anandamida (AEA) (ROSS *et al.*, 2001) e Palmitoilethanolamida (PEA) (LAMBERT *et al.*, 2002).

## Receptores Canabinóides

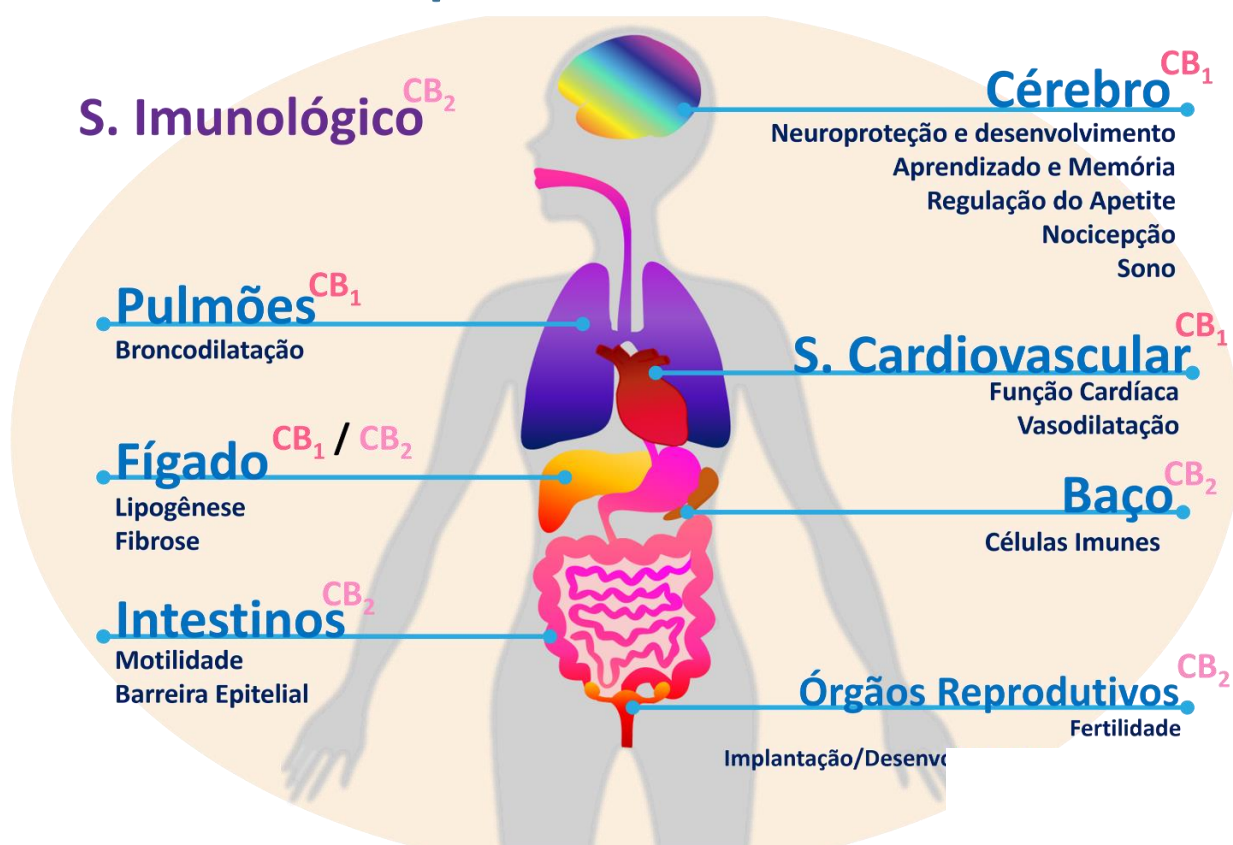


Figura 5. Localização dos Receptores Canabinóides. Distribuição clássica dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> pelo corpo humano. É importante salientar que esta distribuição encontra-se simplificada e indica o predomínio de expressão de um receptor ou outro no sistema ou órgão investigado. Adaptado de (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2018)

## **OBJETIVOS**

### **2. Objetivo Geral**

Avaliar o efeito do tratamento com fármacos pertencentes ao grupo de endocanabinoides conhecido como N-acetiletanolaminas no controle da resposta inflamatória em camundongos submetidos à doença do enxerto-contrahospedeiro.

#### **2.1. Objetivos Específicos**

2.1.1. Avaliar se a doença leva à alteração dos níveis de Anandamida endógena.

2.1.2. Avaliar o efeito do tratamento com MAFP, um inibidor irreversível amida hidrolase de ácido graxo (FAAH), na sobrevida e aspectos clínicos dos animais

2.1.3. Avaliar a similaridade estrutural entre AEA e PEA através de ancoragem molecular

2.1.4. Avaliar o efeito do tratamento de AEA e PEA na:

- sobrevida e evolução da doença;
- sobre o enxertamento nos órgãos linfoides;
- resposta inflamatória e recrutamento de linfócitos para os órgãos-alvo;
- alteração de níveis das citocinas e quimiocinas envolvidas na GVHD aguda.

2.1.5. Avaliar a participação dos receptores canabinóides clássicos nos efeitos ocasionados por estes fármacos através do uso de antagonistas específicos dos receptores CB<sub>1</sub> (AM251) e CB<sub>2</sub> (AM630).

The image features a minimalist design with a white background. A large, light gray, semi-transparent geometric shape, resembling a stylized mountain or a large 'L' shape, is positioned on the left side. A white rectangular box is placed on the right side of this gray shape, containing the word 'Metodologia' in a bold, black, sans-serif font.

# **Metodologia**

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Animais**

Camundongos com oito a doze semanas de vida, isogênicos das linhagens C57BL/6J, C57BL/6-GFP<sup>+</sup> e BALB/C, machos, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO) e do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ-MG). Os animais foram acondicionados em estante ventilada (Alesco® ES2), ambiente com temperatura controlada (23°C ± 2°C), acesso livre à água e ração e ciclo claro-escuro de doze horas (7am-7pm).

Os procedimentos experimentais retratados neste trabalho foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG), estas permissões podem ser encontradas através dos protocolos 337/2014 e 203/2021. É importante esclarecer que este trabalho é parte de um projeto maior que correlaciona fitocanabinóides e endocanabinóides, sendo apresentado ao CEUA como um grande projeto e iniciado em 2014, entretanto os resultados que aqui seguem representam nossa investigação acerca de endocanabinóides, sendo continuidade de meu trabalho de mestrado e, portanto, foi necessária extensão do protocolo CEUA.

#### **3.2. Indução da doença do enxerto-versus-hospedeiro**

Os camundongos BALB/C de 8 a 12 semanas receberam duas doses de 3,5Gy de radiação gama, fonte de Cobalto60, para ablação total de seu sistema imune. A seguir, estes animais receberam  $3 \times 10^7$  esplenócitos e  $1 \times 10^7$  células de medula óssea, de animais C57BL/6j ou BALB/C, através de injeção i.v. (CALCATERRA *et al.*, 2008; CASTOR *et al.*, 2012).

Os animais doadores (C57BL/6j ou BALB/C) foram anestesiados através de injeção i.p. de 100 mg/Kg de cetamina junto à 10 mg/kg de xilazina em salina, sendo então eutanasiados por deslocamento cervical e embebidos em Álcool 70% antes de serem levados à câmara de Fluxo laminar onde foi realizada a

extração de baço e medula. Para obtenção dos esplenócitos, o baço de camundongos doadores foi coletado através de incisão na porção lateral do abdome do animal doador. Os baços foram então imediatamente colocados em meio RPMI-1640 Cultilab® gelado. Em seguida os baços foram macerados e filtrados por Cell Strainer de Falcon® de nylon (70µm) [QTY 1 – Ref 352350] e transferidos para um falcoon (Figura 6 -A).

As medulas foram obtidas a partir de fêmur e tíbia de animais doadores e coletadas com auxílio de uma seringa contendo RPMI 1640 e acoplada a uma agulha de 22 Gauge. A agulha foi inserida em um dos lados do osso e a medula foi extraída através da pressão ocasionada pela injeção do meio RPMI 1640 (Figura 6 - B).

Tanto as amostras de baço quanto medula foram centrifugadas à 1200 rpm por 5 minutos a 4<sup>o</sup>.C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet remanescente foi ressuscitado em 10mL de meio RPMI-1640. Destes 10ml, 10µL foram retirados e ressuscitados em 900µL de RPMI-1640 e desta solução foram pipetados 50µL que foram homogeneizados com 50µL de azul de Tripán. Após esta diluição, as células foram contadas em câmara de Neubauer. Esta contagem foi realizada a fim de verificar a viabilidade celular e ajustar o número de células viáveis a ser injetadas no animal hospedeiro.

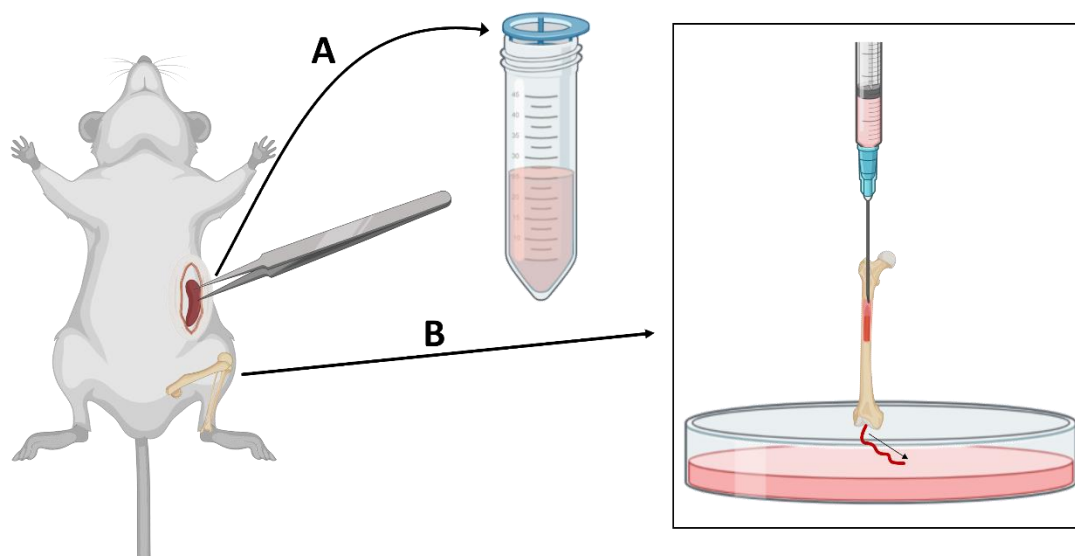


Figura 6. Obtenção de Esplenócitos e medula de camundongos doadores. Após a eutanásia de doadores C57BL/6j ou BALB/c os baços foram coletados por incisão lateral, porquanto as medulas foram obtidas do fêmur e tíbia destes animais. (A) o baço foi removido, macerado e filtrado em CellStrainer de 70  $\mu$ m sendo mantido em RPMI1640. (B) A medula foi obtida de fêmur ou tíbia através da inserção de uma agulha de 22G acoplada a uma seringa de 3mL contendo RPMI1640, permitindo a expulsão da medula diretamente para uma placa de petri contendo também meio de cultura. Imagem elaborada com auxílio do software Biorender.

Nosso grupo controle foi formado por animais BALB/C que receberam transplante singênico contendo o mesmo número de esplenócitos e células de medula-óssea de outros animais BALB/C (Figura 7 - A), não apresentando reação do enxerto-contra-hospedeiro. Desta forma, os animais que receberam transplante alogênico, de animais C57BL/6j, desenvolveram GVHD (CASTOR *et al.*, 2010; CASTOR *et al.*, 2011; EL-HAYEK *et al.*, 2005) (Figura 7 - B). Para evitar infecções oportunistas enquanto ocorre o processo de enxertamento da medula transplantada, os animais receberam ciprofloxacino (70mg/L), no dia do transplante, sendo mantido durante os primeiros 7 dias após o transplante (BOCHER *et al.*, 1999). Os tratamentos foram sempre iniciados com uma hora de antecedência ao início do regime de condicionamento, no caso do tratamento com antagonistas, este foi iniciado duas horas antes, para que o tratamento com o fármaco de interesse se desse no prazo acima citado.

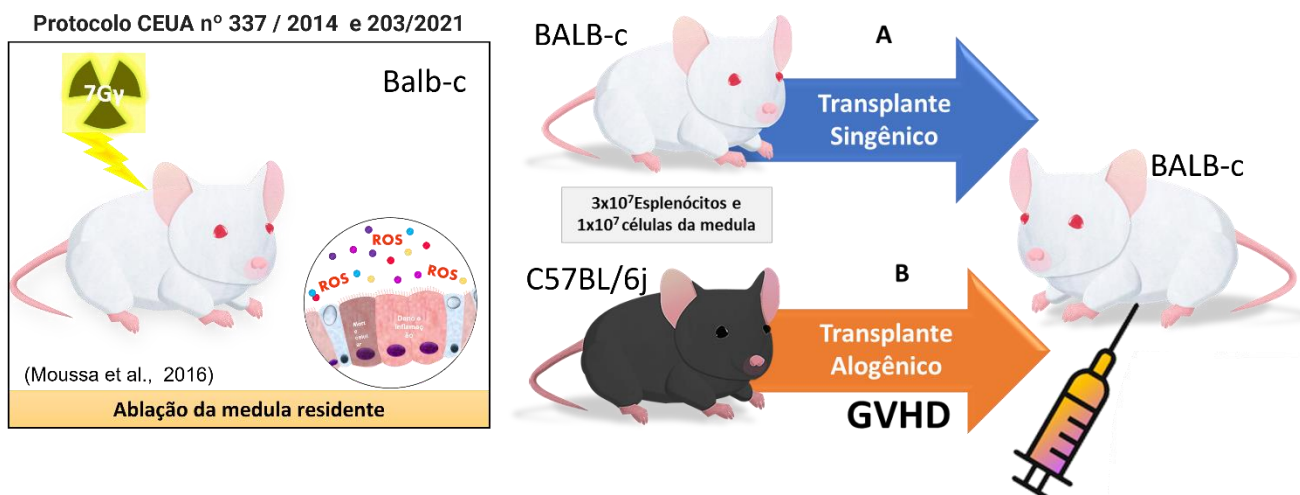


Figura 7. Modelo experimental. Animais BALB/c passaram por ablação total de sua medula residente através de duas doses de 3,5Gy. Em seguida estes animais receberam transplante de  $3 \times 10^7$  esplenócitos e  $1 \times 10^7$  células de medula óssea de (A) doadores singênicos BALB/c ou (B) alogênicos C57BL/6j, de forma que este segundo grupo foi dividido em animais que receberam veículo ou o fármaco de interesse.

### 3.3. Quantificação de Anandamida

Ao sétimo dia após o transplante, animais que receberam transplante singênico ou alogênico, não tratados, foram eutanasiados por deslocamento cervical e seu sangue, fígado e intestino foram coletados. O fígado foi imediatamente alocado em um eppendorf e congelado em nitrogênio líquido, porquanto o sangue foi rapidamente centrifugado a 1200 RPM por 10 minutos a 4°C, sendo a fração de soro coletada e imediatamente congelada em nitrogênio líquido. O intestino foi rapidamente cortado em uma placa gelada, sendo a porção do jejuno-íleo isolada e lavada internamente com PBS-1x a 4°C para remoção do conteúdo intestinal, sendo em seguida alocado em um eppendorf e congelado em nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas em freezer - 80°C até análise.

Para a quantificação, 100mg de fígado e jejuno-íleo ou 100µl de soro, foram homogeneizados com 1,0ml de metanol gelado através de um homogeneizador (Bead Ruptor - Omini international Inc, Georgia, USA) a 30Hz/10 minutos. Em

seguida a quantidade de proteína nas amostras foi quantificada através de ensaio de Bradford (Biorad, Munique, Alemanha), e a extração se deu através do método de BLIGH e DYER (1959). Desta forma, 500 µl deste homogenato em metanol recebeu 10 µl da solução de padrão interno, em uma concentração de 500 ng/ml<sup>-1</sup>, sendo homogeneizada por 30 minutos a 30Hz, com adição de água e clorofórmio. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2000xG por 10 minutos a 4°C e a porção inferior equivalente à fase orgânica foi coletada. À porção superior remanescente foram adicionados 450 µl de clorofórmio e os passos anteriores foram repetidos para nova extração, após centrifugação a fase orgânica foi novamente coletada e acrescida à amostra anterior. As amostras foram então colocadas em uma centrífuga à vácuo por uma hora a temperatura ambiente para secagem. As amostras secas foram ressuspensas em 50µl de MeOH/H<sub>2</sub>O (7:3 v/v) e esta solução foi injetada em Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS).

Para a quantificação, as amostras foram comparadas a 10pmol do controle interno de Anandamida (AEA-d8), sendo realizadas no sistema de *Ultra-Hight-Performance Liquid Chromatography* (UHPLC) (Nexera X2, Shimadzu-Kyoto, HO, Japan), acoplado a um espectrofotômetro de massa (TripleTOF 5600+; Sciex-Foster, CA, USA). Para a separação cromatográfica foi utilizada uma coluna Ascentis de 15cm x 2.1mm x 2,7µm. As fases móveis foram compostas de água e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico. A análise de Monitoramento de Reações Múltiplas em alta resolução foi utilizada uma vez que o espectrofotômetro foi operado de maneira positiva. Os resultados estão expressos em picogramas de proteína por miligrama de tecido

### **3.4. Tratamentos utilizados**

Em todos os experimentos realizados os animais foram divididos em: grupo singênico (BALB/c → BALB/c), que não recebeu tratamento; grupo veículo, composto de animais que receberam transplante alogênico (C57BL/6j → BALB/c) e foram tratados com o diluente do fármaco a ser avaliado; e, por fim,

grupo tratado, que recebeu o fármaco a ser avaliado diariamente, do dia da indução da GVHD até o término do experimento. Todos os tratamentos foram realizados por injeção i.p. Neste estudo os fármacos utilizados foram:

- **Anandamida (AEA):** N-(2-Hidroxiethyl)-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenamida.

Doses avaliadas: 2,5 mg/kg, 5 mg/kg e 10mg/kg.

Veículo: 1,25% etanol + 1,25% TocrisSolve em PBS1x.

Marca: Cayman Chemical Company, Michigan, USA

- **Palmitoiletanolamida (PEA):** N-(2-Hidroxiethyl) hexadecanamida

Dose: 1 mg/kg, 5 mg/kg e 10mg/kg.

Veículo: 1,25% de etanol + 1,25% de DMSO em PBS1x

Marca: Tocris®, Sellex, Sao Paulo, SP, Brasil

- **MAFP:** ácido fosfonofluorídico

Dose: 1mg/kg

Veículo: 2,5% de Acetato de metila em PBS1x

Marca: Tocris®, Sellex, São Paulo, SP, Brasil

- **Antagonista CB<sub>1</sub> (AM251):** N-(Piperidino-1-il)-5-(4-iodofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazole-3-carboxamida

Dose: 1mg/kg

Veículo 2,5% DMSO em PBS1x

Marca: Tocris®, Sellex, São Paulo, SP, Brasil

- **Antagonista CB<sub>2</sub> (AM630):** 6-Iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil)ethyl]-1H-indol-3-il](4-metoxifenil)metanona

Dose: 1mg/kg

Veículo 5% ethanol + 5% Tween80 (Sigma) em PBS1x

Marca: Tocris®, Sellex, São Paulo, SP, Brasil

• **Agonista CB<sub>2</sub> (JWH133):** 6-Iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1H-indol-3-il](4-metoxifenil)metanona

Doses: 2,5 mg/kg, 5 mg/kg e 10mg/kg.

Veículo 2,5% DMSO em PBS1x

Marca: Tocris®, Sellex, São Paulo, SP, Brasil

### 3.5. Análise de Similaridade molecular

Como descrito anteriormente por LAMBERT *et al.* (2002), o PEA é uma molécula mais curta e saturada muito similar a AEA. Desta forma, optamos por avaliar se estas alterações de saturação na cadeia carbônica fariam deste análogo uma alternativa potencial no tratamento da GVHD, através de interação com o receptor CB<sub>2</sub>. Sendo assim, realizamos ensaios de ancoragem molecular e similaridade por sobreposição para definir se existe de fato analogia entre estas moléculas e se o PEA seria capaz de se ligar em receptores canabinóides, principalmente CB<sub>2</sub>, uma vez que este se mostrou importante no controle da resposta inflamatória da GVHD em trabalhos anteriores (BERG *et al.*, 2021b), desempenhando importante atividade imunomoduladora e sendo um dos principais alvos da AEA (HRYHOROWICZ *et al.*, 2021).

#### 3.5.1. Origem e detalhes dos datasets e modelos fonte

Para esta investigação, AEA e PEA foram obtidos em suas entradas moleculares lineares simplificadas (simplified molecular-input line-entry system - SMILES). Seus respectivos SMILES foram adquiridos através da plataforma PubChem, sendo que para AEA foi utilizado o SMILES isomérico devido ao seu esteroisomerismo promovido pela cadeia alcênica, ou seja, sua natureza insaturada. O SMILES CCCCC/C=C\C/C=C\C/C=C\C/C=C\C\CCCC(=O)NCCO referente AEA pode ser encontrado sob o CID 5281969 (Figura 8 – A). Em relação ao PEA, foi utilizado o SMILES canônico CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)NCCO, encontrado sob o CID 4671 (Figura 8 – B). Em ambos casos, os dados foram computados pelo OEChem2.3.0, onde



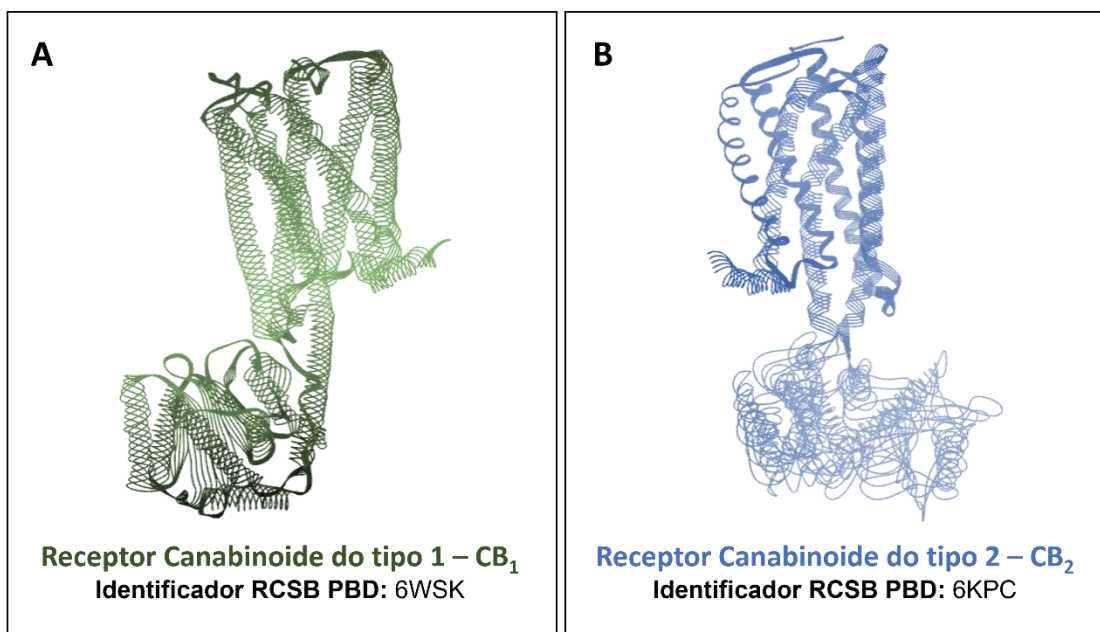


Figura 9. Estruturas cristalográficas dos receptores canabinoides. Representação simplificada das estruturas dos receptores canabinoides (A) CB<sub>1</sub> e (B) CB<sub>2</sub>, obtidos através de cristalografia por difração de raios-x. As imagens foram geradas com auxílio do software BioVia Discovery Studio 2020 e a identificação de ambas as estruturas no Protein Data Bank encontram-se abaixo da identificação das estruturas.

### 3.5.2. Análise *in silico*

O fluxo de trabalho para esta análise envolveu três passos principais: preparação de ancoragem, ancoragem molecular e estudo de sobreposição. Na preparação de ancoragem, as energias estéricas dos ligantes foram minimizadas para obtenção do conformero mais estável. Após este refinamento energético, as ligações saturadas ou ligações simples entre os átomos foram definidas como rotacionáveis, uma vez que existe um grau intrínseco de liberdade de movimento mediante a interpenetração coaxial de orbitais (ligações covalentes  $\sigma - \sigma$ ). Por outro lado, ligações insaturadas, envolvendo elétrons  $\pi$ , foram definidas como não passíveis de rotação. Adicionalmente, as cargas foram atribuídas quando necessário, de acordo com os algoritmos selecionados e descritos a seguir. Moléculas de água foram excluídas desta análise, de forma que todas as simulações aqui descritas foram definidas como acontecendo no vácuo,

tratando-se de modelos de natureza preditiva. O objetivo deste passo foi padronizar as condições para o ancoragem molecular, conforme descrito por HE *et al.* (2020).

O segundo passo desta investigação envolveu a ancoragem molecular, para o qual utilizamos o script AutoDock Vina e suas funções de classificação nativas (TROTT; OLSON, 2010). A região de ancoragem utilizou as mesmas coordenadas e tamanho previamente descritos, obtidos através do posicionamento do agonista seletivo no modelo cristalográfico. A exaustividade da análise foi definida como o máximo permitido pelo programa e os dez modelos de melhor classificação foram escolhidos para maior escrutínio. Desta forma, investigamos as possíveis conformações dos ligantes dentro do sítio de ligação do receptor CB2, elucidando possíveis modelos de ligação (SALMASO; MORO, 2018).

O terceiro e último passo desta investigação foi o ensaio de sobreposição, onde as formas de melhor classificação do AEA e PEA foram comparadas no software BioVia Discovery Studio 2020. Avaliamos a influência da contribuição estérica (atribuída às ligações covalentes) e eletrostática (conferida pelas cargas) nas moléculas sobrepostas. O principal objetivo desta análise foi verificar a similaridade conformacional entre AEA e PEA após o refinamento de ancoragem.

### **3.5.3. Preparação de Ancoragem: Refinamento energético com AMBER**

Neste trabalho utilizamos o Assisted Model Building with Energy Refinement (AMBER) como algoritmo de minimização energética dos campos de força moleculares (CASE *et al.*, 2005). Os parâmetros para a implementação do AMBER foram: 100 iterações decrescentes de 0.02 Å, e 10 gradientes conjugados de 0.02 Å. O intervalo de atualização utilizado foi de 10 iterações, sendo que nenhum átomo foi fixado. O método de atribuição de cargas utilizado foi baseado em Gasteiger por meio da ferramenta ANTECHAMBER e do campo

de força ff14SB. Apesar do AMBER ter sido inicialmente proposto para avaliação de macromoléculas extremamente complexas, ele pode ser utilizado também para a minimização de pequenas moléculas para estudos de ancoragem molecular.

Em essência, o AMBER é um método de minimização energética que leva em conta o somatório de todas as forças que atuam sobre o sistema, para estimar sua energia potencial (THOMAZ *et al.*, 2022). A fórmula matemática utilizada para o refinamento energético no AMBER é apresentada na Figura 10.

$$V(r^n) = \sum_{i \in \text{bonds}} k_{bi} (l_i - l_i^0)^2 + \sum_{i \in \text{angles}} k_{ai} (\theta_i - \theta_i^0)^2 + \sum_{i \in \text{torsions}} \sum_n \frac{1}{2} V_i^n [1 + \cos(n\omega_i - \gamma_i)] + \sum_{j=1}^{N-1} \sum_{i=j+1}^N f_{ij} \left\{ \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{r_{ij}^0}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{r_{ij}^0}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right\}$$

Figura 10. Cálculo de AMBER. A fórmula acima é uma simplificação da fórmula matemática utilizada para o refinamento energético através do AMBER. Os parâmetros base para este cálculo são as ligações entre átomos, os ângulos formados pela ligação de uma trinca de átomos, as possíveis torções entre estas ligações e a força de Van der Waals e força eletrostática.

O refinamento de energia é realizado através da derivada da energia potencial total do sistema em relação à posição de cada átomo constituinte. Sendo assim, as forças atuantes em cada elemento são somadas para se obter o valor de energia potencial total do sistema. Nesse sentido, o somatório da energia das ligações e diedros é próxima daquela definida pela força harmônica, de acordo com a lei de Hooke, sendo  $k_{bi}$  a constante elástica entre as ligações e  $k_{ai}$  a constante entre os ângulos; torções são calculadas por séries de Fourier (avaliando frequência através da soma  $n$ -definida de componentes senoidais); e a energia entre pares de átomos é calculada pelas energias de Van der Waals e eletrostática, considerando o equilíbrio de distância ( $r_{ij}^0$ ) e profundidade ( $\epsilon$ ).

#### 3.5.4. Ancoragem molecular

O ensaio de ancoragem do AEA e PEA foi realizado através de uma abordagem rígida/flexível da macromolécula e ligante, respectivamente. Desta forma, a interação com a macromolécula, ou seja, o receptor foi a resultante pós-tratamento da estrutura do receptor CB<sub>2</sub> humano (PDB: 6KPC), enquanto os ligantes foram AEA e PEA. A ancoragem foi realizado através do plugin AutoDock Vina, usando suas funções de classificação nativas. O software UCSF Chimera 1.15rc foi utilizado para as preparações de ancoragem e o software Biovia Discovery Studio 2020 foi utilizado para visualização dos dados, bem como para renderizar os mapas de interação 2D e os modelos 3D (Figura 11).

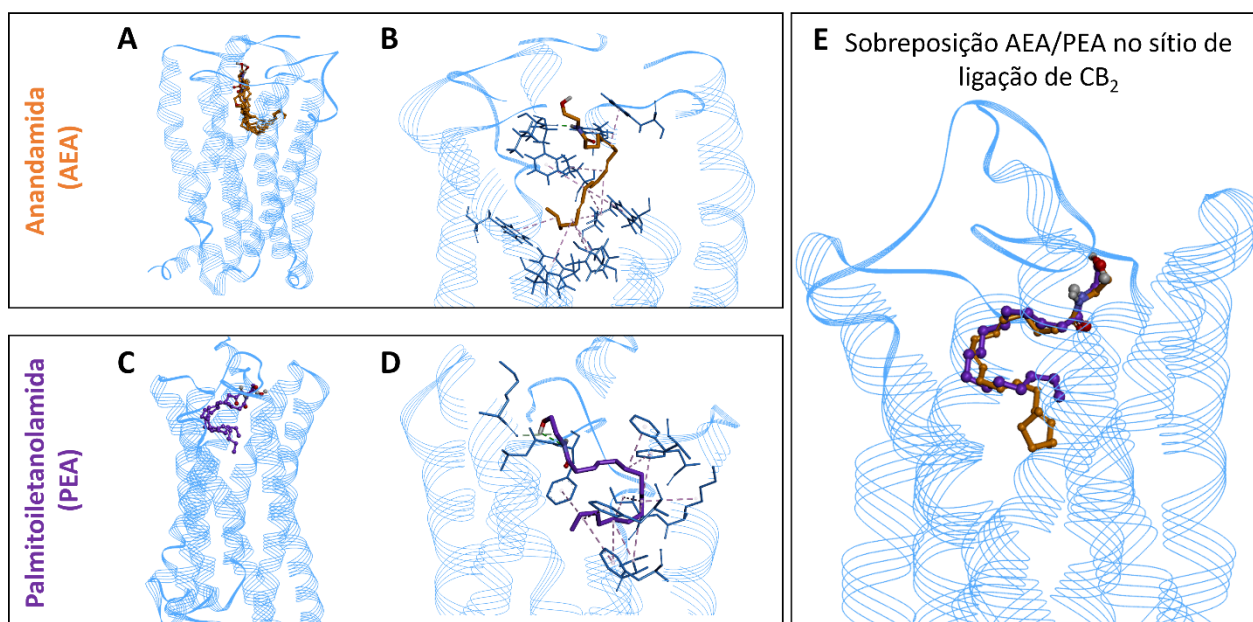


Figura 11 . Ancoragem Molecular. Através das coordenadas obtidas pelo controle positivo de agonista CB<sub>2</sub> foi possível avaliar a capacidade de ligação e as interações ocasionadas por esta ligação tanto para (A) AEA, demonstrada primeiramente à distância e depois em detalhe (B); quanto para PEA, também à distância (C) e em detalhe (D). (E) Sobreposição das moléculas com suas respectivas formas de maior classificação. É importante ressaltar que o receptor não é apresentado por completo, uma vez que o foco aqui é demonstrar seu sítio ortostérico. Imagens obtidas com software BioVia Discovery Studio 2020.

Desta forma, o ensaio envolveu a deleção de moléculas de solvente e adição automática de cargas de hidrogênio de acordo com o tipo de ligação seguindo o método de Gasteiger (PETTERSEN *et al.*, 2004). Ademais, o volume do sítio de

ligação para ancoragem foi de 4151.17 Å<sup>3</sup> nas coordenadas já mencionadas, definidas pelo modelo de difração de raios-x de 6KPC.

A exaustividade de ancoragem foi estipulada para 8.0 e o máximo de diferença de energia de 3 kcal mol<sup>-1</sup>, permitindo a análise da interação dos 10 modelos de maior classificação de ancoragem. A análise de interações eletrostáticas leva em conta a distância entre os átomos e sua afinidade eletrônica para atribuir um tipo específico.

### 3.5.5. Estudo de Sobreposição

O estudo de sobreposição molecular foi realizado com as conformações de maior classificação obtidas do AEA e PEA após o ensaio de ancoragem, utilizando o software BioVia Discovery Studio 2020. As duas principais variáveis para esta análise foram as contribuições estéricas e eletrostáticas destas moléculas. Cada contribuição foi avaliada com fator de início de 10% e foi acrescida de forma linear em intervalos regulares de 10% até o total de 90%. Isso foi realizado para verificar os maiores contribuintes de similaridade conformacional entre as moléculas (Figura 12).

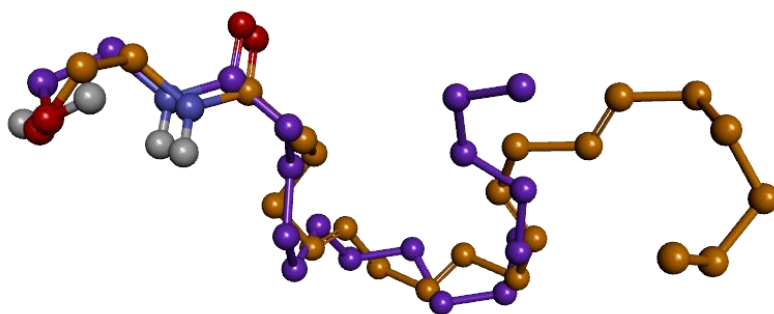


Figura 12. Sobreposição das formas de maior classificação após análise de ancoragem molecular. AEA (laranja) e PEA (roxo) podem ser vistas em sobreposição através da imagem 3D gerada pelo software BioVia Discovery Studio 2020. Oxigênios são representados em vermelho e Nitrogênios em azul.

### **3.6. Avaliação dos parâmetros clínicos**

Foi realizado o acompanhamento dos parâmetros clínicos da GVHD, a cada 2 dias, através de escala clínica, com pontuação de 0 a 14 (CASTOR *et al.*, 2010; CASTOR *et al.*, 2011). Esta escala avalia a variação do peso corporal; aspecto do pelo dos camundongos; descamação da pele, atividade do camundongo; postura em flexão do tronco e ocorrência de diarreia, bem como anotação dos casos de mortalidade nos grupos (Tabela 1). Para evitar sofrimento animal foi implementada uma linha de corte de 11 pontos na escala clínica (BERG *et al.*, 2021a). Deve-se observar que, perante o quadro de letargia grave o animal não se movimentava mesmo sob estímulo, este quadro se associava a pontuação de linha de corte, resultando na eutanásia do animal e a contabilização deste como evento de morte para análise de sobrevida.

Tabela 1. Escala clínica. A escala, ou score clínico, avalia a progressão e manifestação dos sinais clínicos associados à inflamação desencadeada pela GVHD. Esta tabela representa a conversão de dados qualitativos em dados quantitativos através da padronização de parâmetros que devem ser observados no animal. Esta tabela foi adaptada de CASTOR et al. (2011).

<b>Perda de Peso</b>	0 – Ausente ou ganho de peso	1,0 - até 10%	1,5 – de 10% a 20%	2,0 – Acima de 20%
<b>Postura</b>	0 – Normal	1,0 – Inclinação leve	1,5 – Inclinação leve com andar alterado	2,0 – Inclinação grave e dificuldade de locomoção
<b>Atividade</b>	0 – Normal	0,5 – Presença de Freezing ao ser retirado da caixa. Redução do movimento das vibrissas.	1,0 - Redução do comportamento exploratório e aumento do tempo de freezing após retirada da caixa	1,5 – Letargia moderada  2,0 – Letargia grave
<b>Textura do Pelo</b>	0 – Normal	0,5 – Arrepio leve restrito à região dorsal	1,0 – Arrepio leve em toda a extensão do corpo do animal incluindo membros	2,0 - Arrepio intenso com queda de pelos e porções sem pelos.
<b>Integridade da Pele (principalmente patas e cauda)</b>	0 – Normal	0,5 – Ressecamento da pele (esbranquiçada e seca ao toque)	1,0 – Descamação e perda de pelo	1,5 – Descamação, perda de pelo e eritema leve  2,0 - Descamação, perda de pelo, eritema e ferida aberta
<b>Sangue nas vezes</b>	0 – Ausente			2,0 – Presente
<b>Diarréia</b>	0 – Normal	0,5 – Levemente pastosa	1,0 - Pastosa	1,5 – Parcialmente líquida ainda com fragmentos sólidos  2,0 – Completamente líquida

### **3.7. Análises bioquímicas**

Órgãos alvos foram retirados 7 dias após o transplante e congelados em freezer -20° ou imediatamente processados para as análises que seguem:

#### **3.7.1. Detecção de citocinas e quimiocinas**

Os kits para ELISA de camundongo foram obtidos da R&D Systems (DuoSet). Cem miligramas da porção jejuno-íleo do intestino delgado dos animais foram homogeneizados com PBS contendo antiproteases (0,1 mM PMSF, 0,1 nM benzetônio clorídrico, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% de Tween20. O ensaio *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) foi realizado seguindo as instruções do fabricante (R&D System), sendo lido em espectrofotômetro, em um comprimento de onda de 492nm.

Para obtenção do homogenato de intestino, 100mg foram coletados da porção correspondente ao jejuno-íleo. Esta amostra foi homogeneizada em tampão de extração de citocinas (PBS+ 0,1mM PMSF, 0,1nM bezotônio clorídrico, 10mM EDTA, aprotinina A, 0,05% Tween 20, BSA e NaCL) na concentração de 1ml de solução para cada 100mg de tecido, com auxílio de um homogeneizador de tecidos (IKA® T10 Basic Ultra-Turrax®). Este homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos à 4°C, para posterior coleta do sobrenadante, que foi utilizado para o ELISA. Para o ensaio de ELISA foram seguidas as instruções do fabricante (R&D System); a leitura das amostras foi realizada em um aparelho de espectrofotometria no comprimento de onda de 490nm. O valor de absorbância das amostras foi determinado pelo próprio aparelho através da comparação da amostra com a curva de diluição padrão, sendo que a concentração do primeiro ponto foi fornecida pelo fabricante. Foram avaliadas CCL2, CCL3, CCL5, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL-10.

### **3.7.2. Quantificação dos parâmetros histopatológicos da reação inflamatória ocasionada pela GVHD**

Ao sétimo dia após a indução da GVHD, foi realizada a eutanásia dos animais. Após a eutanásia foram coletadas porções de jejuno-íleo e fígado. Os intestinos foram removidos por completo, lavados com PBS-1x para remoção do conteúdo intestinal. Foi então separada a porção correspondente ao jejuno e íleo, com o auxílio de um bisturi foi realizada abertura longitudinal do desta porção e o conteúdo fecal remanescente foi cuidadosamente removido. Este tecido foi então espiralado e condicionado em cassetes de plásticos e conservados em PFA10%, conforme descrito por ARANTES e NOGUEIRA (1997). Após 24h estas amostras foram transferidas para álcool 70%. O processamento das amostras se deu através de desidratação progressiva por subsequentes passagens de etanol nas concentrações de 80%, 90% e absoluto, de forma que cada etapa teve duração de 30 minutos. Em seguida, foi realizada a diafanização com Xilol, duas passagens de 20 minutos cada, e as amostras foram, por fim, embebidas em parafina líquida. Os blocos originários deste processamento foram utilizados para obtenção de cortes de 5µm de espessura. Os cortes foram afixados em lâminas para posterior desparafinização por Xilol e álcool (duas passagens de 20 minutos para o primeiro e uma passagem de 2 minutos para cada concentração decrescente previamente descrita de álcool).

O lobo superior do fígado foi utilizado para a análise histopatológica, porquanto as demais porções foram utilizadas para análises bioquímicas. O preparo da amostra seguiu o mesmo protocolo acima descrito para o intestino.

Para ambos os tecidos foi realizada a coloração H&E, LSAB®+system, HRP Peroxidase Kit (Dako, Carpinteria, CA) e incubados em 3,3'-Diaminobenzidina em chromogen solution (Dako) por 2 a 5 minutos em temperatura ambiente. Então os tecidos foram contra corados com hematoxilina, para a análise e quantificação dos parâmetros histopatológicos da reação ocasionada pela GVHD como descrito em CASTOR *et al.* (2010).

Tabela 2. Critérios utilizados para avaliação histopatológica de secções de Jejuno-íleo. A análise histopatológica do intestino teve por foco a região do Jejuno-íleo e as alterações encontradas em seu epitélio, lâmina própria, camada muscular e serosa foram pontuadas.

<b>Critérios avaliados no Jejuno-íleo</b>			
<b>Epitélio</b>	<b>Lâmina Própria</b>	<b>Camada Muscular e Serosa</b>	
0	Sem alterações perceptíveis.	Aspecto normal.	Sem alterações perceptíveis.
1	Alterações reacionais discretas com desorganização e distanciamento celular.	Hiperemia e edema discretos associados a infiltrado discreto de células mononucleares.	Infiltrado discreto de células mononucleares e edema na camada serosa.
2	Alterações/perda da arquitetura das criptas e epitélio.	Hiperemia e edema moderados associados a infiltrado moderado de células mononucleares.	Infiltrado moderado e focal de células mononucleares em ambas as camadas.
3	Alterações proliferativas nucleares e hiperplasia.	Intensa hiperemia e edema associados a intenso infiltrado inflamatório e alargamento das vilosidades.	Infiltrado intenso de células mononucleares associada a alterações inflamatórias em ambas as camadas.

Ao término da avaliação foi realizado somatório das notas para as três categorias e cada lâmina foi classificada de acordo com o total obtido, sendo que, ao receber pontuação de 0-3 era considerada normal ou com alterações discretas; 4-6 alterações moderadas; 7-9 alterações intensas.

Tabela 3. Critérios utilizados para avaliação histopatológica de secções de Fígado. A análise histopatológica no fígado teve como principais alvos as alterações do parênquima e achado de infiltrado inflamatório nas regiões periportal e intralobular.

<b>Critérios avaliados no Fígado</b>		
	<b>Parênquima</b>	<b>Infiltrado inflamatório</b>
0	Sem alterações perceptíveis.	Ausente ou raro
1	Alterações discretas com focos de vacuolização citoplasmática e eosinofilia.	Infiltrado discreto na região periportal
2	Alterações na morfologia celular, vacuolização difusa, alterações nucleares	Infiltrado discreto ou moderado nas regiões periportal e intralobular
3	Morte hepatocitária, vacuolização difusa, alterações morfológicas celulares e mudança na conformação do núcleo.	Infiltrado acentuado nas regiões periportal e intralobular

### **3.7.3. Análise do acúmulo de células T por Citometria de fluxo**

Amostras de baço, linfonodos, fígado e intestinos foram coletadas e maceradas, sendo mantidas em RPMI enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB), seguido de centrifugação a 1200 RPM por 5 minutos à 4°C. Sendo tratadas com ACK por cinco minutos, para remoção de hemácias.

O protocolo para obtenção de células de baço compreendeu as seguintes etapas: as amostras foram maceradas e mantidas em RPMI enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB), seguido de centrifugação a 1200rpm (~350G) por 5 minutos à 4°C. As amostras foram tratadas com ACK por cinco minutos, para remoção de hemácias. Em seguida as amostras foram ressuspendidas

em PBS-1x, centrifugadas e então ressuspensas em 1mL de RPMI enriquecido com SFB. As células viáveis foram então contadas em câmara de Neubauer, marcadas com anticorpos fluorescentes e a amostra foi diluída em FacsBuffer para leitura.

O jejuno-íleo foi retirado e lavado com PBS para remoção do conteúdo intestinal. O tecido foi então homogeneizado e colocado em um Falcon contendo uma solução de PBS+5mM EDTA+10mM Hepes sendo alocado por 20 minutos no homogeneizador de soluções (PhoenixLuferto®). Após este período a amostra foi centrifugada à 1500RPM/5'/20°C e o sobrenadante foi descartado. O pellet remanescente foi então ressuspensado em solução de HEPES sendo novamente homogeneizado por 20 minutos e em seguida centrifugado e o sobrenadante descartado. O pellet foi então lavado duas vezes com RPMI 1640 e centrifugado 1200RPM/10'/20°C, o sobrenadante foi novamente descartado e o pellet foi ressuspensado em uma solução de 9mg de Colagenase Tipo IV Sigma-Aldrich® em 10ml de meio RPMI, sendo mantida por 90 minutos no homogeneizador de soluções. A solução resultante foi filtrada em membrana *cell strainer* Falcon® de nylon (70µm) para remoção de quaisquer pedaços remanescentes, sendo a membrana lavada repetidamente com RPMI, para reduzir a perda de células viáveis. A amostra foi então centrifugada a 1500RPM/10'/20°C e o pellet foi ressuspensado em 1ml de meio RPMI para contagem na câmara de Neubauer conforme descrição prévia.

Para a marcação de superfície celular (CD3, CD4, CD8, CD11b e CD28) com os anticorpos, foram adicionados 20µl de mix para cada  $1 \times 10^6$  células, este mix foi preparado em Facs buffer (PBS/BSA 1%) de acordo com as diluições dos anticorpos propostos pelo fabricante. As amostras foram incubadas por 30 minutos e então lavadas individualmente com 200µl de PBS1x 4°C e centrifugadas a 2000RPM/5'/4°C. Em seguida foram ressuspensas em 300µl de Facs Buffer.

Após a marcação de superfície celular, foi realizada a marcação intracelular, para tanto, as amostras foram ressuspensas em 200µl de

formol 2% e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. Este passo foi realizado para que a primeira marcação pudesse ser fixada. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 2000RPM/5´/4°C e o sobrenadante foi descartado. Os pellets foram ressuspensos em 300µl de BD Perm/Wash™ buffer e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 2000RPM/5´/4°C e o sobrenadante descartado. Foi adicionado em seguida 40µl de anticorpo anti-FoxP3 diluído em de BD Perm/Wash™ buffer e incubado por 45 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram lavadas com 200µl de PBS1x e centrifugadas a 2000RPM/5´/4°C. A amostra foi, então, ressuspensa em 300µl de PBS/BSA 1% e lidas em leitor FacsScalibur®.

Para obtenção de células do fígado, as amostras foram maceradas e acondicionadas em um Falcon de 50mL com solução de EGTA 2,4M (em 450mL de H<sub>2</sub>O + 1,42M NaCl + 67mM KCl + 100mM Hepes) sendo então colocadas em um homogeneizador de soluções (PhoenixLuferco®) por 10 minutos. As amostras foram então centrifugadas à 1200RPM/5´/4°C, sobrenadante descartado e o pellet ressuspendido na mesma solução de EGTA 2,4M sendo novamente centrifugadas à 1200RPM/5´/4°C, sobrenadante descartado e então ressuspendidas em uma solução de albumina 0,5% (junto à NaCl 67mM; KCl 6,7mM; Hepes 100mM; em H<sub>2</sub>O). Em seguidas as células foram marcadas através do protocolo de marcação de superfície celular e intracelular já descrito.

A medula foi utilizada para marcação de H2D<sup>b</sup> e H2D<sup>d</sup> para avaliação de quimerização, sendo estes haplotipos de MHC I de C57BL/6j e BALB/c, respectivamente. Para tanto, as células foram obtidas através da lavagem de fêmurs dos camundongos, sete dias após a indução, em seguida, foi utilizado o protocolo de marcação de superfície celular já descrito.

Os dados obtidos pelo leitor FacsScalibur® foram analisadas através do programa FlowJo® versão X-10, sendo que cada marcador foi analisado conforme seu respectivo *data-sheet* ou com base em análises já

estabelecidas na literatura (Rezende, 2017; Weber, 2014; Barbesti, 2005; Adan, 2017).

### 3.7.4. Estratégia de Gate para análise de Citometria de Fluxo

A estratégia de utilizada para análise de marcadores de superfície celular resume-se em primeiro realizar a diferenciação das populações celulares através de tamanho e granulosidade, seguida da remoção de células duplicadas ou em grupos. Para este trabalho apenas a população de linfócitos foi utilizada em fígado e intestino. A população de linfócitos foi então analisada para identificação de células  $CD3^+$  e dentro desta população puderam ser isoladas células  $CD4^+$  e  $CD8^+$ . A partir destas populações foi possível verificar a expressão de  $CD28$  através de histograma, permitindo a quantificação da ativação celular destas populações (Figura 13).

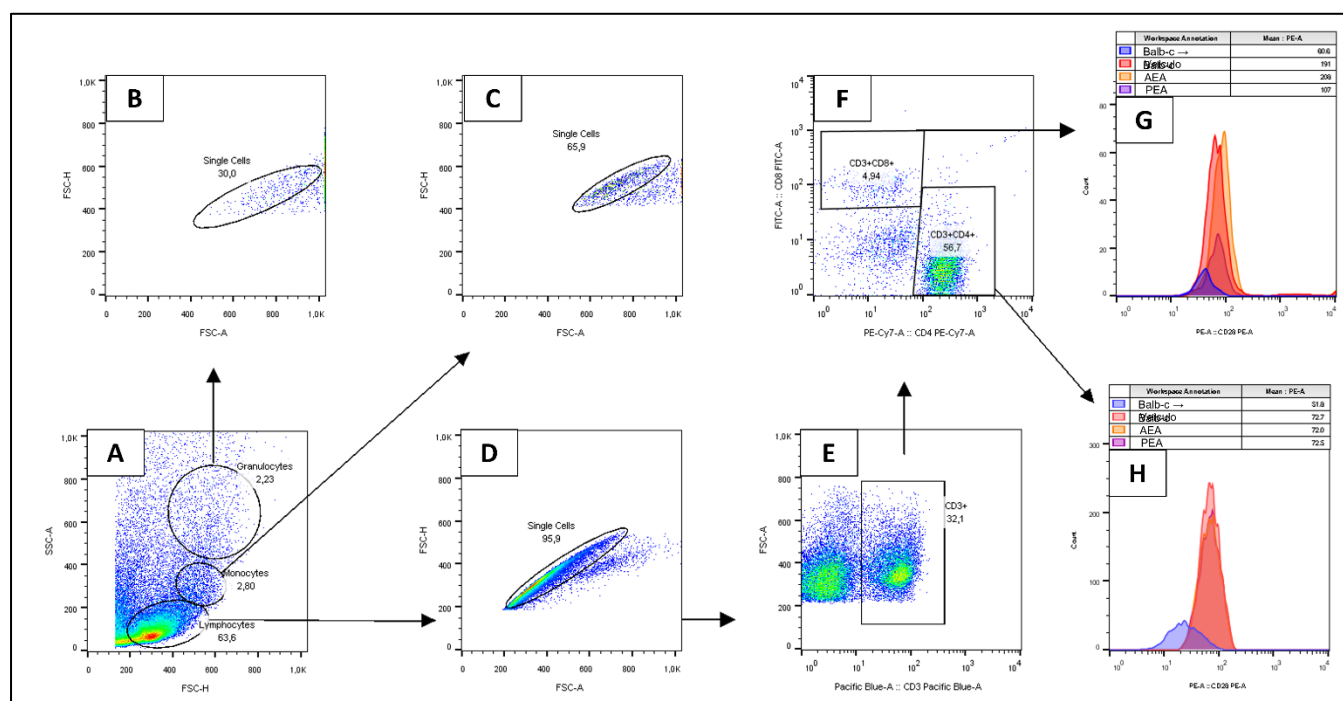


Figura 13. Estratégia de Gate. (A) Amostra inicial separada por granulosidade e tamanho. (B) Separação de células únicas dentro da população de granulócitos. (C) Separação de células únicas dentro da população de monócitos. (D) Separação de

células únicas dentro da população de Linfócitos. (E) Identificação da população de células CD3<sup>+</sup>. (F) Identificação das populações de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. (G) Intensidade média de fluorescência de células CD28 dentro da população de células CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. (H) Intensidade média de fluorescência de células CD28 dentro da população de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>.

A análise de FoxP3, um marcador intracelular se deu pela separação de linfócitos, seguida da separação de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e dentro desta população foi possível avaliar a intensidade média de fluorescência de FoxP3, caracterizando células T regulatórias (Figura 14).

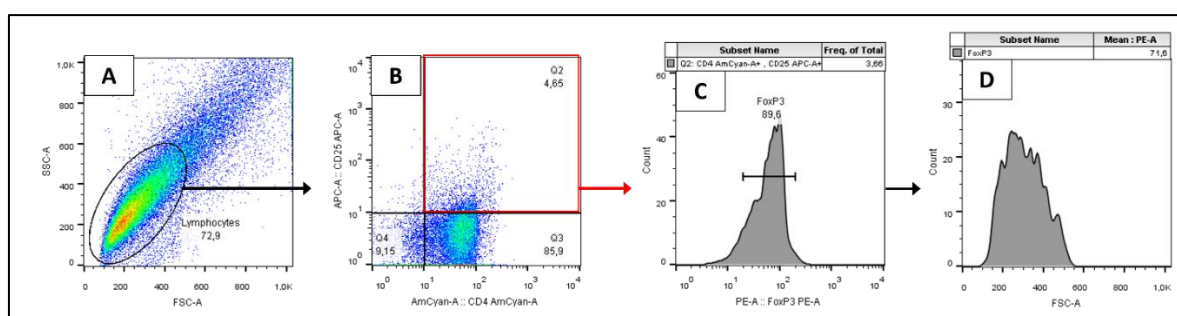


Figura 14 - Análise de FoxP3. (A) Amostra inicial de células do intestino com seleção de linfócitos totais. (B) Identificação das populações de células CD4<sup>+</sup> e CD25<sup>+</sup>. (C - D) Intensidade média de fluorescência de células FoxP3 dentro da população de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.

### 3.8. Rolamento e Adesão

Para este experimento, foram utilizados animais C57BL/6j-GFP<sup>+</sup> como doadores para os animais BALB/c que receberam transplante alogênico. Ao sétimo dia pós-indução da GVHD os animais foram anestesiados através de injeção i.p. de 100 mg/Kg de cetamina junto à 10 mg/kg de xilazina em salina. O tratamento com os endocanabinoides ou seus respectivos veículos foi realizado uma hora antes do procedimento cirúrgico. O animal anestesiado foi posicionado em uma placa aquecida à 37°C (Figura 15 - A). O mesentério foi cuidadosamente exposto através de uma incisão longitudinal na porção distal do abdome do animal, sendo o mesentério estendido em uma abertura transparente da placa, permitindo a passagem da luz. Para garantir a hidratação e proteção do órgão, o mesentério foi estendido em papel filtro umedecido com PBS-1x. Foi utilizada

a objetiva de 20x de um microscópio intravital (Nikon, ECLIPSE 50i, 20x objective lens) para exame da microvasculatura mesentérica e intestinal. Células em rolamento foram definidas como aquelas que se moviam aquém à velocidade das demais, especialmente em relação aos eritrócitos. Esta análise foi realizada por 1 minuto e em vênulas de 40-60 $\mu\text{m}$  de espessura (Figura 15 - B). Por sua vez, células foram consideradas aderentes quando permaneceram em um mesmo ponto do vaso por mais de 30 segundos, seguindo os mesmos parâmetros de tamanho, já descritos, e em um comprimento de 100 $\mu\text{m}$  (Figura 15 - C).

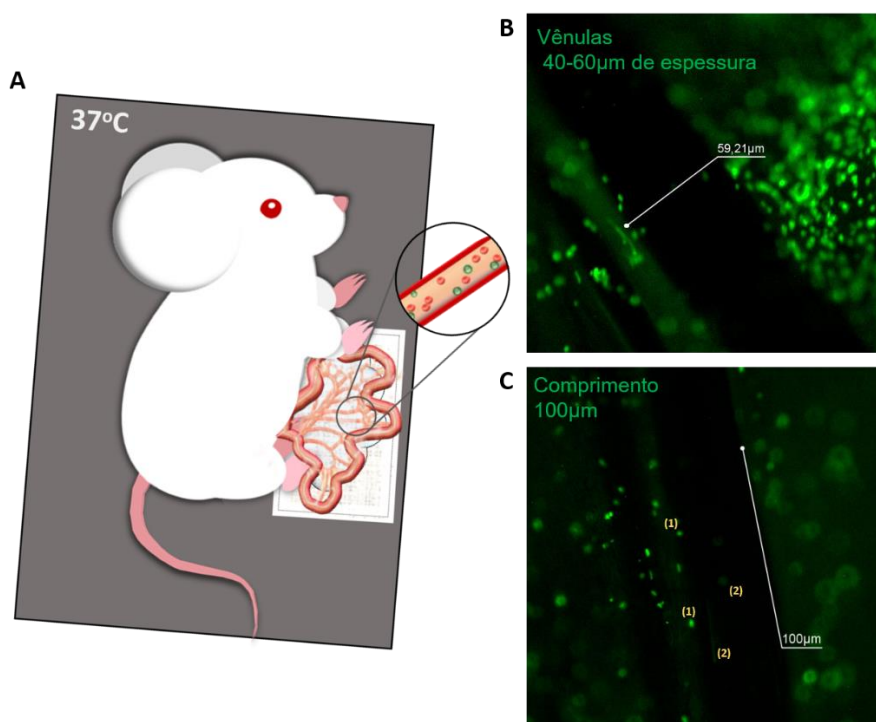


Figura 15. Intravital em microscópio confocal. (A) Desenho esquemático de como o mesentério foi exposto durante o procedimento, de forma que o animal encontrava-se sob efeito de anestesia em alocado em uma placa de 37°C. (B) Zoom de vaso para exemplificar como foi realizada a análise de rolamento durante um minuto de vídeo. (C) Imagem representativa de como foi realizada a análise de adesão das células.

### **3.9. Análise estatística**

Os dados foram primeiramente analisados pelo teste de Shapiro-Wilk para distribuição normal, de forma que este teste será utilizado como indicativo para a posterior utilização de um teste paramétrico ou não-paramétrico. Para dados paramétricos foi realizado o teste de Grubb's ( $\alpha = 0,05$ ) para remoção de outliers.

O teste de múltiplas comparações por one-way Anova foi utilizado a fim de verificar a existência de diferenças estatísticas entre os grupos, com pós-teste de Bonferroni, uma vez que este usa como principal fator a diferença entre as médias dos grupos, sendo ideal para análises paramétricas e, portanto, também para nossos dados, uma vez que houve predominância de distribuição gaussiana em nossos dados.

Para amostras com predominância de mais de 33% dos grupos em distribuição não-gaussiana foi realizado o teste de múltiplas comparações Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn, no qual a variância é o fator determinante. As amostras foram consideradas diferentes para  $P < 0,05$  e os resultados estão expressos em gráficos de dispersão contendo média. Todas as análises foram realizadas através do programa GraphPadPrism® versão 8.0.2.

The image features a white rectangular box in the lower-left quadrant, containing the word "Resultados" in a bold, black, sans-serif font. The background is a gradient of light gray, with a darker gray area at the bottom right corner.

# **Resultados**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. A GVHD não altera os níveis de AEA endógena

Através de LC-MS/MS, verificamos a produção de AEA no intestino, soro e fígado de animais que receberam transplante singênico ou alogênico, este último desenvolvendo GVHD. De maneira muito interessante, a indução da GVHD não levou a alterações nas concentrações de AEA no jejuno-íleo ou séricos nos animais com GVHD quando comparados ao grupo que recebeu transplante singênico,  $P= 0,5750$  e  $P= 0,1456$ , respectivamente. Entretanto, houve aumento da concentração de AEA no fígado de animais com GVHD quando comparado ao fígado de animais que receberam transplante singênico ( $P= 0,0192$ ) (Tabela 2)

Tabela 4. Quantificação de AEA. Os níveis de AEA foram quantificados através de LC-MS/MS e estão expressos em picogramas por miligrama de amostra obtida.

QUANTIDADE DETECTADA DE AEA (PG/MG)

AMOSTRA	Jejuno-íleo	Soro	Fígado
BALB/C → BALB/C	8.8±1.2	260±23.85	5.48±0.7
C57BL/6J → BALB/C	10.3±2.6	202.5±22.62	13.6±3.3*

### 4.2. MAFP aumenta sobrevida de animais com GVHD

Os animais BALB/c que receberam transplante alogênico de medula e esplenócitos foram tratados com MAFP uma hora antes da indução da doença e continuaram a ser tratados nos dias subsequentes para que a mortalidade fosse observada. O tratamento com MAFP, um potente inibidor irreversível da enzima FAAH foi capaz de aumentar a sobrevida dos animais quando comparado ao grupo veículo ( $P = 0,0077$ ), não sendo diferente do grupo singênico ( $P = 0,3173$ ), porquanto o grupo veículo apresentou diferença estatística também do grupo

singênico ( $P = 0,0020$ ) (Figura 16 - A). Observa-se, porém, que o tratamento com MAFP foi capaz de reduzir a escala clínica dos animais, quando comparado ao grupo veículo, no 10º, 14º, 16º e 20º dias ( $P < 0,05$ ), entretanto tanto o grupo MAFP quanto o veículo apresentaram diferença significativa do grupo singênico a partir do 4º dia após a indução (Figura 16 - B). Não houve diferença significativa entre veículo e MAFP em relação à perda de peso, e ambos se mostraram diferentes do grupo singênico, sendo que o grupo veículo apresenta esta diferença a partir do 6º dia ( $P = 0,0169$ ) e o mesmo só passou a ocorrer com MAFP ao 12º dia ( $P = 0,0373$ ) (Figura 16 - C). Desta forma, ao inibir a ação da enzima FAAH, responsável pela hidrólise de AEA em ácido araquidônico e etanolamina (SCHICHO; STORR, 2014), ocorre um aumento dos níveis de AEA endógena (CIPPITELLI *et al.*, 2008; PANLILIO *et al.*, 2016; SOLINAS *et al.*, 2006).

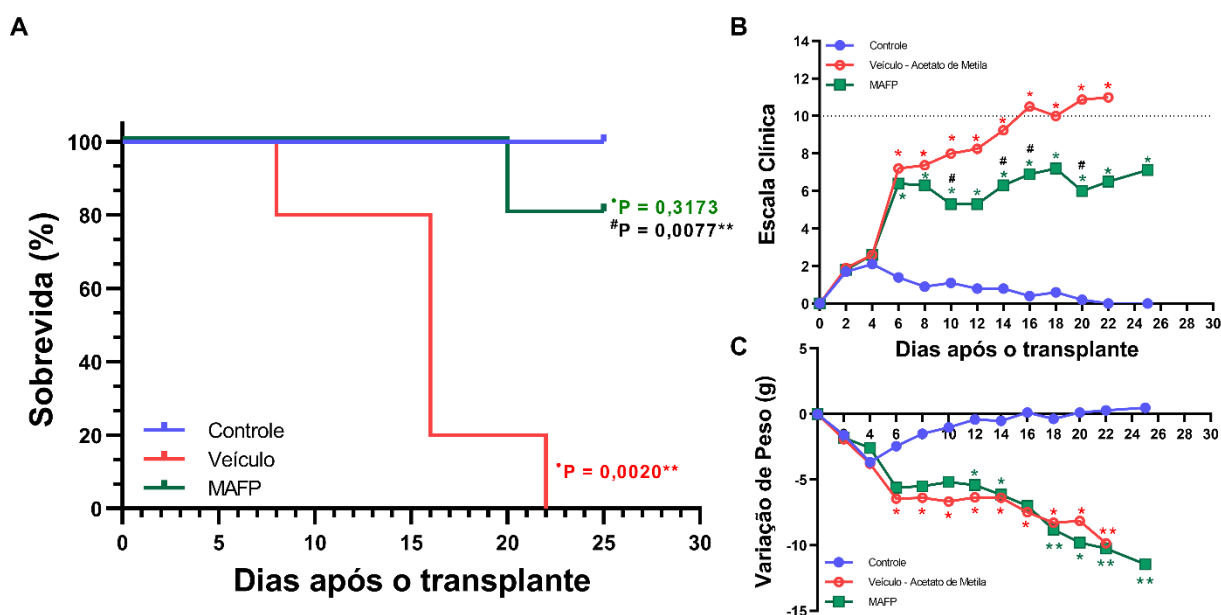


Figura 16 - Tratamento com MAFP, inibidor seletivo não-reversível da enzima FAAH. (A) O tratamento com MAFP levou ao aumento de sobrevivida quando comparado ao grupo veículo. (B) O tratamento levou à redução dos sinais clínicos quando comparado ao grupo veículo. (C) Não houve diferença entre grupo MAFP e grupo Veículo em relação à variação de peso.  $N=5$  para todos os grupos. A sobrevivida foi verificada através do teste de Log-rank (Mantel-Cox), sendo os grupos considerados diferentes para  $P < 0,05$ . Anova de duas vias com Pos-teste de Bonferroni foi utilizado em análise de

multiplas comparações para entrontrar diferenças ( $P < 0,05$ ) entre os grupos.\* representa diferença em relação ao grupo singênico e # em relação ao grupo veículo.

Entretanto, alguns autores discutem que MAFP é menos ativo no organismo murino, indicando uma possível degradação metabólica ou dificuldade em seu transporte, não sendo, portanto, um fármaco ideal para tratamento *in vivo* (QUISTAD *et al.*, 2001). Ademais, existem importantes diferenças entre a FAAH humana e murina, de forma que um inibidor com eficácia comprovada em camundongos não será necessariamente eficaz em humanos (DI VENERE *et al.*, 2012). A AEA, entretanto, é evolutivamente preservada e sua estrutura é comum a grande parte dos mamíferos e até mesmo alguns invertebrados (ELPHICK *et al.*, 2003). Portanto, nosso próximo passo foi avaliar se o tratamento com AEA de origem exógena poderia também melhorar os parâmetros clínicos dos animais e aumentar a sobrevida.

#### **4.3. Tratamento com Anandamida exógena aumenta a sobrevida de animais com GVHD**

Seguindo o protocolo anteriormente apresentado, os animais BALB/c que receberam transplante alogênico foram tratados diariamente com AEA ou seu veículo para avaliação de seus efeitos sob a mortalidade e morbidade associadas à GVHD. Foram avaliadas as doses de 2,5mg/kg, 5mg/kg e 10mg/kg de AEA. O tratamento com AEA 2,5mg/kg levou a 40% de sobrevida, não sendo diferente do grupo veículo ( $P=0,1260$ ) e sendo diferente do grupo singênico ( $P=0,004$ ); AEA 5mg/kg promoveu 50% de sobrevida, sem, entretanto, ser diferente do grupo veículo ( $P=0,0547$ ) e ainda sendo diferente do grupo singênico ( $P=0,0115$ ); AEA 10 mg/kg levou a 60% de sobrevida, sendo diferente do grupo veículo ( $P=0,0067$ ), ainda sendo diferente do grupo singênico ( $P=0,0293$ ) (Figura 17 - A).

Em relação aos sinais clínicos, os grupos tratados com AEA e o grupo veículo demonstraram diferença e relação ao grupo singênico a partir do terceiro dia após o transplante ( $P < 0,05$ ); de forma que AEA 2,5mg/kg e AEA 10mg/kg apresentaram diferença em relação ao grupo veículo ao 3º e 4º dia após o transplante, enquanto AEA 10mg/kg reduziu os clínicos a partir do 12º dia, quando comparado ao grupo veículo (Figura 17 - B).

Ao comparar a variação de peso entre os grupos encontrou-se que o grupo veículo apresenta variação em relação ao grupo singênico a partir do 6º dia após indução ( $P = 0,0032$ ) permanecendo diferente até o fim do experimento. Por fim, os grupos tratados com AEA apresentaram-se diferentes do grupo singênico a partir do 7º dia ( $P = 0,0025$ ); não houve diferença entre o grupo veículo e os grupos que receberam AEA em relação à variação de peso (Figura 17 - C). Desta forma, este endocanabinóide, quando utilizado como tratamento i.p., foi eficaz em promover aumento de sobrevivência nos animais e a dose de 10mg/kg foi escolhida para os demais protocolos, uma vez que levou ao maior aumento de sobrevivência. Para investigar o mecanismo por detrás deste aumento em sobrevivência, decidimos investigar os aspectos fisiológicos dos animais nos protocolos que seguem.

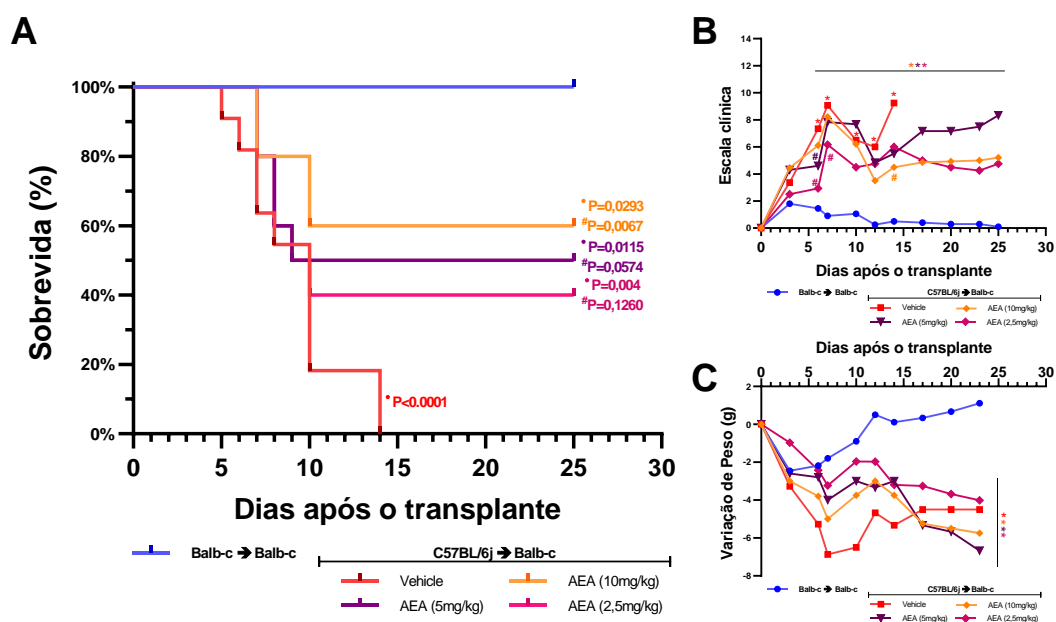


Figura 17. Tratamento com Anandamida exógena. Animais que receberam transplante alogênico foram tratados com Veículo ou AEA, nas concentrações de 2,5mg/kg, 5 mg/kg, 10mg/kg. (A) Efeito dos tratamentos na sobrevida. (B) Escala clínica. (C) Variação de peso em gramas. N=5 para todos os grupos. A sobrevida foi verificada através do teste de Log-rank (Mantel-Cox), sendo os grupos considerados diferentes para  $P < 0,05$ . Anova de duas vias com Pos-teste de Bonferroni foi utilizado em análise de múltiplas comparações para entrar diferenças ( $P < 0,05$ ) entre os grupos.\* representa diferença em relação ao grupo singênico e # em relação ao grupo veículo.

#### 4.4. Tratamento com AEA não interfere no processo de enxertamento

Através de citometria de fluxo analisamos a porcentagem de enxertamento das células transplantadas. O quimerismo foi determinado pela porcentagem de células que expressam  $H2^d$  em comparação às que expressam  $H2^b$ . Desta forma, em camundongos BALB/c, que naturalmente expressam  $H2^d$ , após 7 dias do transplante observou-se que tanto medula quanto baço estavam povoados predominantemente por células  $H2^b$ , indicando o sucesso do transplante e do enxertamento das células transplantadas (Figura 18 - A). É interessante observar que não houve diferença entre o grupo tratado com AEA e o grupo veículo tanto

na medula ( $H2^d$   $P=0.9300$ ;  $H2^b$   $P=0.4200$  – Figura 18 - B), quanto no Baço ( $H2^d$   $P=0.7384$ ;  $H2^b$   $P=0.5155$  - Figura 18 - C).

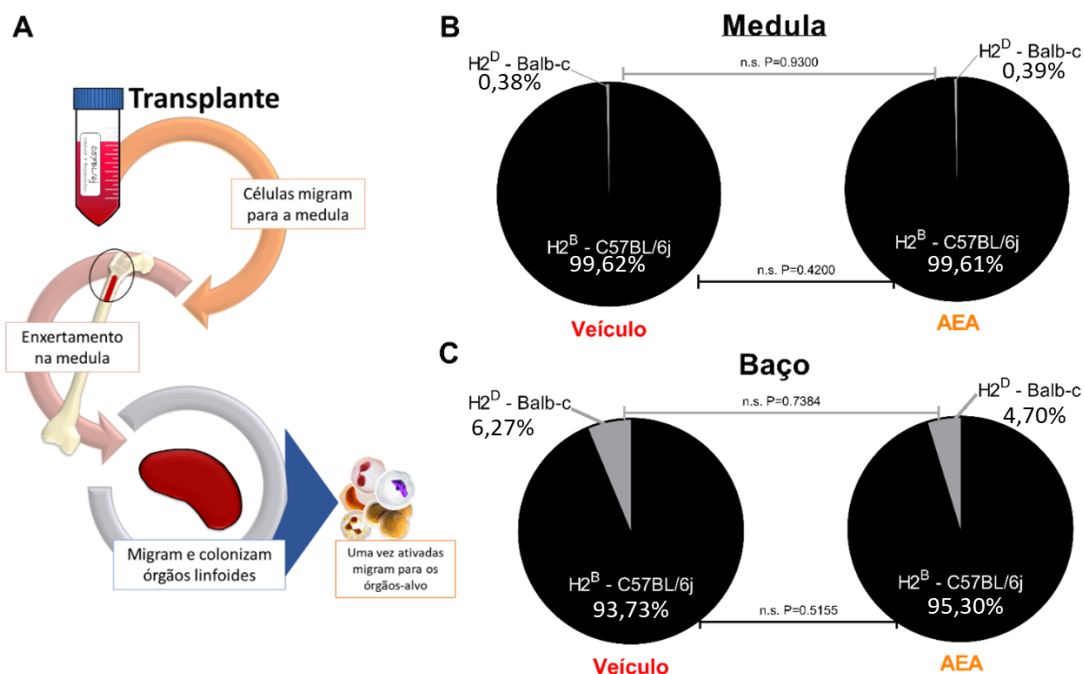


Figura 18. Processo de enxertamento. (A) Etapas do processo de enxertamento, essencial para que ocorra o quimerismo do animal com GVHD. (B) Porcentagem de enxertamento analisada na medula de animais que receberam transplante alogênico, após 7 dias do transplante. (C) Porcentagem de enxertamento analisada no baço de animais que receberam transplante alogênico, após 7 dias do transplante.  $N=5$  para todos os grupos. Teste T de Student, paramétrico, não-pareado e bicaudal foi utilizado para avaliar se havia significância entre as médias dos grupos ( $P<0,05$ ). \* representa diferença em relação ao grupo singênico e # em relação ao grupo veículo.

#### 4.5. AEA não altera o perfil linfocitário no baço

O baço dos animais dos três grupos foi coletado ao 7º dia após o transplante e observou-se que não houve redução no número de granulócitos, monócitos ou linfócitos totais no baço dos animais tratados com AEA quando comparado ao grupo veículo (Figura 19 – A-C). Não houve também diferença em relação ao número de linfócitos T  $CD3^+$ , T  $CD3^+CD4^+$  ou T  $CD3^+CD8^+$  entre os grupos (Figura 19 – D-F), porquanto também não foi encontrada diferença na ativação

das células  $CD3^+CD4^+$  e  $CD3^+CD8^+$  (Figura 19 – G-H). Finalmente, acerca do número de células  $CD4^+CD25^+$  não houve também diferença em relação à veículo e AEA, havendo, entretanto, aumento no número destas células em relação ao grupo singênico ( $P = 0,0163$ ). De forma interessantes, em relação ao MFI de FoxP3 ambos os grupos que receberam transplante alogênico, veículo e AEA, apresentaram redução de sua expressão quando comparados ao grupo singênico ( $P < 0,0001$  em ambas as comparações) (Figura 19 - I-J).

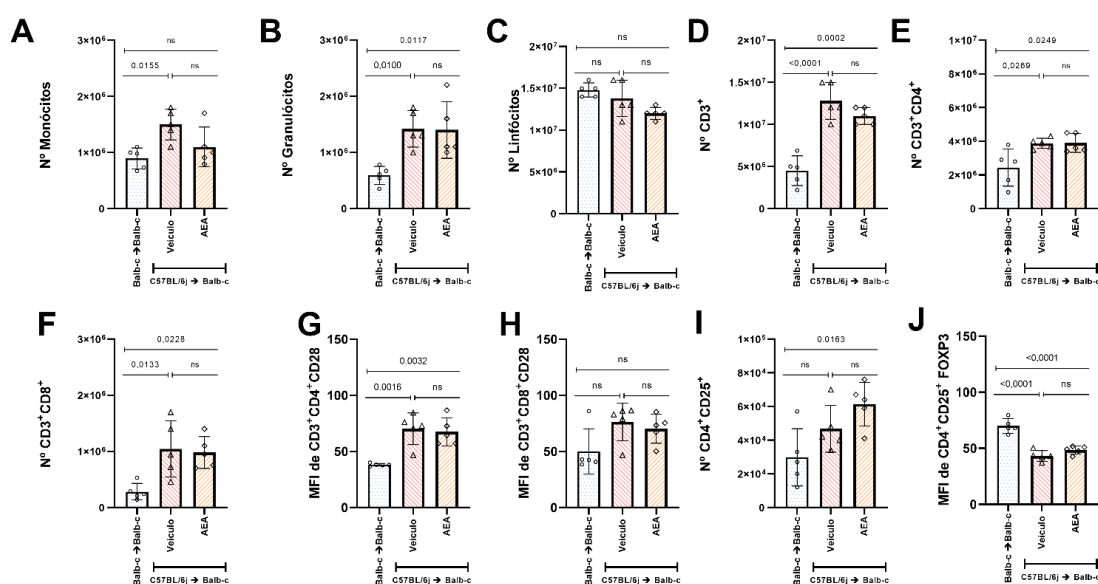


Figura 19. Citometria de fluxo de baço. (A) Número de monócitos. (B) Número de granulócitos. (C) Número de Linfócitos. (D) Número de linfócitos  $CD3^+$ . (E) Número de linfócitos  $CD3^+CD4^+$ . (F) Número de linfócitos  $CD3^+CD8^+$ . (G) Intensidade média de fluorescência de CD28 dentre a população de linfócitos  $CD3^+CD4^+$ . (H) Intensidade média de fluorescência de CD28 dentre a população de linfócitos  $CD3^+CD8^+$ . (I) Número de linfócitos  $CD4^+CD25^+$ . (J) Intensidade média de fluorescência de FoxP3 dentre a população de linfócitos  $CD4^+CD25^+$ .  $N=5$  para todos os grupos. Anova de duas vias com Pos-teste de Bonferroni foi utilizado em análise de multiplas comparações para entrontrar diferenças ( $P < 0,05$ ) entre os grupos.\*representa nível de significancia de P.

## **4.6. Anandamida protege o intestino**

### **4.6.1. Análise histopatológica**

Os animais foram eutanasiados e seus intestinos foram coletados e processados sete dias após a indução da GVHD, em análise cega dos cortes corados com H&E (Figura 20 - A-F) o patologista indicou que houve diferença entre o grupo tratado com AEA e o grupo veículo ( $P= 0,0256$ ), de forma que o grupo veículo também foi diferente do singênico ( $P <0,0001$ ), assim como o grupo AEA ( $P=0,0048$ ) (Figura 20 - G). Desta forma, o tratamento foi eficaz em reduzir o escore histopatológico dos intestinos, mas não suficiente para abolir o processo inflamatório local. Evidencia-se, entretanto, a redução de infiltrado inflamatório, maior preservação da arquitetura das criptas e paredes intestinais, bem como a redução do espessamento da camada muscular em decorrência ao tratamento com AEA ao ser comparado ao grupo veículo. Portanto, decidimos investigar se existiam alterações nas citocinas e quimiocinas relacionadas ao processo inflamatório, assim como acerca do perfil linfocitário neste órgão.

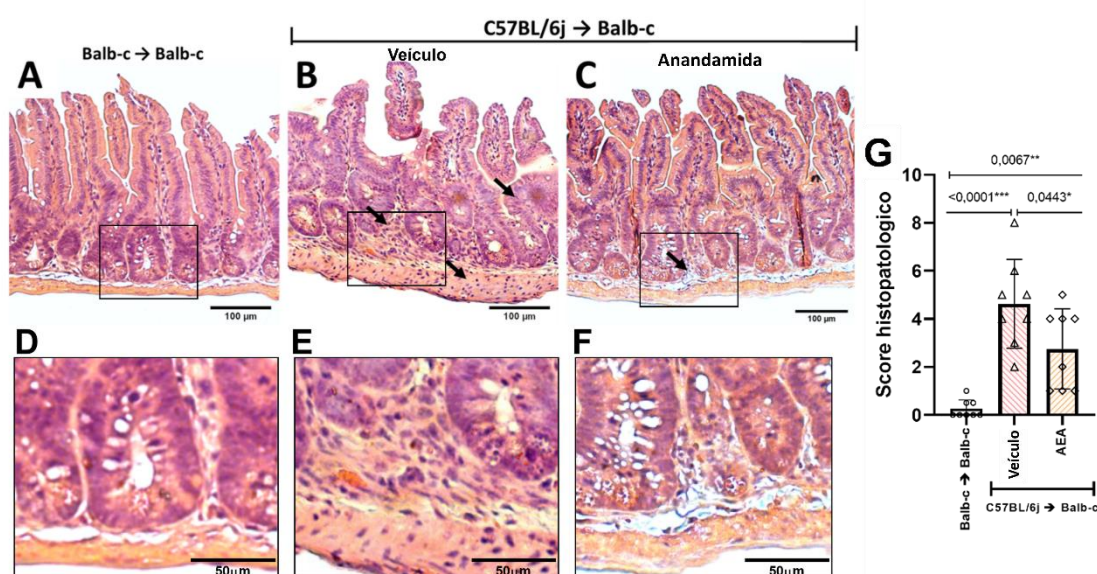


Figura 20. Análise histopatológica do intestino. (A) Imagem representativa do grupo Singênico. (B) Imagem representativa do grupo veículo. (C) Imagem representativa do grupo tratado com AEA. Em detalhe observa-se a em detalhe (D – F) a região basal onde foi encontrado aumento de infiltrado inflamatório no grupo veículo (G) Score histopatológico baseado nas lâminas coradas em H&E dos três grupos experimentais. N=5 para todos os grupos. Anova de duas vias com Pos-teste de Bonferroni foi utilizado em análise de multiplas comparações para entrontrar diferenças ( $P<0,05$ ) entre os grupos.\*representa nível de significancia de P.

#### 4.6.2. Análise de mediadores pró-inflamatórios

Foram analisados os seguintes mediadores pro-inflamatórios: CCL2, CCL3, CCL5,  $TNF\alpha$  e  $INF\gamma$ . Analisamos também o mediador anti-inflamatório IL-10. De maneira muito interessante, não houve alteração no perfil dos mediadores pró-inflamatórios no grupo AEA em relação ao grupo veículo e tanto AEA quanto o grupo veículo apresentaram resultados diferentes do grupo singênico para CCL2, CCL3 e  $INF\gamma$  (Figura 21 - A-E). Entretanto, houve aumento de IL-10, um mediador anti-inflamatório, no grupo tratado com AEA em relação ao grupo veículo ( $P= 0,0339$ ) (Figura 21 - F).

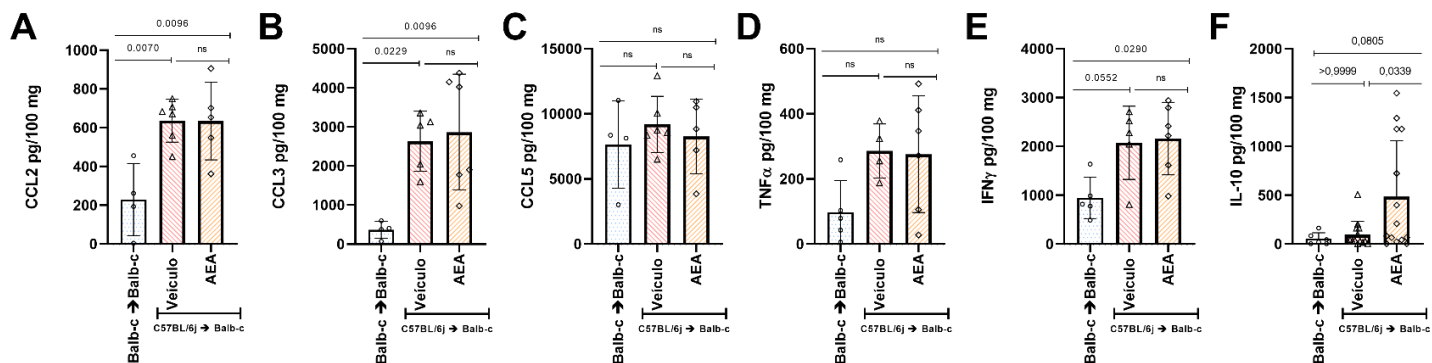


Figura 21. Análise de citocinas e quimiocinas através de ELISA de amostras de Intestino. Foram analisadas as quimiocinas pró-inflamatórias (A) CCL2, (B) CCL3, (C) CCL5. As citocinas pró-inflamatórias (D) TNF $\alpha$  e (E) IFN $\gamma$ . E também (F) IL-10, uma interleucina anti-inflamatória. N=5 para todos os grupos. Anova de duas vias com Pos-teste de Bonferroni foi utilizado em análise de multiplas comparações para entrontrar diferenças (P<0,05) entre os grupos.\*representa nível de significancia de P.

#### 4.6.3. Análise de perfil linfocitário

Em relação à análise realizada por citometria de fluxo, não houve diferença no número total de linfócitos entre os grupos (Figura 22 – A), entretanto houve diferença em relação ao número de células CD3<sup>+</sup> entre o grupo veículo e AEA (P= 0.0236), de forma que o grupo veículo foi também diferente do grupo singênico (P=0.0382) (Figura 22 – B). O número de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> foi reduzido no grupo AEA quando comparado ao grupo veículo (P= 0.0236 e P= 0.0016) (Figura 22 – C-D), desta mesma forma, houve redução na ativação destas células no grupo AEA quando comparado ao veículo (P=0,0057 e P=0.0431) (Figura 22 – E-F). Avaliamos também o número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e o MFI de FoxP3 nestas células, não havendo diferença entre AEA e veículo (Figura 22 – G-H). Anandamida interfere na adesão das células

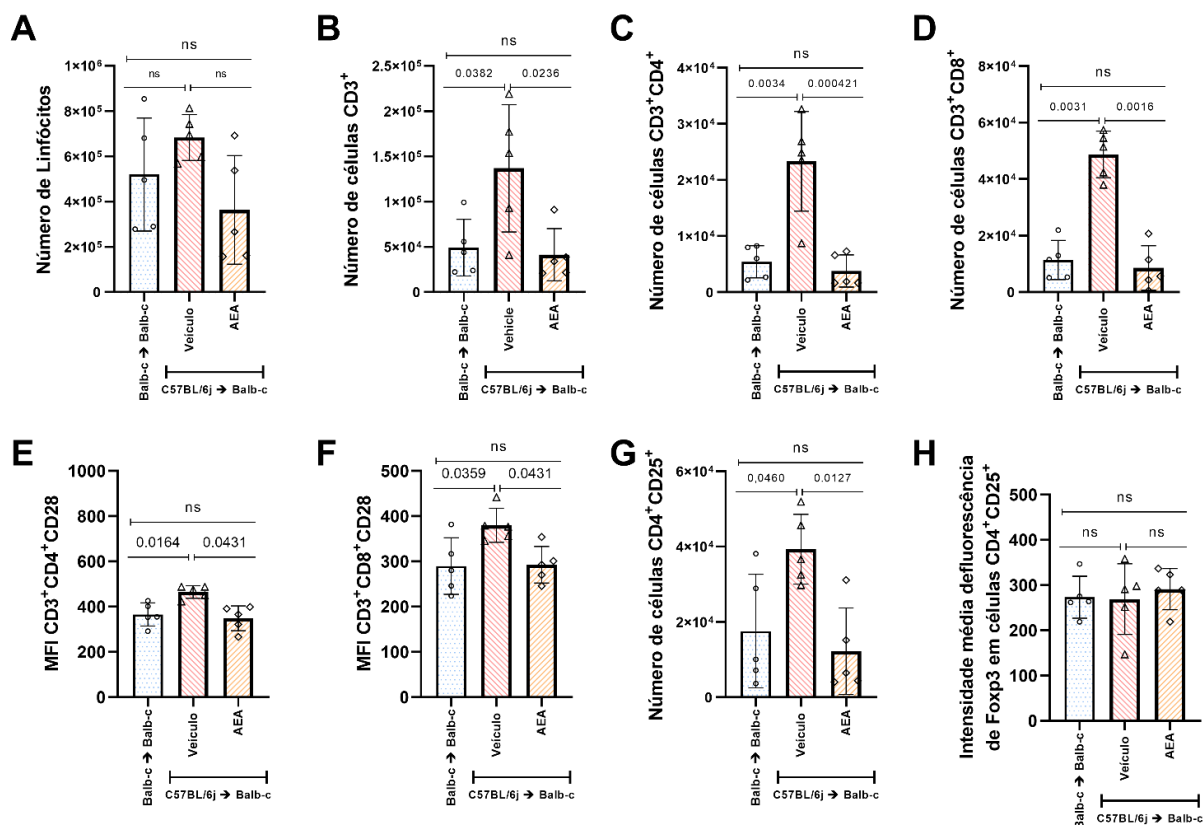


Figura 22. Citometria de Fluxo de Intestino. (A) Número de Linfócitos. (B) Número de linfócitos CD3<sup>+</sup>. (C) Número de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. (D) Número de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. (E) Intensidade média de fluorescência de CD28 dentre a população de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. (F) Intensidade média de fluorescência de CD28 dentre a população de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. (G) Número de linfócitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. (H) Intensidade média de fluorescência de Foxp3 dentre a população de linfócitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. N=5 para todos os grupos. Anova de duas vias com Pos-teste de Bonferroni foi utilizado em análise de multiplas comparações para entrontrar diferenças (P<0,05) entre os grupos.\*representa nível de significancia de P.

#### 4.6.1. Anandamida interfere na adesão das células nos vasos mesentéricos

A microscopia intravital foi realizada com os camundongos BALB/c que receberam transplante alogênico de doadores C57BL/6-GFP<sup>+</sup>. Os animais foram anestesiados e mantidos em posição lateral supina em placa quente (37°C). O mesentério foi externalizado através de incisão medial no abdome (Figura 23 – A). Em relação ao número de células em rolamento durante o teste, não houve

diferença entre o grupo veículo e o grupo AEA ( $P= 0,2408$ ), entretanto o número de células aderidas ao vaso foi reduzido no grupo AEA quando comparado ao veículo ( $P= 0,0098$ ) (Figura 23 - B – C).

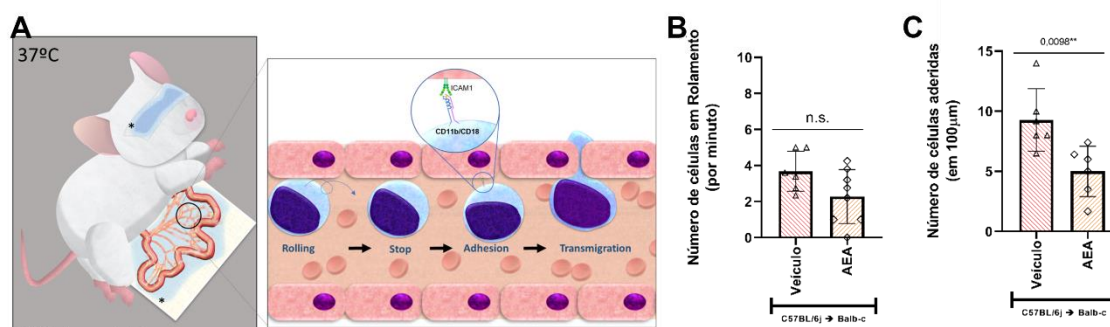


Figura 23. Análise de Rolamento e Adesão através de microscopia intravital. (A) Ilustração do ensaio de microscopia intravital. O animal é anestesiado e posicionado em placa quente (37°C). É realizada uma incisão medial no abdome e peritônio expondo o mesentério. Os vasos mesentéricos são cuidadosamente abertos e irrigados com PBS1x, permitindo a visualização do rolamento e adeão das células em tempo real. (B) Número de células em rolamento durante um minuto. (C) Número de células aderidas em 100µm de vaso. N=5 para todos os grupos. Anova de duas vias com Pos-teste de Bonferroni foi utilizado em análise de multiplas comparações para entrontrar diferenças ( $P<0,05$ ) entre os grupos.\*representa nível de significancia de P.

Ao contrário de  $CB_1$ , o receptor  $CB_2$  está presente em diversas células do sistema imune, inclusive em linfócitos (ROBINSON *et al.*, 2015). Desta forma, avaliamos se o receptor  $CB_2$  estaria envolvido na redução da adesão de células nos vasos mesentéricos através do tratamento com AEA. Os animais foram então tratados com AEA ou veículo uma hora antes do experimento; e o antagonista  $CB_2$  (AM630) foi administrado duas horas antes do procedimento. Não foram observadas diferenças entre os grupos em relação ao rolamento das células (Figura 24 – A). Em relação às células em adesão, observou-se que o antagonista sozinho não levou a alterações quando comparado ao veículo ( $P>0,999$ ). O grupo tratado com AEA apresentou redução no número de células aderidas quando comparado com veículo ( $P<0,0001$ ) e também com o antagonista sozinho ( $P<0,0001$ ). Entretanto, o tratamento prévio com o antagonista do receptor  $CB_2$  aboliu o efeito de redução na adesão ocasionado por AEA, de forma que este grupo apresentou maior quantidade de células

aderidas quando comparado à AEA ( $P=0,0035$ ), não sendo diferente do veículo ( $P=0,548$ ) ou do grupo que recebeu apenas o antagonista ( $P=0,477$ ) (Figura 24 -B).

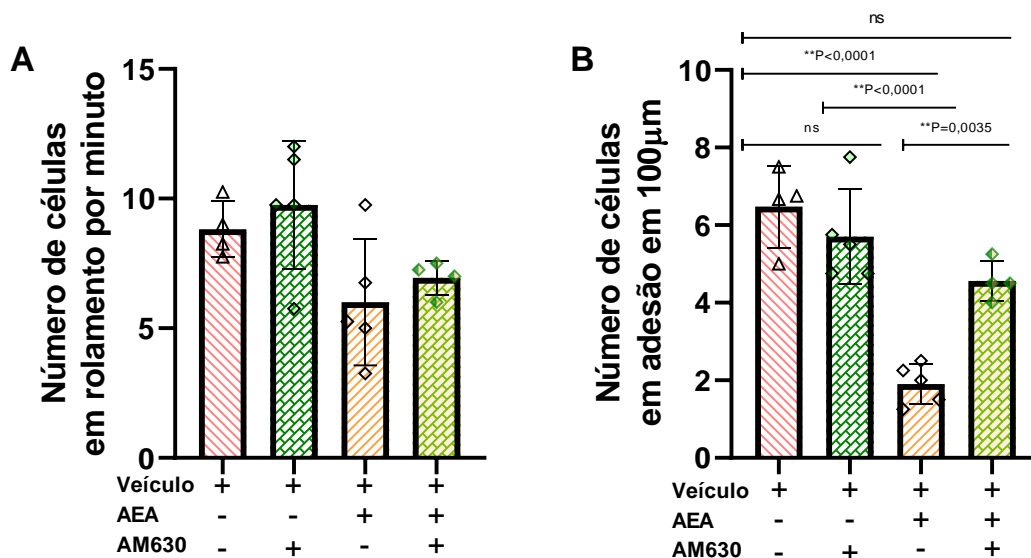


Figura 24. Participação do receptor canabinóide do tipo 2 na adesão celular. (A) Número de células em rolamento durante um minuto em animais tratados com veículo, AM630, AEA ou AM630+AEA. (B) Número de células aderidas em 100 $\mu$ m de vaso em animais tratados com veículo, AM630, AEA ou AM630+AEA. N=5 para todos os grupos. Anova de duas vias com Pos-teste de Bonferroni foi utilizado em análise de multiplas comparações para entrontrar diferenças ( $P < 0,05$ ) entre os grupos. \*representa nível de significancia de P.

Para que ocorra a adesão ao vaso, moléculas como as integrinas são essenciais (LO *et al.*, 1991). Uma destas integrinas é a MAC-1 $\alpha$ , sendo composta de um dímero CD11b/CD18 (LAWSON; WOLF, 2009), desta forma, avaliamos a expressão desta CR3 através de CD11b, no intestino, e observamos redução da intensidade média de fluorescência desta molécula em células CD3<sup>+</sup> ( $P=0,0181$ ) (Figura 25 - A) , CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ( $P=0,0044$ ) (Figura 25 - B), e em CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ( $P=0,0310$ ) (Figura 25 - C) no grupo AEA em relação ao grupo veículo.

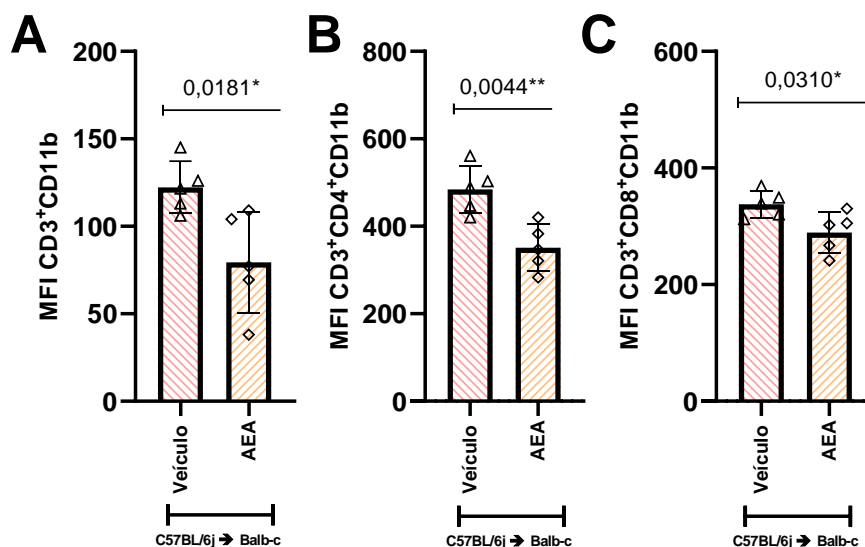


Figura 25. Intensidade média de fluorescência de CD11b em linfócitos. (A) MFI de CD11b em células CD3<sup>+</sup>. (B) MFI de CD11b em células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. (C) MFI de CD11b em células CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. N=5 para todos os grupos. Anova de duas vias com Pos-teste de Bonferroni foi utilizado em análise de múltiplas comparações para entrar diferenças ( $P < 0,05$ ) entre os grupos. \*representa nível de significância de P.

A fim de verificar se o efeito observado pela interação com o receptor CB<sub>2</sub> era decorrido de uma ligação do tipo agonista por parte do AEA decidimos tratar os animais com JWH133, um agonista sintético seletivo para o sítio ortostérico do receptor CB<sub>2</sub>. Desta forma os animais foram tratados com JWH133 ou veículo uma hora antes do procedimento e o tratamento com AM630 foi realizado duas horas antes do ensaio. Mais uma vez não foram encontradas alterações no rolamento das células comparando os grupos (Figura 26 – A). Quando observada a adesão celular, evidencia-se que não houve diferença entre o grupo veículo e o grupo tratado com AM630 ( $P > 0,9999$ ). O grupo tratado com JWH133 mimetizou o resultado obtido com o tratamento com AEA, levando à redução da adesão celular quando comparado com veículo ( $P = 0,0044$ ) e com AM630 ( $P = 0,0052$ ). Este efeito, por sua vez, foi abolido na presença do antagonista CB<sub>2</sub>, observado pela diferença entre JWH133 e AM630+JWH133 ( $P = 0,0024$ ) (Figura 26 -B)

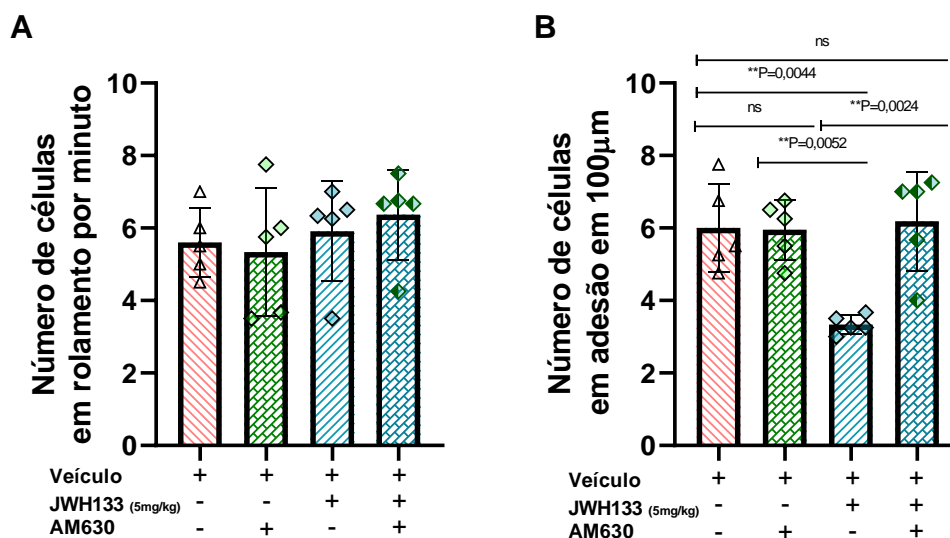


Figura 26. Análise dos efeitos do Agonista seletivo de CB<sub>2</sub> através de microscopia intravital. (A) Número de células em rolamento durante um minuto em animais tratados com veículo, AM630, JWH133 ou AM630+JWH133. (B) Número de células aderidas em 100µm de vaso em animais tratados com veículo, AM630, JWH133 ou AM630+JWH133. N=5 para todos os grupos. Anova de duas vias com Pos-teste de Bonferroni foi utilizado em análise de múltiplas comparações para entrar diferenças (P<0,05) entre os grupos.\*representa nível de significância de P.

#### 4.7. Efeitos do tratamento com AEA no fígado

O fígado representa outro órgão-alvo no processo inflamatório da GVHD, de forma que o trabalho de PANOSKALTSIS-MORTARI *et al.* (2004) indica que a progressão da doença neste órgão será tardia e possivelmente decorrente ao encontrado no intestino. Desta forma, não foram encontradas alterações significativas no escore histopatológico do fígado ao sétimo dia de doença, quando comparados o grupo veículo e tratado com AEA (P= 0,7624), entretanto ambos os grupos apresentaram diferença em relação ao grupo singênico (P<0,0001 em ambas as comparações) (Figura 27 - A-D). Não houve também alteração no nível das citocinas e quimiocinas analisadas (Figura 27 – E-J).

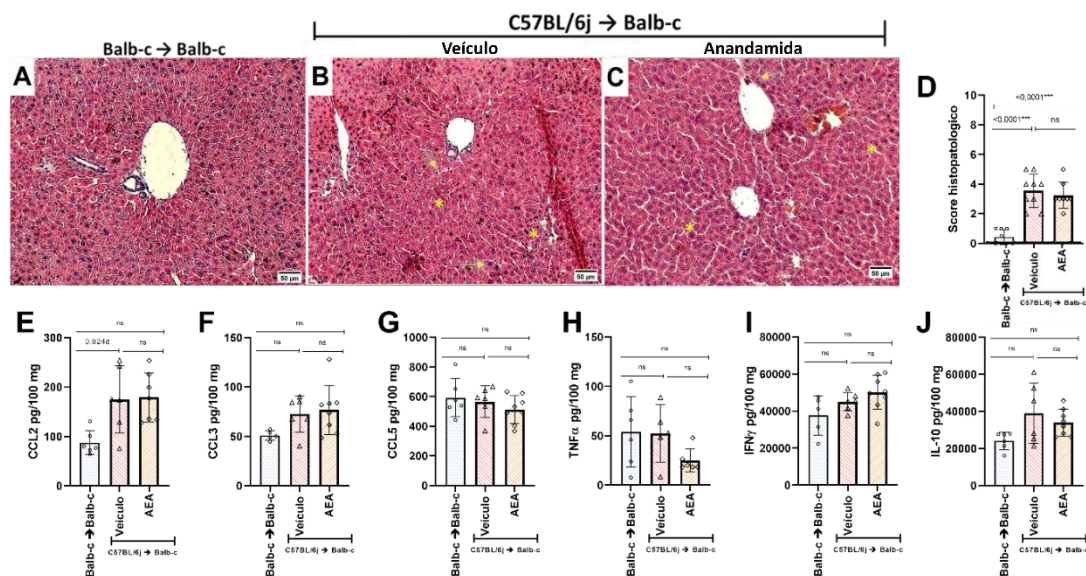


Figura 27. Análise de alterações no fígado. Análise histopatológica do (A) grupo singênico, (B) grupo veículo, (C) grupo AEA, representadas no gráfico de (D) score histopatológico. Através do ensaio de ELISA foram avaliadas as citocinas (E) CCL2, (F) CCL3, (G) CCL5; as quimiocinas (H) TNF $\alpha$ , (I) IFN $\gamma$ ; e a citocina anti-inflamatória (J) IL-10. N=5 para todos os grupos. Anova de duas vias com Pos-teste de Bonferroni foi utilizado em análise de multiplas comparações para entrontrar diferenças ( $P < 0,05$ ) entre os grupos. \*representa nível de significancia de P.

De forma similar, quando analisado o perfil linfocitário neste órgão, observou-se não haver diferença entre os grupos em relação ao número total de Linfócitos totais, CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, entretanto houve redução de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> no grupo AEA em relação ao veículo (Figura 28 – A-D), de forma que em relação à ativação das células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> não houve diferença entre os grupos AEA e veículo (Figura 28 – E-F). Ademais, não foi encontrada diferença entre os grupos em relação ao número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ou em relação ao MFI de FoxP3 em células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Figura 28 - G-H).

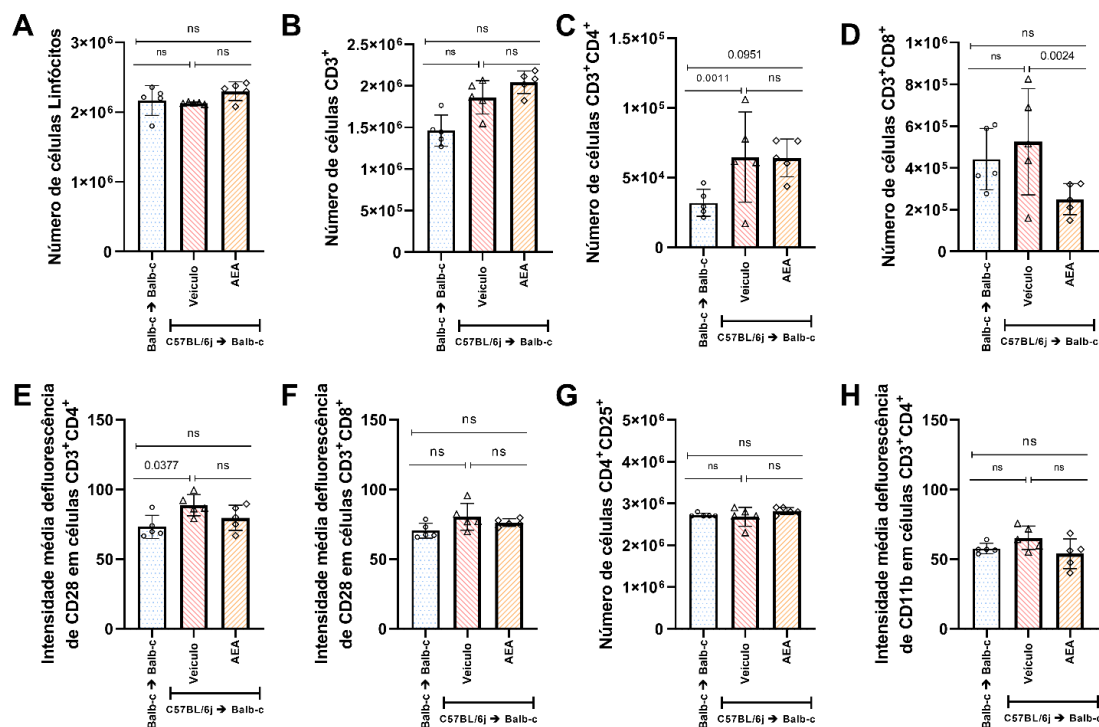


Figura 28. - Citometria de Fluxo de Fígado. (A) Número de Linfócitos. (B) Número de linfócitos CD3<sup>+</sup>. (C) Número de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. (D) Número de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. (E) Intensidade média de fluorescência de CD28 dentre a população de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. (F) Intensidade média de fluorescência de CD28 dentre a população de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. (G) Número de linfócitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. (H) Intensidade média de fluorescência de FoxP3 dentre a população de linfócitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. N=5 para todos os grupos. Anova de duas vias com Pos-teste de Bonferroni foi utilizado em análise de multiplas comparações para entrontrar diferenças (P<0,05) entre os grupos.\*representa nível de significancia de P.

#### 4.8. O aumento de sobrevida em consequência do tratamento com Anandamida é dependente de CB<sub>2</sub> e não CB<sub>1</sub>

Primeiramente, analisamos se os antagonistas dos receptores canabinóides CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, AM215 e AM630 respectivamente, alteravam a sobrevida dos animais com GVHD. Desta forma, durante o experimento de avaliação de sobrevida, não houve diferença em ambos os casos em relação ao grupo veículo (AM251 #P=0,1086; AM630 #P=0,4417), da mesma forma, ambos os antagonistas não foram capazes de reduzir a mortalidade em relação ao grupo singênico (AM251 \*P=0,0494; AM630 \*P=0,0158) (Figura 29 - A e B). Por fim,

em ambos os casos o grupo veículo teve mortalidade superior àquela do grupo singênico.

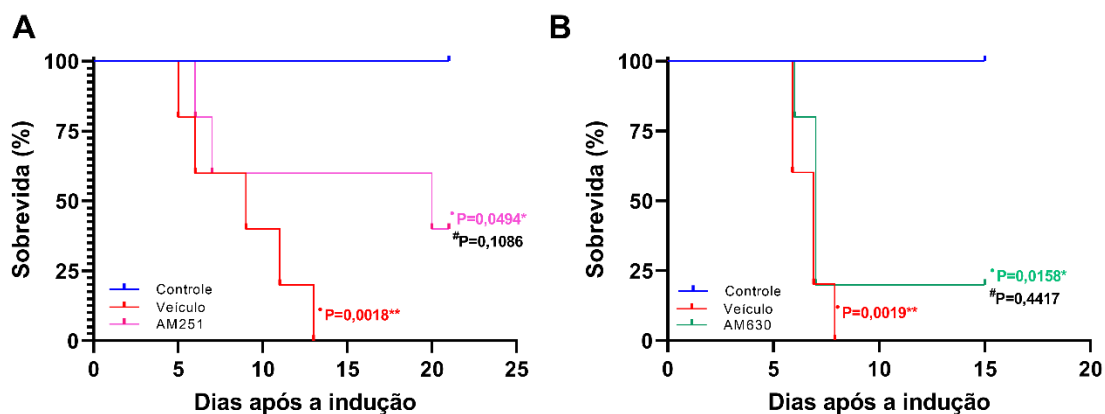


Figura 29 - Antagonistas dos receptores canabinóides na doença. (A) Análise de sobrevida de animais singênicos e animais tratados com veículo ou antagonista do receptor canabinóide do tipo 1 (CB<sub>1</sub>) – AM251. (B) Análise de sobrevida de animais singênicos e animais tratados com veículo ou antagonista do receptor canabinóide do tipo 2 (CB<sub>2</sub>) – AM630. N=10 para todos os grupos. A sobrevida foi verificada através do teste de Log-rank (Mantel-Cox), sendo os grupos considerados diferentes para  $P < 0,05$ . \* representa a comparação com o grupo singênico e # com grupo veículo.

Sendo assim, analisamos se a injeção destes antagonistas uma hora antes do tratamento com AEA interferia na sobrevida promovida por este endocanabinóide. Desta forma, o grupo que recebeu apenas AEA não apresentou sobrevida diferente do grupo singênico ( $P=0,1173$ ), porquanto esta mostrou-se diferente do grupo veículo ( $P=0,0443$ ). O grupo veículo apresentou diferença de sobrevida em relação ao grupo singênico ( $P=0,0035$ ). O grupo que recebeu AM251 e AEA não apresentou diferença em relação ao grupo singênico ( $P=0,784$ ), ao grupo AEA ( $P=0,7092$ ), ou ao grupo veículo ( $P=0,0527$ ). Por sua vez, os animais que receberam AM630 e AEA apresentaram sobrevida inferior aos grupos singênico ( $P=0,0045$ ) e AEA ( $P=0,0297$ ), não sendo, entretanto, diferente do grupo veículo ( $P=0,9470$ ) (Figura 25). Desta forma, o aumento da sobrevida decorrente do tratamento com AEA parece ser dependente de sua interação com os receptores CB<sub>2</sub>, sendo mantida na ausência de sua interação com os receptores CB<sub>1</sub>. É interessante observar que a constante de dissociação

(ki) deste endocanabinóide é de 89 e 371nM em relação aos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, respectivamente, ou seja, AEA apresenta maior afinidade *in vitro* por CB<sub>1</sub> que por CB<sub>2</sub> (REGGIO, 2010; ROSS *et al.*, 2001; SUGIURA *et al.*, 1995). Entretanto, em nosso modelo experimental, interações de caráter agonista com CB<sub>2</sub> parecem resultar em efeitos mais promissores no aumento de sobrevida (Figura 30).

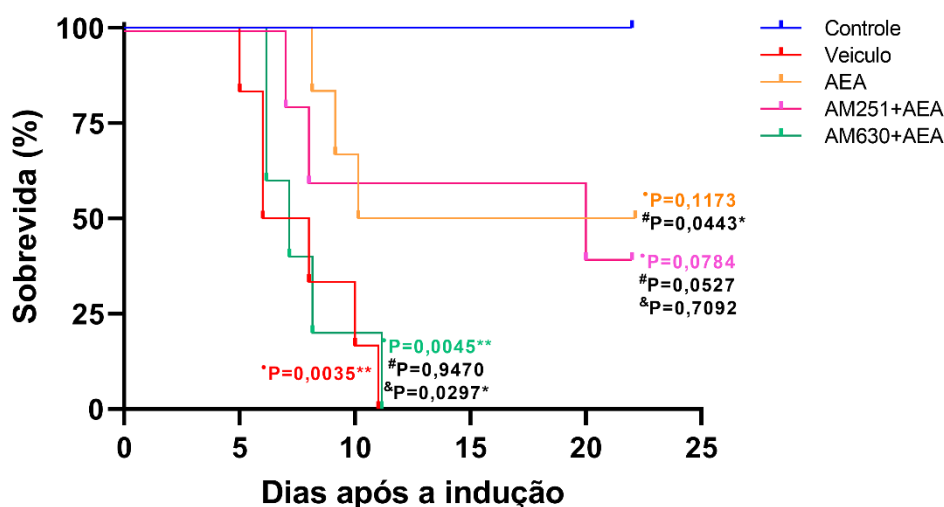


Figura 30 - Ação de Anandamida em receptores canabinóides. Análise de sobrevivência de animais singênicos, ou alogênicos, tratados com veículo, AEA, AM251+AEA ou AM630+AEA. N=10 para todos os grupos. A sobrevivência foi verificada através do teste de Log-rank (Mantel-Cox), sendo os grupos considerados diferentes para  $P < 0,05$ . \* representa a comparação com o grupo singênico e # com grupo veículo.

Com base nos resultados encontrados em relação ao tratamento com AEA, decidimos investigar se o endocanabinóide Palmitoiletanolamida (PEA) possui também potencial no tratamento da GVHD. PEA é uma NAE, apresentando efeitos anti-inflamatório, anti-excitotóxico e anti-hiperalgésico (JAGGAR *et al.*, 1998; SKAPER *et al.*, 1996). Esta molécula está descrita como um agonista do receptor CB<sub>2</sub> (BISOGNO *et al.*, 1997), existindo de forma endógena e podendo, também, ser substrato da enzima FAAH (JIAN *et al.*, 2010). Alguns autores relatam que PEA poderia ser um análogo mais saturado da AEA (LAMBERT *et al.*, 2002). A fim de analisar o potencial deste fármaco tanto como ligante do

receptor CB<sub>2</sub> como sua similaridade com a AEA realizamos ensaio de ancoragem molecular e de similaridade entre estas moléculas.

#### 4.9. PEA apresenta potencial de ligação ao receptor CB<sub>2</sub>

Primeiramente, analisamos separadamente o modelamento de ancoragem do AEA (Tabela 5) e do PEA (Tabela 6) em suas formas de menor energia ao receptor CB<sub>2</sub>. A forma de melhor classificação foi utilizada para a análise de interação molecular ao receptor. A minimização de energia somada ao refinamento por algoritmos de ancoragem permite a compreensão de que algumas conformações da molécula têm maior ou menor propensão de interagirem com o bolsão de ligação do receptor. Nas tabelas a seguir são analisadas as ligações lower e upper bound, sendo esta uma análise da localização das interações em relação à forma de melhor classificação. Observa-se também o número de ligações de hidrogênio realizadas pelas moléculas.

Tabela 5. Resultados de ancoragem de AEA. Foram analisadas as primeiras dez formas de melhor classificação de AEA. Os valores estão representados em Kcal mol<sup>-1</sup>.

Classificação	RMSD I.b.	RMSD u.b.	Nº de Ligações de H
<b>-8.8</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
-8.8	1.726	3.134	2
-8.6	2.158	4.260	1
-8.5	1.415	3.675	2
-8.5	4.11	8.112	0
-8.4	4.034	8.342	0
-8.4	2.779	5.895	1
-8.3	4.073	8.296	0
-8.2	4.041	8.057	1
-8.2	4.174	6.792	1

Tabela 6. Resultados de ancoragem de PEA. Foram analisadas as primeiras dez formas de melhor classificação de PEA. Os valores estão representados em Kcal mol<sup>-1</sup>.

Classificação	RMSD l.b.	RMSD u.b.	Nº de Ligações de H
<b>-7.6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
-7.5	4.576	7.42	0
-7.4	1.363	1.882	1
-7.3	4.817	7.524	0
-7.2	5.549	8.672	1
-7.1	4.206	6.532	0
-7.1	4.285	7.358	0
-7.1	4.009	6.740	1
-7.0	3.308	4.991	2
-7.0	3.367	6.090	0

Tendo como base de comparação a interação de AM12033 utilizado como controle positivo de ligação ao sítio ortostérico de CB<sub>2</sub>, observa-se que tanto AEA (Figura 31 – A-B) quanto PEA (Figura 31 - C-D) realizam ligações fortes do tipo de ligação de hidrogênio com a Leucina182. Ao analisar o receptor CB<sub>2</sub>, EL-ATAWNEH e GOLDBLUM (2022) encontraram 19 interações, de maioria hidrofóbica e de resíduos aromáticos, e ligações de hidrogênio, com Leucina182 e Serina285 (Figura 29 - E), evidenciando que estas duas moléculas apresentam papel-chave na ligação de outras moléculas ao sítio de ligação de CB<sub>2</sub>. A interação com Leucina182 ocorre tanto para AEA quanto para PEA, evidenciando seu potencial de ligação ao receptor CB<sub>2</sub>.

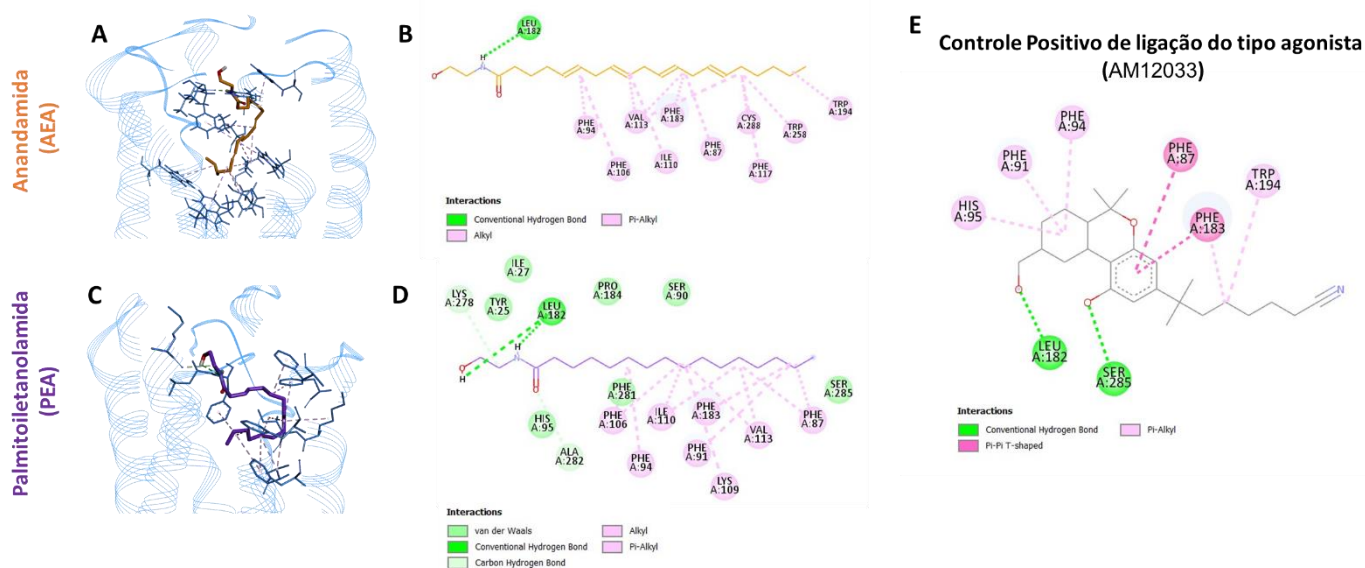


Figura 31. Ensaio de ancoragem molecular para comparação de ligação de AEA e PEA. (A) A forma molecular de AEA de menor energia e que recebeu maior classificação de ligação ao receptor está representada dentro do sítio de ligação de CB<sub>2</sub>. (B) A principal ligação estabelecida por AEA é com a Leucina182, além de realizar também ligações alquil e Pi-aquil com outras partes do sítio de ligação. (C) A forma molecular de PEA de menor energia e que recebeu maior classificação de ligação ao receptor está representada dentro do sítio de ligação de CB<sub>2</sub>. (D) A principal ligação estabelecida por PEA é com a Leucina182, além de realizar também ligações de Van der Waals, ligações de carbono e ligações alquil e Pi- alquil com outras partes do sítio de ligação. (E) AM12033 foi utilizado como controle positivo de ligação, observa-se sua interação principal com Leucina182 e Serina285, além de suas ligações Pi- alquil e Pi-Pi.

Para avaliar a similaridade entre as moléculas de AEA e PEA realizamos dois ensaios de sobreposição. O primeiro levou em conta apenas as formas obtidas pela minimização de energia, avaliando a variação de energia (Figura 32 - A) eletrostática e estérica (Figura 32 - B). Foi encontrado o valor de correlação de Person de  $R=0,99639$  para a energia eletrostática e de  $R=-0,99639$  para a estérica, em relação à similaridade entre as moléculas. Portanto, encontramos uma similaridade de 63% à 85% entre AEA e PEA, de forma que a energia prevalecente para esta similaridade foi a eletrostática, ou seja, a cabeça polar de ambos os fármacos é a porção de maior similaridade.

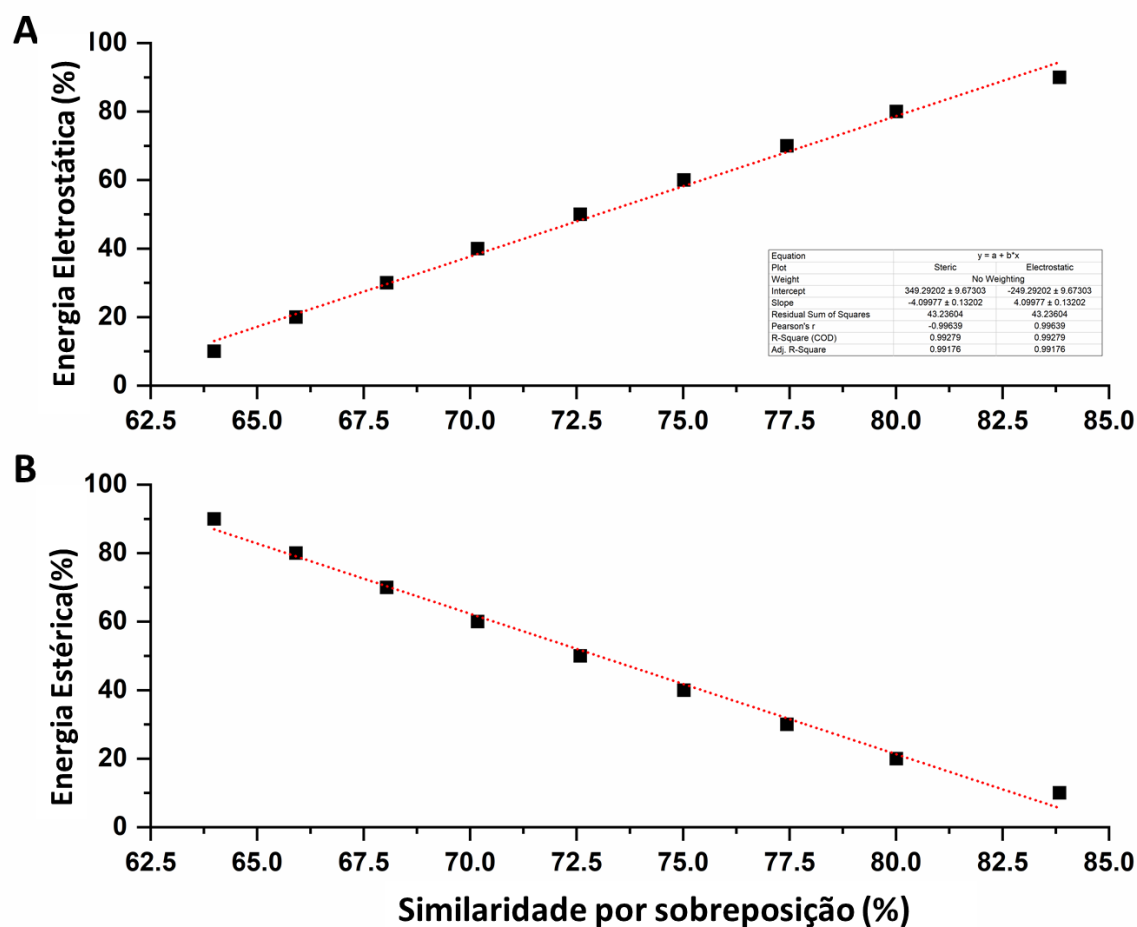


Figura 32. Ensaio de sobreposição. (A) Análise de similaridade com aumento linear da energia eletrostática. (B) Análise de similaridade com redução linear da energia estérica.

Em seguida esta análise foi repetida com as formas de maior classificação de ancoragem, ou seja, avaliamos a similaridade de AEA e PEA uma vez que estes se ligam ao receptor e tem sua conformação alterada de acordo com as interações que ocorrem no bolsão de ligação de CB<sub>2</sub>. Esta análise é importante pois similaridades de ancoragem e de conformação ao ligar-se ao receptor podem sugerir efeitos similares de ativação. Desta forma, foi encontrada similaridade de 82-93% entre as moléculas, sendo esta proporcional ao crescimento linear da contribuição da energia eletrostática (Figura 33 - A), correlação de Person  $R=0,99821$ ; e inversamente proporcional à predominância

da contribuição da energia estérica (Figura 33 – B), coeficiente de correlação de Person  $R=-0,99821$ .

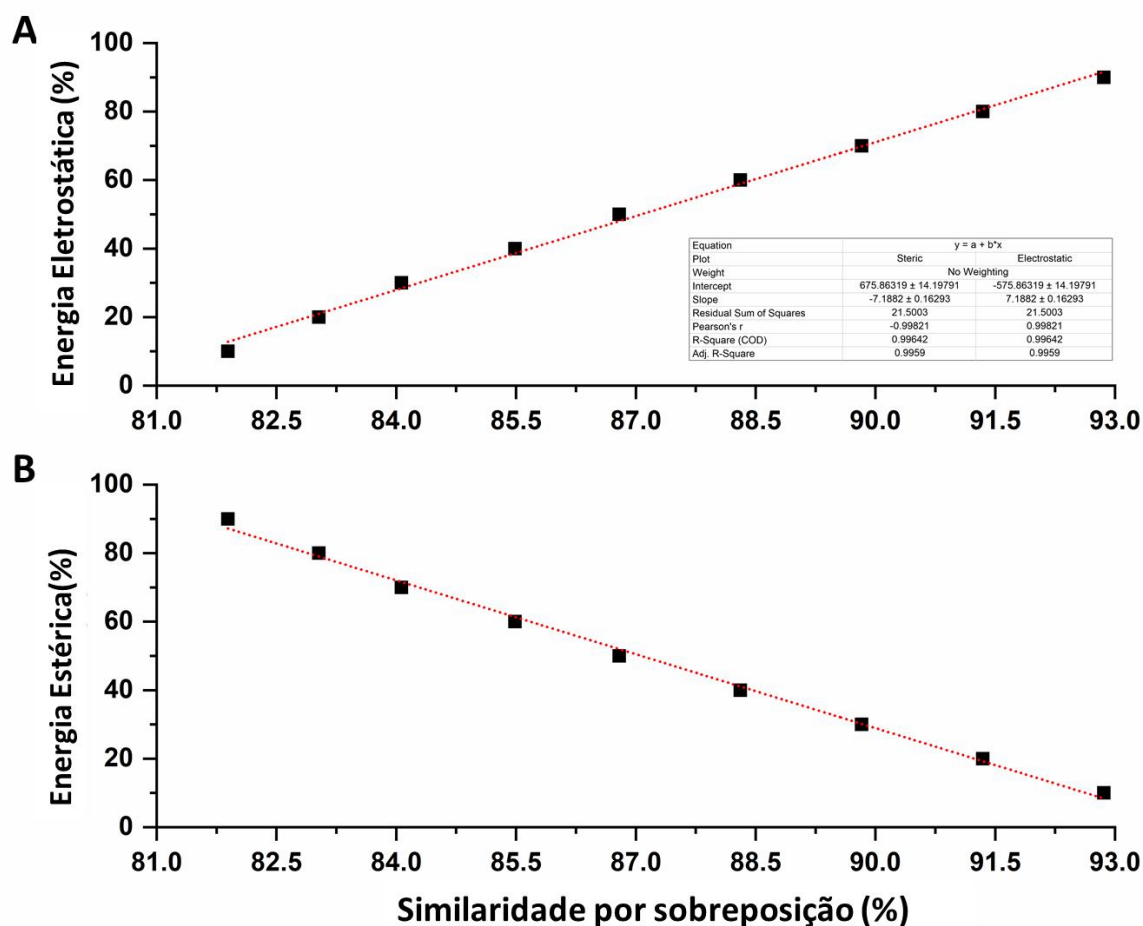


Figura 33. Ensaio de sobreposição após minimização energética e refinamento por algoritmos de ancoragem molecular. (A) Análise de similaridade com aumento linear da energia eletrostática. (B) Análise de similaridade com redução linear da energia estérica.

Desta forma, concluímos que há potencial de ligação entre PEA e CB<sub>2</sub> e que existe alto grau de similaridade entre estas moléculas, tornando-se interessante a investigação de PEA como alternativa à AEA. Ademais, moléculas saturadas não apresentam isomeria CIS-TRANS e retém a capacidade de compactação (ADEVA-ANDANY *et al.*, 2019).

#### **4.10. PEA aumenta a sobrevida e melhora parâmetros clínicos de animais com GVHD**

Inicialmente testamos três doses de PEA, nas concentrações de 1, 5 e 10 mg/kg. A dose de 5mg/kg se mostrou mais eficaz, levando à sobrevida de 76%, aumentando a sobrevida em relação ao grupo veículo ( $P= 0,0087$ ), não sendo diferente do grupo singênico ( $P=0,3173$ ). PEA 10mg/kg levou a uma sobrevida de 40%, não sendo diferente do grupo veículo ( $P= 0,3173$ ) mas diferindo do grupo singênico ( $P=0,0486$ ). Por fim, PEA 1mg/kg não gerou diferença em relação ao grupo veículo ( $P=0,3116$ ), levando à sobrevida de 20%, sendo diferente do grupo singênico ( $P=0,0133$ ) (Figura 34 – A).

Em relação à escala clínica os grupos 1mg/kg e 5mg/kg apresentaram diferença em relação ao grupo veículo ao 6º e 14º dias de experimento. Entretanto, não foram observadas reduções significativas em relação aos parâmetros clínicos dos animais nos demais dias dentre os grupos PEA quando comparados ao veículo (Figura 34 – B). Os tratamentos não foram eficazes em prevenir a perda de peso quando comparado ao grupo veículo (Figura 34 - C).

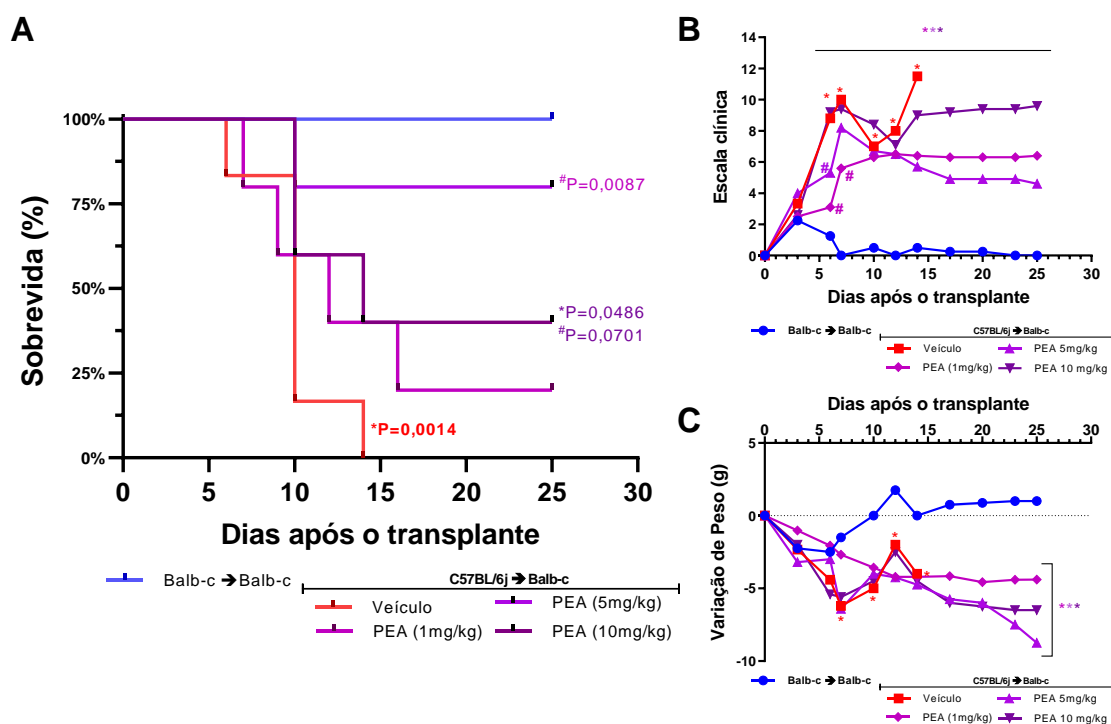


Figura 34. Tratamento com PEA. Animais que receberam transplante alogênico foram tratados com Veículo ou PEA, nas concentrações de 1mg/kg, 5 mg/kg, 10mg/kg. (A) Efeito dos tratamentos na sobrevivência. (B) Escala clínica. (C) Variação de peso em gramas. N=5 para todos os grupos. A sobrevivência foi verificada através do teste de Log-rank (Mantel-Cox), sendo os grupos considerados diferentes para  $P < 0,05$ . \* representa a comparação com o grupo singênico e # com grupo veículo. Anova de duas vias com Pos-teste de Bonferroni foi utilizado em análise de múltiplas comparações para entrar diferenças nos testes de escala clínica e variação de peso ( $P < 0,05$ ) entre os grupos. \*representa nível de significância de P.

Com base nos resultados encontrados, decidimos continuar os protocolos que seguem com a dose de 5mg/kg de PEA, uma vez que esta dose levou a um maior aumento na sobrevivência com redução pontual de score clínico.

#### 4.11. O perfil linfocitário no baço e enxertamento após tratamento com PEA

No baço não foram observadas alterações no número total de linfócitos ou monócitos (Figura 35 – A-C), porquanto houve aumento no número de granulócitos do grupo veículo em relação ao grupo singênico. Houve aumento

no número de células CD3<sup>+</sup> em ambos os grupos que receberam transplante alogênico quando comparados ao grupo singênico (veículo P=0,005; PEA P=0,0144) e isso se repetiu em relação às células CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (veículo P=0,0065; PEA P=0,0075), entretanto não houve diferença em relação ao número de CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> entre os grupos (Figura 35 – D-F). Em relação à ativação, as células CD4<sup>+</sup> encontravam-se mais ativadas nos grupos que receberam transplante alogênico (veículo P=0,0091; PEA P=0,0012), sendo o mesmo encontrado em relação às células CD8<sup>+</sup> (veículo P=0,0011; PEA P<0,0001) (Figura 35 – G-H). Ao investigar o MFI de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3, observou-se que o grupo veículo apresenta uma redução na expressão desta molécula quando comparado ao grupo singênico (P=0,0071), não havendo diferença em relação ao grupo PEA (Figura 35 – I-J). Esses resultados são corroborados por dados de enxertamento no baço (Figura 35 – K) e na medula (Figura 35 – L) em que não houve diferença na porcentagem de enxertamento entre PEA e veículo.

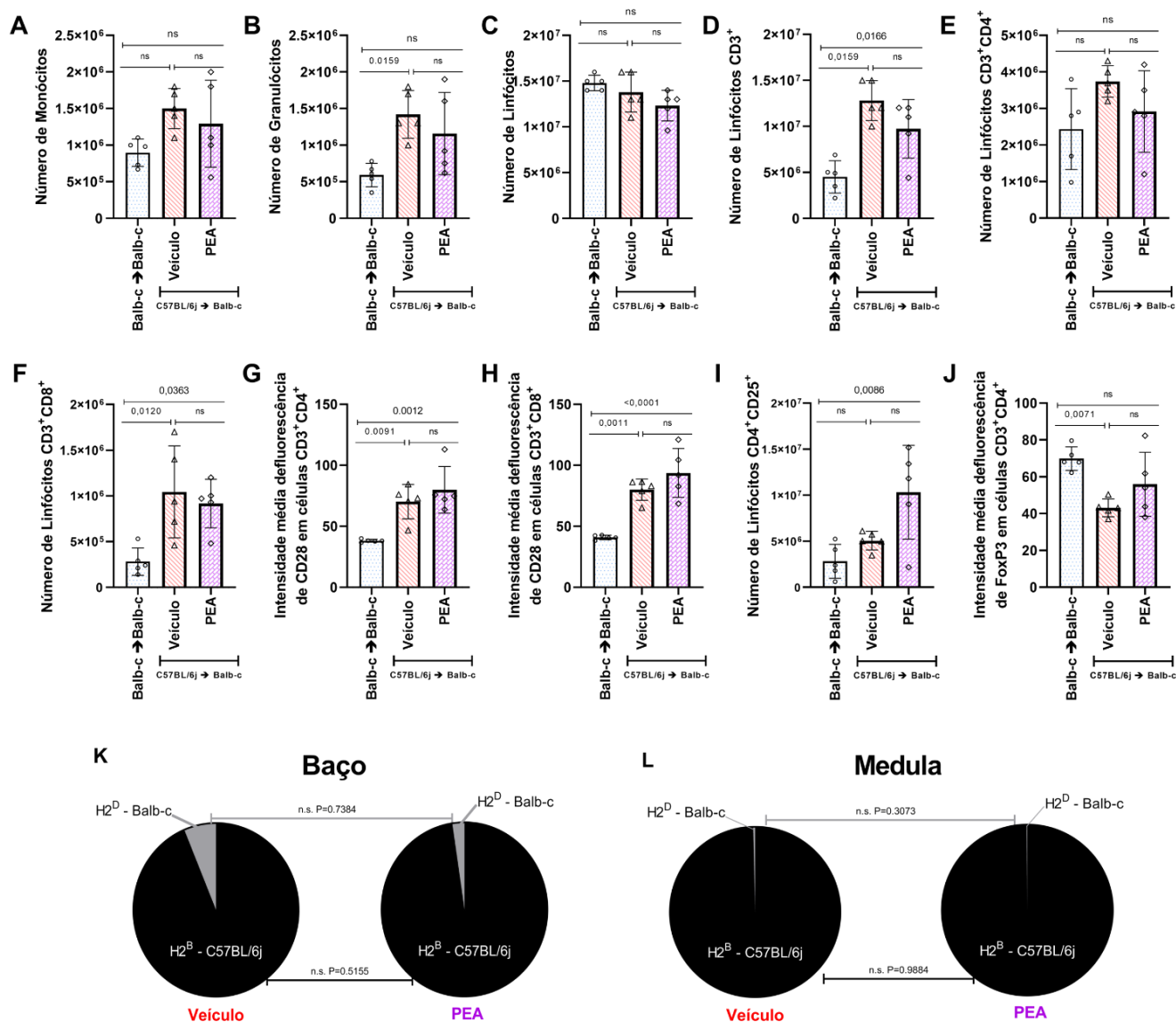


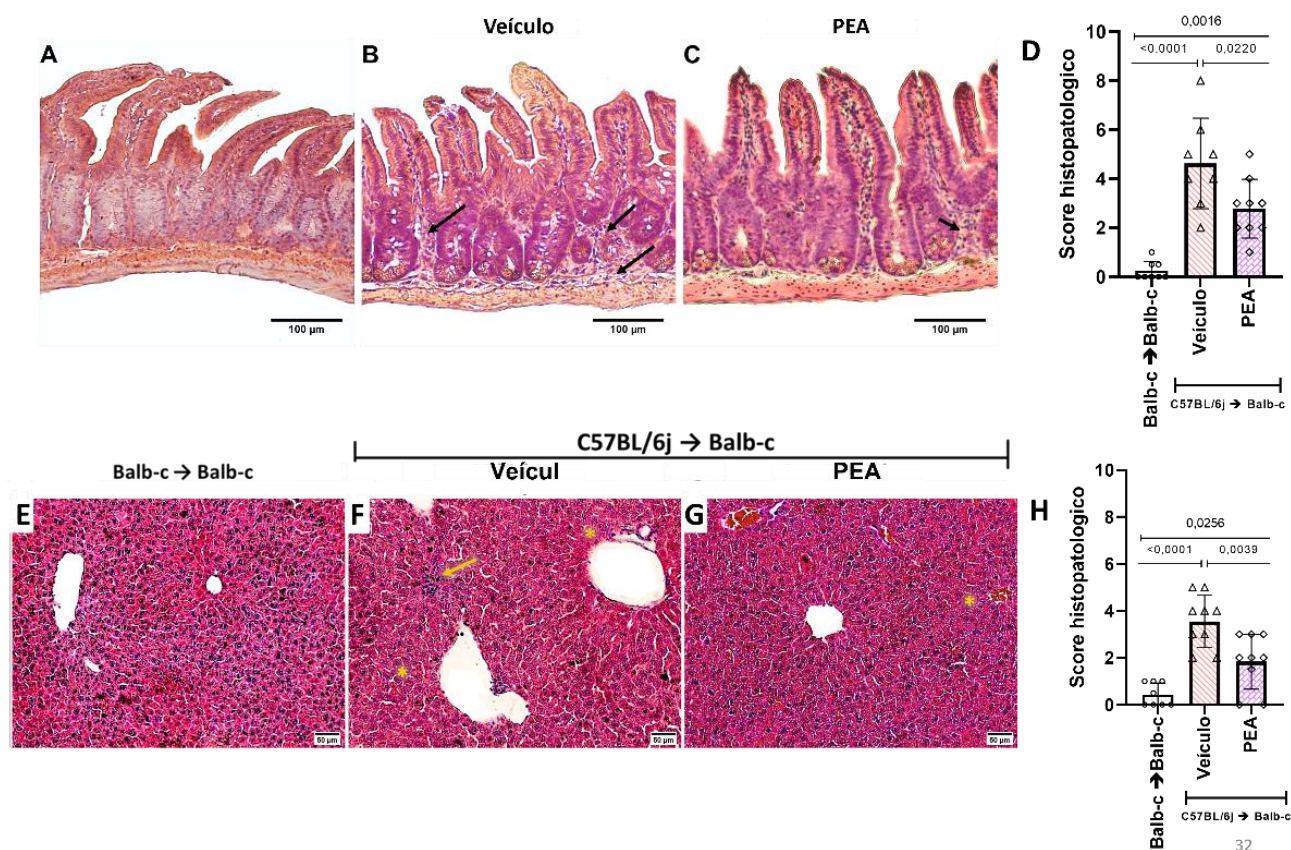
Figura 35. Citometria de fluxo de baço. (A) Número de monócitos. (B) Número de granulócitos. (C) Número de Linfócitos. (D) Número de linfócitos CD3<sup>+</sup>. (E) Número de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. (F) Número de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. (G) Intensidade média de fluorescência de CD28 dentro a população de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. (H) Intensidade média de fluorescência de CD28 dentro a população de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. (I) Número de linfócitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. (J) Intensidade média de fluorescência de FoxP3 dentro a população de linfócitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. (K) Porcentagem de enxertamento analisada no baço de animais que receberam transplante alogênico, após 7 dias do transplante. (L) Porcentagem de enxertamento analisada na medula de animais que receberam transplante alogênico, após 7 dias do transplante. N=5 para todos os grupos. Anova de duas vias com Pos-teste de Bonferroni foi utilizado em análise de multiplas comparações

para entrontrar diferenças ( $P < 0,05$ ) entre os grupos.\*representa nível de significancia de P. O teste T de student, bicaudal, parametrico e não-pareado foi utilizado na comparação entre os grupos para o teste de enxertameto, os grupos foram considerados diferentes para  $P < 0,05$ .

#### 4.12. O tratamento com PEA protege fígado e intestino

Através da análise histopatológica foi possível identificar redução do infiltrado inflamatório e maior preservação da arquitetura intestinal do grupo tratado com PEA quando comparado ao grupo veículo ( $P = 0,0220$ ), entretanto tanto PEA quanto veículo foram diferentes do grupo singênico ( $P = 0,0016$  e  $P < 0,0001$ , respectivamente) (Figura 36 - A-D). Os achados no fígado seguem este mesmo padrão, de forma que PEA apresentou menor escore geral quando comparado ao grupo veículo ( $P = 0,0039$ ), sendo que PEA e veículo se mostraram diferentes do grupo singênico ( $P = 0,0256$  e  $P < 0,0001$ , respectivamente) (Figura 36 - E-H).

Figura 36. Análise Histopatológica dos órgãos-alvo. Imagens representativas de



intestino coradas com H&E dos grupos (A) singênico, (B) veículo, (C) PEA, (D) score

histopatológico das alterações encontradas. Imagens representativas de fígado coradas com H&E dos grupos (E) singênico, (F) veículo, (G) PEA, (H) score histopatológico das alterações encontradas. N=8 ou 9 para os os grupos. Anova de duas vias com Pos-teste de Bonferroni foi utilizado em análise de multiplas comparações para entrar diferenças ( $P < 0,05$ ) entre os grupos.\*representa nível de significancia de P.

#### **4.13. PEA não altera o perfil linfocitário do fígado**

Em relação ao perfil linfocitário do fígado, não houve alteração nos números de células CD3<sup>+</sup> ou CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, ou em relação à expressão de FoxP3, de forma que a ativação das células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> no grupo PEA encontrava-se aumentada em relação ao grupo singênico ( $P=0,0167$ ), não havendo diferença em relação ao grupo veículo ( $P=0,6084$ ) ou deste para com o grupo controle ( $P=0,1981$ ), houve redução no número de células CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> no grupo PEA em relação ao grupo veículo ( $P=0,0083$ ) mas não houve alteração em sua ativação (Figura 37 – A-F). Ademais não foram encontradas alterações nas populações de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e FoxP3 (Figura 37 G-H).

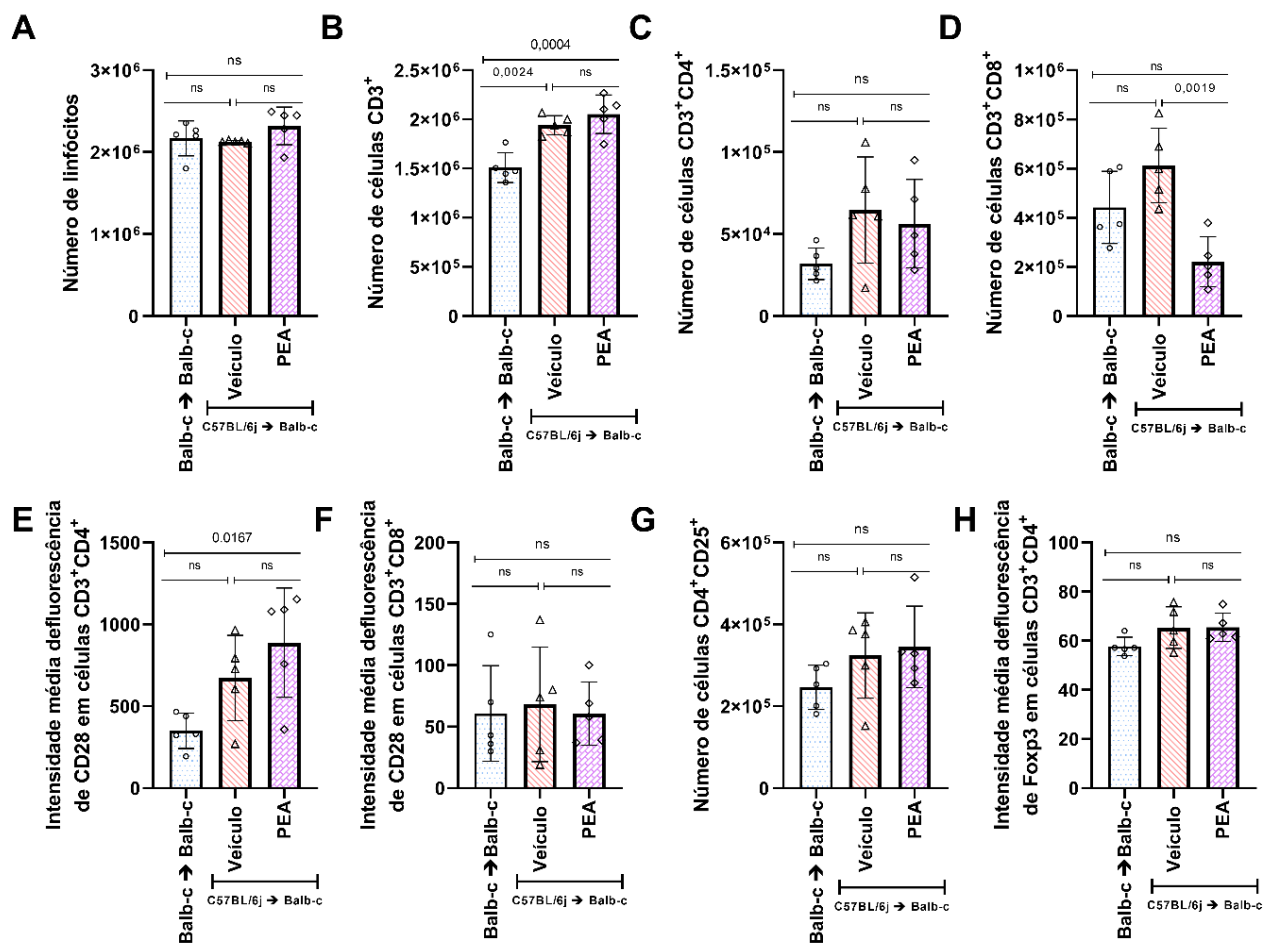


Figura 37. Citometria de fluxo de fígado. (A) Número de Linfócitos. (B) Número de linfócitos CD3<sup>+</sup>. (C) Número de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. (D) Número de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. (E) Intensidade média de fluorescência de CD28 dentre a população de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. (F) Intensidade média de fluorescência de CD28 dentre a população de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. (G) Número de linfócitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. (H) Intensidade média de fluorescência de FoxP3 dentre a população de linfócitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. N=5 para todos os grupos. Anova de duas vias com Pos-teste de Bonferroni foi utilizado em análise de multiplas comparações para entrontrar diferenças (P<0,05) entre os grupos.\*representa nível de significancia de P.

#### 4.14. Efeito do tratamento com PEA no perfil linfocitário do intestino

Por fim, analisamos o principal órgão-alvo da GVHD, o intestino. Não houve alteração em relação ao número total de linfócitos, de células CD3<sup>+</sup> (Figura 38 – A-B). Houve aumento no número de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> no grupo veículo quando comparado ao grupo singênico ( $P=0,0306$ ), havendo diferença do grupo veículo para o grupo PEA ( $P<0,0001$ ), não havendo diferença deste para o grupo singênico ( $P=0,0629$ ) (Figura 38 – C). Houve aumento no número de células CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> no grupo veículo quando comparado ao grupo singênico ( $P= 0,0086$ ), havendo redução destas células no grupo PEA quando comparado ao veículo ( $P= 0,0104$ ), não sendo PEA diferente do grupo singênico (Figura 38 - D). Em relação à ativação celular, houve redução da ativação das células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> no grupo PEA quando comparado ao grupo veículo ( $P=0,0056$  e  $P=0,0258$ , respectivamente), não havendo diferença em relação ao grupo singênico ( $P>0,9999$  em ambos os casos), desta mesma forma, o grupo veículo mostrou-se diferente do grupo singênico ( $P=0,0022$  e  $P=0,0206$ ) (Figura 38 - E-F). Já em relação à intensidade média de fluorescência de FoxP3 em células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (Figura 38 – G e H).

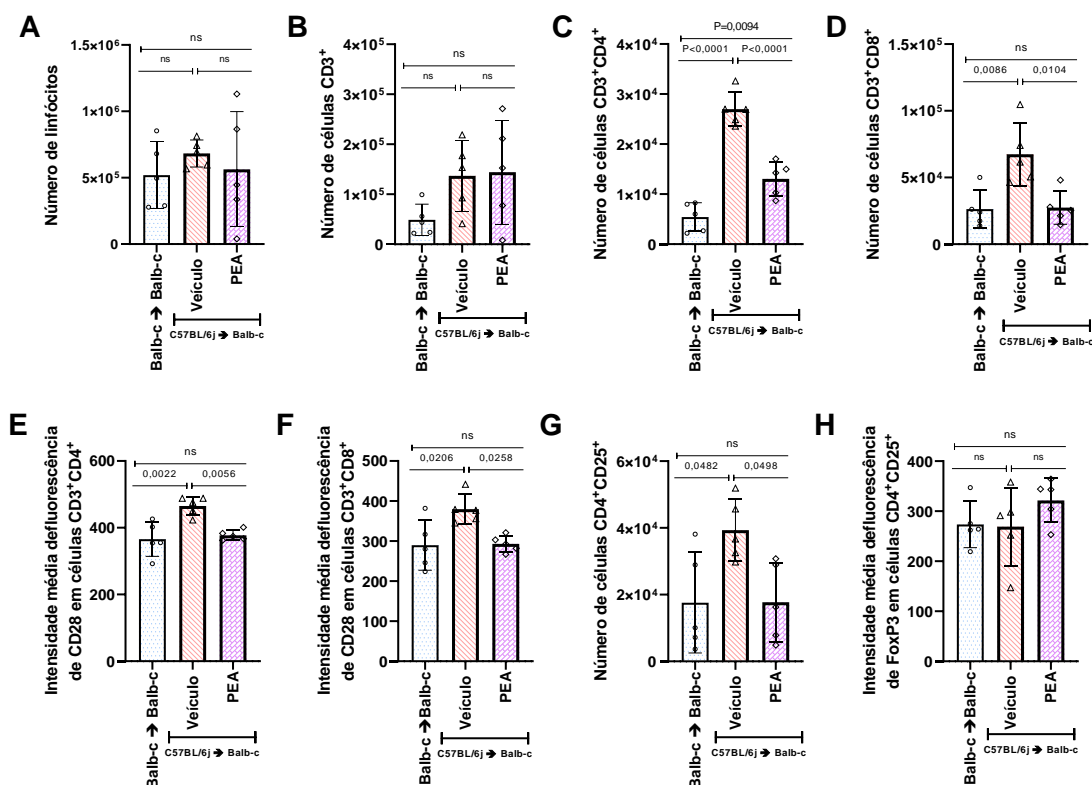


Figura 38. Citometria de fluxo de intestino. (A) Número de Linfócitos. (B) Número de linfócitos CD3<sup>+</sup>. (C) Número de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. (D) Número de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. (E) Intensidade média de fluorescência de CD28 dentro a população de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. (F) Intensidade média de fluorescência de CD28 dentro a população de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. (G) Número de linfócitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. (H) Intensidade média de fluorescência de FoxP3 dentro a população de linfócitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. N=5 para todos os grupos. Anova de duas vias com Pos-teste de Bonferroni foi utilizado em análise de multiplas comparações para entrontrar diferenças (P<0,05) entre os grupos.\*representa nível de significancia de P.

#### 4.15. Análise de Rolamento e Adesão em vasos mesentéricos

Ao sétimo dia os animais foram tratados com PEA uma hora antes do ensaio, sendo anestesiados imediatamente antes do início do procedimento cirúrgico para visualização dos vasos mesentéricos. O tratamento com PEA levou à redução do rolamento das células GFP+ nos vasos mesentéricos quando comparado ao grupo veículo (P=0,0103) (Figura 39 - A). PEA interferiu também no processo de adesão celular quando comparado ao grupo veículo (P=0,0170) (Figura 39 - B) Ao verificar a expressão de CD11b observamos que houve

alteração nas populações  $CD3^+CD4^+$  e  $CD3^+CD8^+$  ( $P=0,0257$  e  $P=0,0420$ , respectivamente) (Figura 39 - C-E).

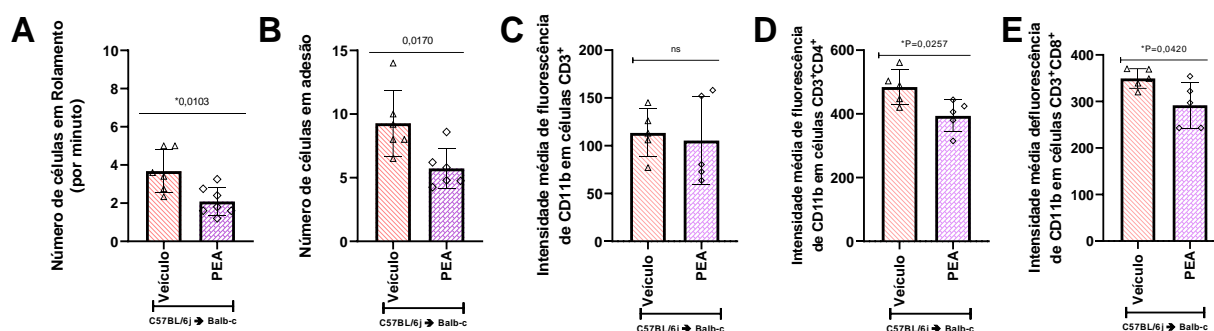


Figura 39. Análise em microscopia intravital dos efeitos de PEA. (A) Avaliação de rolamento das células durante um minuto. (B) Número de células aderidas em 100 $\mu$ m de vaso. (C) MFI de CD11b em células CD3<sup>+</sup>. (D) MFI de CD11b em células CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>. (E) MFI de CD11b em células CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>. N=5 para todos os grupos. Anova de duas vias com Pos-teste de Bonferroni foi utilizado em análise de multiplas comparações para entrontrar diferenças ( $P<0,05$ ) entre os grupos.\*representa nível de significancia de P.

Tendo em vista que PEA levou à redução não apenas da adesão, mas também do rolamento celular decidimos investigar CD62L, uma selectina, responsável pelo rolamento de leucócitos. De maneira muito interessante, esta selectina não estava alterada em animais tratados com AEA (Figura 40 – A-B), mas em animais tratados com PEA houve redução de CD62L em células  $CD3^+CD4^+$  e  $CD3^+CD8^+$  em comparação com o grupo que recebeu veículo ( $P=0,0237$  e  $P=0,0056$ , respectivamente) (Figura 40 – C-D).

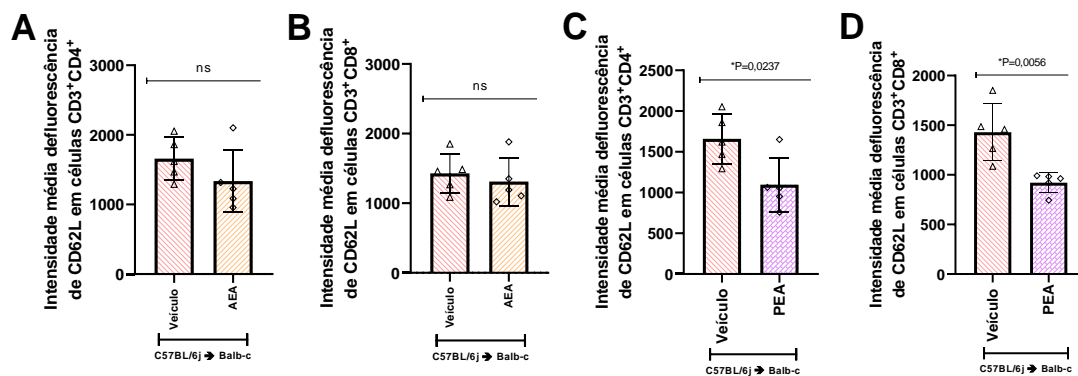


Figura 40. Expressão de CD62L em linfócitos CD4 e CD8 após tratamento com NAEs. Primeiramente observa-se a expressão de CD62L em células de animais tratados com AEA. (A) MFI de CD62L em células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e (B) MFI de CD62L em células CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Em seguida observa-se a expressão dessa molécula em células de animais tratados com PEA (C) MFI de CD62L em células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e (D) MFI de CD62L em células CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. N=5 para todos os grupos. Anova de duas vias com Pos-teste de Bonferroni foi utilizado em análise de multiplas comparações para entrontrar diferenças (P<0,05) entre os grupos.\*representa nível de significancia de P.

#### 4.16. O efeito do tratamento com PEA em citocinas e quimiocinas

Em relação às citocinas e quimiocinas avaliadas no fígado, a única alteração observada foi no aumento na concentração de CCL2 do grupo PEA em relação ao grupo singênico (P=0,0053), não sendo diferente do grupo veículo (P>0,9999), porquanto o grupo veículo mostrou-se também diferente do grupo singênico (P=0,0470) (Figura 41 - A-F). No intestino este mesmo padrão de resposta pôde ser observado em relação à CCL2, CCL3 e IFN $\gamma$ , de forma que foi encontrada diferença do grupo PEA quando comparado ao grupo singênico (P=0,0007; P=0,0016; e P=0,0371), mas não em relação ao grupo veículo (P>0,9999; P>0,9999; e P=0,6215); sendo o grupo veículo, por sua vez, diferente do grupo singênico nas citocinas, mas não para a quimiocinas INF $\gamma$  (P=0,0024; P=0,0077; e P=0,4669), entretanto, houve aumento na concentração de IL-10 no grupo tratado com PEA em relação ao veículo (P= 0,0059), sendo também diferente do grupo singênico (P= 0,0022) (Figura 41 - G-L).

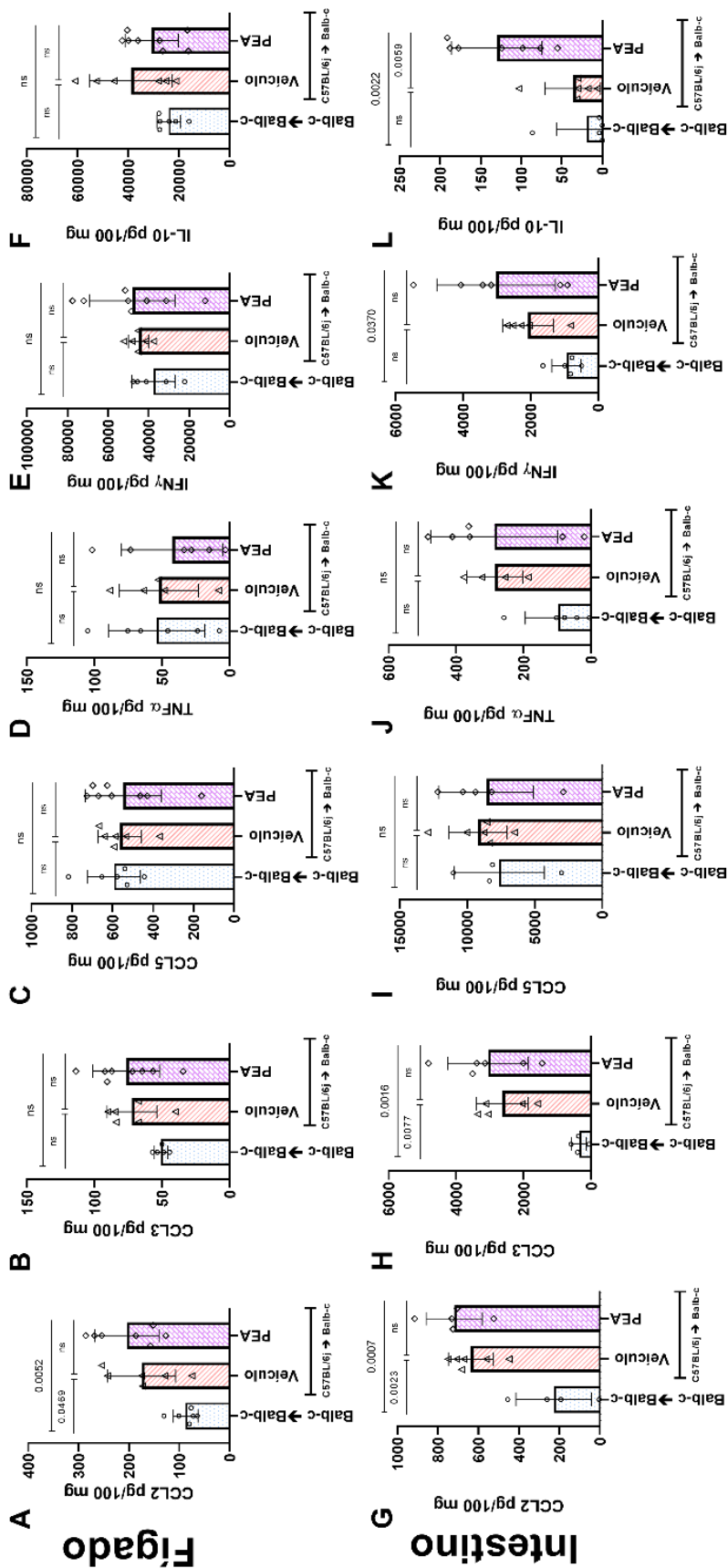


Figura 41. Análise de citocinas e quimiocinas através de ELISA. No fígado foram avaliadas (A) CCL2, (B) CCL3, (C) CCL5, (D) TNF $\alpha$ , (E) IFN $\gamma$ , (F) IL-10. No intestino também foram avaliadas (G) CCL2, (H) CCL3, (I) CCL5, (J) TNF $\alpha$ , (K) IFN $\gamma$ , (L) IL-10. N=5 para todos os grupos. Anova de duas vias com Pos-teste de Bonferroni foi utilizado em análise de múltiplas comparações para entrar diferenças ( $P < 0,05$ ) entre os grupos.\*representa nível de significancia de P.

#### 4.17. O aumento de sobrevivida decorrente do tratamento com PEA

De maneira muito interessante, ao analisar a sobrevivida dos animais submetidos ao tratamento com PEA na presença dos antagonistas de CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, AM251 e AM630 respectivamente. Observamos que não houve diferença na sobrevivida dos animais tratados com AM630+PEA quando comparados ao grupo tratado com PEA ( $P = >0,9999$ ). Entretanto, houve redução na sobrevivida de animais tratados com AM251+PEA, variando de quando comparados a animais que receberam apenas PEA, variando de 60% para 20%, entretanto não foi encontrada diferença estatística em relação a esta variação ( $P = 0,1023$ )

Não houve diferença entre os grupos PEA e AM630+PEA quando comparados ao grupo singênico (PEA  $P = 0,1343$ ; AM630+PEA  $P = 0,1343$ ). Houve, porém, diferença entre AM251+PEA em relação ao grupo controle ( $P = 0,0143$ ), não sendo este diferente do grupo veículo ( $P = 0,5485$ ); porquanto houve diferença entre singênico e veículo ( $P = 0,0016$ ). Neste mesmo sentido, PEA e AM630+PEA se mostraram diferentes do grupo veículo ( $P = 0,0298$  e  $P = 0,0298$ ) (Figura 42).

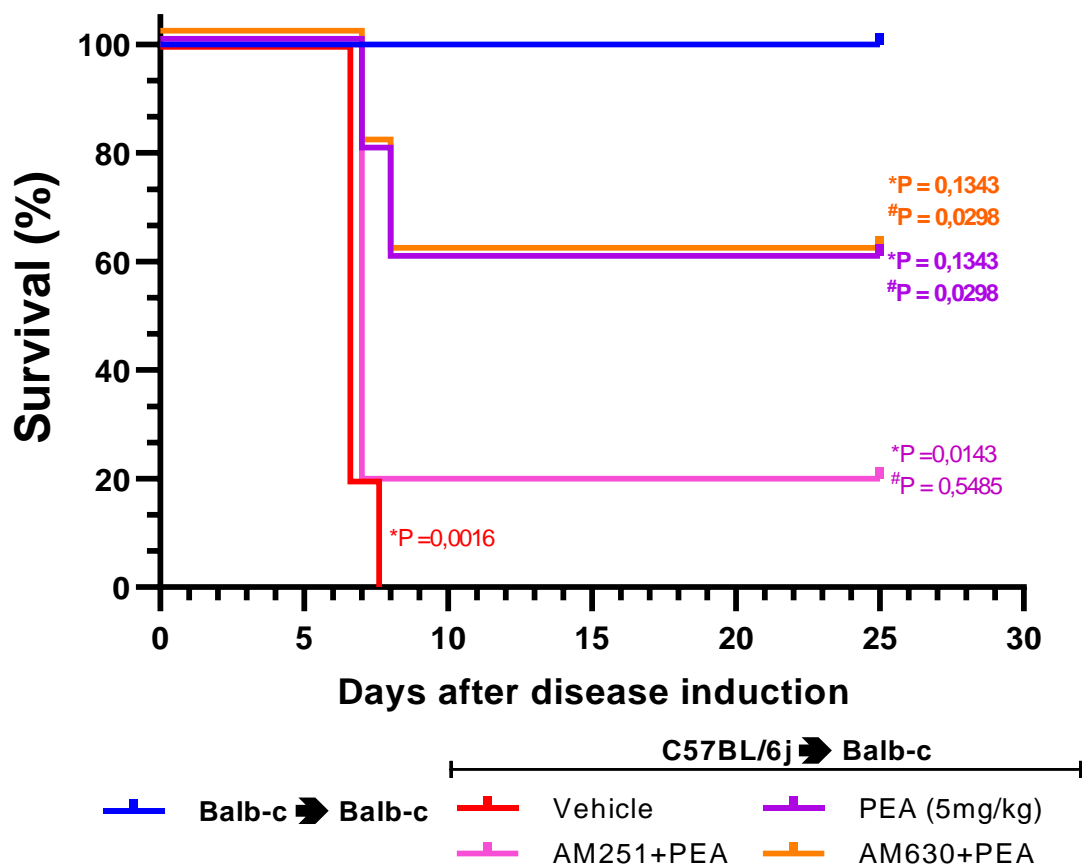


Figura 42. Ação de PEA em receptores canabinóides. Análise de sobrevida de animais singênicos, ou alogênicos, tratados com veículo, PEA, AM251+PEA ou AM630+PEA. \*indica análise estatística em relação ao grupo singênico e # indica análise estatística em relação ao grupo veículo. N=10 para todos os grupos. A sobrevida foi verificada através do teste de Log-rank (Mantel-Cox), sendo os grupos considerados diferentes para  $P < 0,05$ . \* representa a comparação com o grupo singênico e # com grupo veículo.

Desta forma, torna-se interessante investigar outros receptores que possam estar relacionados ao aumento da sobrevida decorrente do tratamento com PEA, uma de nossas hipóteses é de que este fármaco esteja interagindo com o receptor GPR55, uma vez que diversos autores descrevem forte interação agonista com este receptor (REGGIO, 2010; SJOGREN *et al.*, 2005). Ademais, o receptor  $CB_1$  parece estar envolvido na resposta de PEA em proporcionar aumento de sobrevida. Apesar de não ser o mais abundante no intestino, este receptor é encontrado nas vilosidades, onde participa ativamente de funções

como o controle de saciedade, sendo também abundante na região do plexo mioentérico, uma região que compõe o sistema ervoso entérico, sendo formado por uma cadeia de células da glia e neurônios, onde  $CB_1$  é expresso. O  $CB_1$  está diretamente envolvido no processo de contração muscular através da inibição da liberação do neurotransmissor excitatório ACh (DIPATRIZIO, 2016) (Figura 43 - A). Uma vez que a resposta de PEA em relação à sobrevida foi distinta da resposta proporcionada pela AEA decidimos analisar em maior detalhe se um de seus mecanismos poderia ser através da regulação do peristaltismo, levando à redução do quadro de diarreia em animais com GVHD. Desta forma, animais tratados com PEA apresentaram redução do *score* relacionado ao aparecimento de diarreia após a indução da GVHD quando comparados ao grupo controle e esta proteção foi perdida no grupo tratado com AM251+PEA, demonstrando que este fator foi diretamente influenciado pela interação de PEA com o receptor  $CB_1$  (Figura 43 - B). A perda de peso ocasionada principalmente pela diarreia é um dos principais fatores associados à GVHD.

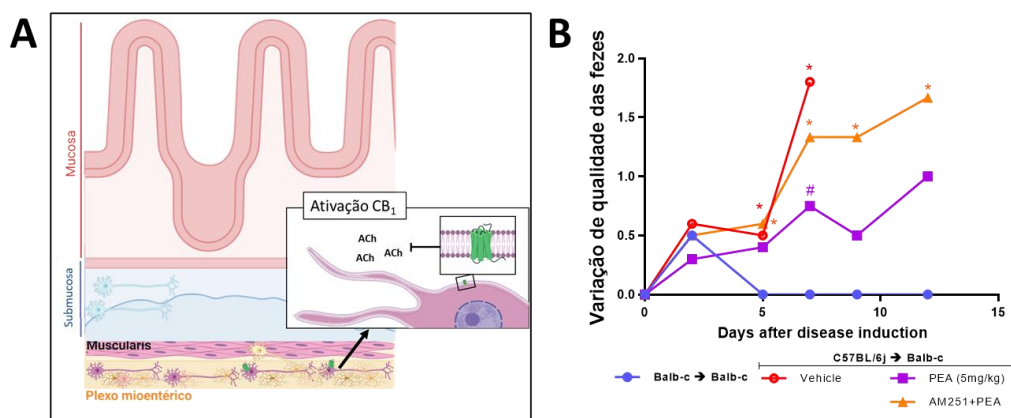


Figura 43. A importância de  $CB_1$  no intestino. (A) A ativação do receptor  $CB_1$  está envolvida no processo de controle da contração intestinal através da inibição da liberação de ACh (adaptado de DIPATRIZIO (2016)). (B) Variação da qualidade das fezes dos animais após transplante. O primeiro ponto após o transplante indica o período de enxertamento em que o dano ocasionado pelo regime de condicionamento é evidente e leva a danos intestinais ocasionando em fezes levemente pastosas. Após este período os animais que receberam transplante singênico apresentam retorno as condições basais, enquanto animais com GVHD apresentam agravamento deste quadro até a mortalidade. O tratamento com PEA preveniu este agravamento. N=5 para todos

os grupos. Anova de duas vias com Pos-teste de Bonferroni foi utilizado em análise de multiplas comparações para entrontrar diferenças ( $P < 0,05$ ) entre os grupos.\*representa nível de significancia de P.

Por fim, foi realizada microscopia intravital para analisar a para verificar a participação dos receptores canabinoides nas alterações verificadas pelo tratamento com PEA na redução do rolamento e adesão das células nos vasos mesentéricos. De maneira muito interessante, o pré-tratamento com ambos os antagonistas  $CB_1$  e  $CB_2$  foram capazes de impedir a redução no rolamento celular, entretanto apenas o antagonismo do receptor  $CB_2$  impediu a redução da adesão celular. Reinterando a atuação de PEA em ambos os receptores canabinoides (Figura 44).

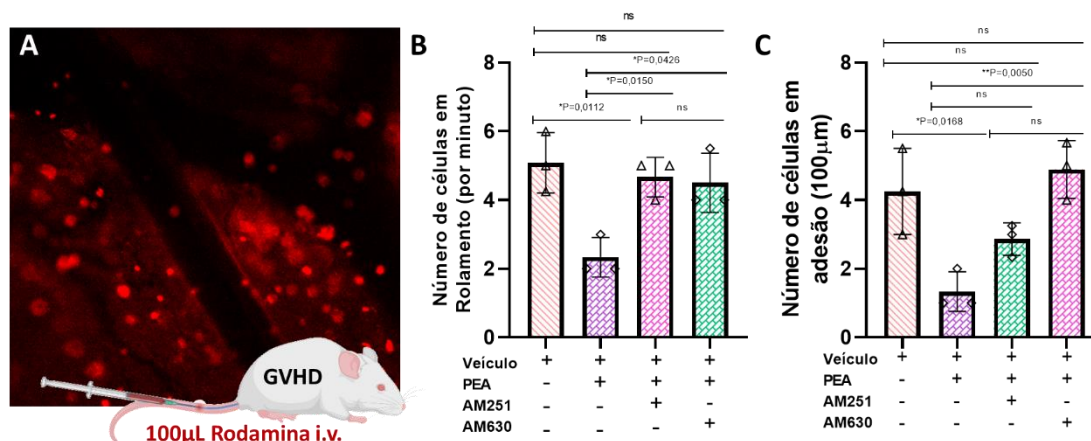


Figura 44. Análise intravital PEA na presença de antagonistas  $CB_1$  e  $CB_2$ . (A) Imagem representativa da técnica de microscopia intravital realizada pela aplicação de rodamina intravenosa. (B) Número de células em rolamento por minuto. (C) Número de células em adesão em 100µ de vaso. N=3 para cada grupo neste experimento. Anova de duas vias com pós-teste de Bonferroni foi utilizado para comparar as médias entre os grupos, os grupos foram considerados diferentes quanto  $P < 0,05$ .

# Discussão

## 5. Discussão

A GVHD é uma doença com complexa patologia, de acometimento sistêmico e rápida progressão, sendo caracterizada por extenso dano tecidual e tempestade de citocinas (SHULMAN *et al.*, 2015). Mesmo com constantes progressos na medicina o principal tratamento para esta doença permanece sendo o uso prolongado de imunossuppressores e corticoides (JAMIL *et al.*, 2015; DEVETTEN *et al.*, 2004). Entretanto, além dos efeitos adversos e doenças secundárias que podem decorrer da imunossupressão a longo prazo os corticoides apresentam ainda mais uma complicação: os pacientes podem apresentar GVHD refratária a corticoides (DEVERGIE; JANIN, 2008). Isso ocorre em quase 60% dos pacientes e consiste na não-responsividade ao tratamento (XHAARD *et al.*, 2012).

No trabalho atual observamos o efeito de endocanabinóides, moléculas endógenas que tem potencial de atuar em receptores canabinóides, sendo metabolizadas por enzimas específicas que fazem parte do sistema canabinóide. Endocanabinóides podem ser divididos de acordo com sua via de síntese e neste modelo decidimos focar nas N-acetiletanolaminas. Primeiramente, averiguamos se os níveis endógenos de Anandamida seriam alterados pela indução da GVHD, comparando animais que receberam transplante singênico e alogênico. De maneira muito interessante, não houve alterações nos níveis de AEA no intestino ou no soro dos animais com GVHD, mas houve aumento dos níveis deste endocanabinóide no fígado. É interessante observar que a expressão de AEA no fígado pode ser correlacionada a patologias neste órgão, tratando-se de uma resposta adaptativa a estímulos nocivos, como cirrose (BERDYSHEV *et al.*, 2001), podendo também ocorrer durante o processo de regeneração do fígado (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2011).

Em modelo de colite induzida por DNBS, D'ARGENIO *et al.* (2006) relatam o aumento dos níveis de Anandamida, sendo o mesmo encontrado em biópsias de

pacientes com colite. Os autores discutem que este aumento ainda nos estágios iniciais da colite poderia se tratar de um mecanismo endógeno protetor contra a inflamação. Entretanto, apesar de similaridades entre os modelos de colite e o acometimento da GVHD no intestino, o mesmo não foi encontrado em nosso modelo experimental. Ademais, GRILL *et al.* (2019) relatam que encontraram este aumento no plasma sanguíneo de pacientes com colite ulcerativa e doença de Crohn, mas o mesmo não foi encontrado em pacientes com câncer colorretal. Desta forma, apesar de não haver alterações nos níveis de AEA devido à indução de GVHD, é interessante avaliar se o aumento de seus níveis, pela inibição da enzima responsável por sua hidrólise, poderia mimetizar o mecanismo de auto regulação que já existe no organismo.

Deve-se observar, entretanto, que tanto no organismo murino quanto no organismo humano endocanabinóides são produzidos sob demanda a partir de ácidos graxos de membrana, sendo rapidamente hidrolisados por enzimas como MGL e FAAH. Portanto, a inibição de FAAH leva ao acúmulo de NAEs, mas não de outros endocanabinóides como o 2-AG, porquanto a inibição de MGL teria o efeito oposto, aumentando níveis de 2-AG mas não das NAEs (PANLILIO *et al.*, 2016). SALAGA *et al.* (2014) reportam que o tratamento com PF-3845, um inibidor da FAAH levou à redução da inflamação em modelo de colite induzida por TNBS em camundongos C57B1/6, reduzindo também o dano no colón dos animais. É interessante observar que em nosso modelo, o tratamento com inibidor seletivo irreversível da FAAH, MAFP, levou ao aumento da sobrevivência dos animais e redução dos sinais clínicos.

Apesar destes resultados serem promissores, decidimos não continuar com a investigação desta molécula por duas razões, a primeira é que a FAAH humana e a FAAH murina apresentam muitas diferenças estruturais, fazendo com que enzimas murinas não tenham o mesmo efeito ou eficácia em humanos (DIVENERE *et al.*, 2012). A segunda razão é que durante um estudo clínico em humanos saudáveis, o uso de um inibidor irreversível seletivo para FAAH (BIA

10-2474) levou diversos pacientes a óbito, levantando ressalvas sobre este tipo de fármaco e as intercorrências que seu uso pode ocasionar em humanos (EDAN; KERBRAT, 2017). Durante a investigação para esclarecer as razões dos eventos adversos ocasionados pelo tratamento, a Food and Drug Administration (FDA) banuiu o uso deste fármaco. É interessante observar, entretanto, que em modelos murinos o uso de BIA 10-2474 não apresentou toxicidade ou efeitos adversos graves (HAYES *et al.*, 2021; PECK *et al.*, 2022).

Por esta razão, selecionamos duas das NAEs mais promissoras para investigação de seus efeitos isolados, além de estas moléculas serem evolutivamente preservadas, são bem toleradas tanto pelo organismo humano quanto pelo organismo murino (DI MARZO; PETROSINO, 2007), tornando-os atrativos alvos de pesquisa. ENGEL *et al.* (2008) descrevem que a administração exógena de AEA foi capaz de atenuar a colite ulcerativa induzida por TNBS. IZZO e CAMILLERI (2009) discutem ainda que AEA modula o receptor CB<sub>1</sub>, reduzindo a contratilidade e secreção, e também CB<sub>2</sub>, reduzindo citocinas pró-inflamatórias.

Portanto, a escolha de AEA como potencial fármaco para o tratamento da GVHD se deu por se tratar de uma molécula com potencial imunomodulador já estudado em outros modelos e com afinidade pelos receptores canabinóides clássicos, principalmente CB<sub>2</sub>. A importância deste receptor na GVHD e a possibilidade do uso de seus agonistas como tratamento já havia sido demonstrada em um trabalho anterior de nosso grupo. BERG *et al.* (2021b) realizaram o tratamento de camundongos com GVHD utilizando CBD. Este tratamento levou à redução dos sinais clínicos, proteção dos órgãos-alvo e aumento de sobrevida. Ademais, os autores demonstraram aumento da expressão de CB<sub>2</sub> em linfócitos de animais tratados com CBD. De maneira interessante, deve-se salientar que um dos mecanismos de ação do CBD em doenças inflamatórias é a inibição da FAAH, enzima responsável pela

degradação das NAEs, levando ao acúmulo destes endocanabinóides no organismo (PERTWEE, 2006a).

Outras NAEs, além da AEA, acumulam-se no organismo perante a inibição da FAAH. Portanto, decidimos investigar se PEA, uma NAE descrita como análoga mais saturada de AEA teria também potencial de ligação ao receptor CB<sub>2</sub> (LAMBERT *et al.*, 2002). Esta investigação foi realizada através de ensaio de ancoragem molecular, que nos permitiu também averiguar o nível de similaridade entre estas duas NAEs. A ancoragem molecular é utilizada para posicionar estruturas 3D geradas por computador, e baseadas em estruturas descritas por cristalografia, na estrutura de receptores em uma grande variedade de conformações. Este método é utilizado para o screening inicial de fármacos e pode elucidar quanto ao reconhecimento molecular e possíveis interações entre uma molécula e um receptor (JAKHAR *et al.*, 2020). Este método foi utilizado por BRIZZI *et al.* (2009) para propor uma molécula “híbrida” entre AEA e  $\Delta$ 9-THC. Apesar de ser uma metodologia padrão para a predição de moléculas biologicamente ativas, incluindo algoritmos de busca e de score energético para gerar e avaliar ligantes (GUEDES *et al.*, 2014) é importante ressaltar que os dados gerados são de fato uma predição e podem não ser reproduzidos em organismos biológicos complexos e devem ser sempre corroborados pela literatura (THOMAZ *et al.*, 2019). Sendo assim, encontramos uma similaridade de 82-93% entre AEA e PEA quando ligadas ao receptor CB<sub>2</sub>.

Desta forma, procedemos com o tratamento dos animais usando AEA e PEA exógena e, de maneira similar aos achados de ENGEL *et al.* (2008), o tratamento com AEA levou à redução dos sinais clínicos da GVHD e promoveu aumento da sobrevivência dos animais e resultados similares foram obtidos com o tratamento com PEA. Entretanto, em se tratar de uma doença secundária ao transplante de medula, é importante sempre averiguar se os tratamentos não interferem no processo de enxertamento, uma vez que falha na quimerização do hospedeiro com a medula transplantada significa falha no transplante, deixando o

hospedeiro deficiente de um sistema imune funcional (AULETTA *et al.*, 2015). Sendo assim, observamos que tanto AEA quanto PEA não interferiram no processo de enxertamento na medula ou em órgãos linfoides. Adicionalmente não houve alterações nas populações de linfócitos ou no número total de granulócitos e monócitos em ambos os tratamentos. Além destes fármacos não terem reduzido o enxertamento, JIANG *et al.* (2011) sugerem que agonistas do receptor CB<sub>2</sub> podem ser úteis em promover a recuperação de células de medula após irradiação através da proliferação de progenitoras hematopoiéticas, de forma que nossos achados vão ao encontro ao que se encontra descrito na literatura.

Uma vez que as células transplantadas migram e colonizam os órgãos linfoides, elas podem então migrar para os órgãos-alvo onde participarão da resposta inflamatória ocasionando em danos a estes tecidos (BAKER *et al.*, 1996). O principal alvo da GVHD aguda é o intestino, e uma das principais causas de morte em pacientes com GVHD é a exacerbada perda de peso, decorrente da pouca absorção de nutrientes, dificuldades na alimentação e diarreia grave (ROBAK *et al.*, 2017). O tratamento com PEA e AEA foram suficientes para reduzir o dano ao intestino, reduzindo principalmente o infiltrado inflamatório. Este dado é corroborado pela redução de linfócitos T CD4 e CD8, bem como a ativação destas populações celulares. De maneira muito interessante, ambas as NAEs não reduziram citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Em contraste ao descrito em estudos que utilizaram  $\Delta^9$ -THC e CBD, os endocanabinóides não levaram ao aumento de células T-regulatórias, mas mantiveram o efeito de aumento da IL-10, uma interleucina anti-inflamatória. De maneira interessante, CBD levou a um aumento na população de células CD4 e CD8, enquanto AEA e PEA levaram à redução de ambas populações, ademais, tanto em CBD quanto em ambas as NAEs estas populações encontravam-se menos ativadas

É muito interessante que não tenhamos encontrado alterações nas quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias investigadas, o que indica que este não é o mecanismo pelo qual AEA e PEA reduzem o infiltrado inflamatório e o número de células no intestino. Este achado é interessante, uma vez que mesmo com o sinal de quimio-atração ainda há redução do número de células no tecido-alvo, indicando que outros mecanismos norteiam esta redução. Sendo assim, investigamos como estaria o processo de rolamento e adesão celular em vasos mesentéricos, uma vez que estes processos precedem a migração celular e sua ausência ou redução pode influir diretamente na redução de células imunes nos órgãos-alvo (LO *et al.*, 1991). Um dos possíveis mecanismos de intervenção na migração celular seria a ação direta das NAEs sobre o receptor CB<sub>2</sub> presente nas células do sistema imune, uma vez que este é expresso em praticamente todas as células da linhagem mieloide (PERTWEE; ROSS, 2002). Desta forma, avaliamos se o tratamento com AEA ou PEA influenciaria a migração celular, mais especificamente os processos de rolamento e adesão das células nos vasos mesentéricos.

A motilidade dos linfócitos T é um processo complexo que depende primeiramente da ancoragem das células, através de selectinas, na parede do vaso, esta é uma ligação relativamente fraca e a sequência de alternâncias entre ligação e desconexão permite o rolamento da célula na parede do vaso. A célula chegara ao *stop* uma vez que haja ligação entre integrinas presentes em sua membrana e moléculas expressas na superfície do epitélio vascular, como a Molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), a capacidade de adesão dos linfócitos é um passo essencial para que estas possam chegar a seus alvos e desencadear seus papéis na inflamação local (STANCIU; DJUKANOVIC, 1998). Em um trabalho de revisão, VERMA e KELLEHER (2019) discute que linfócitos T circulam constantemente na corrente sanguínea, sendo esta uma parte fundamental de seu papel na imunovigilância do organismo. Entretanto, moléculas de adesão, principalmente integrinas, e estas, por sua vez, são ativadas pela ligação de receptores celulares à quimiocinas que levam a

alterações conformacionais nas integrinas. Encontramos, portanto, redução na adesão de células à parede vascular em animais tratados com AEA, porquanto em animais tratados com PEA foi verificada redução do rolamento destas células e também de sua adesão. É importante observar, entretanto, que o processo de rolamento precede a adesão, de forma a reduzir a velocidade da célula no vaso e permitir a interação de integrinas e receptores presentes no epitélio vascular (LAWSON; WOLF, 2009).

Em um modelo de isquemia e reperfusão, MONTECUCCO *et al.* (2009) não encontraram alterações em citocinas e quimiocinas em camundongos tratados com o agonista CB<sub>2</sub> JHW133, de forma similar aos nossos achados, tanto com AEA quanto PEA. Desta forma, os autores investigaram a integrina Mac-1 $\alpha$  (composta pelo dímero CD11b/CD18) e descobriram que o tratamento com JWH133 levava à redução de seus níveis em neutrófilos, limitando a migração deste tipo celular. Desta forma, investigamos a Mac-1 $\alpha$  através de um dos componentes de seu dímero, o CD11b. Esta molécula é comumente expressa na superfície de diversas células da linhagem mieloide, como linfócitos e neutrófilos, e tem papel crucial na adesão celular. De forma muito interessante, AEA levou à redução de CD11b em linfócitos T-CD3, T-CD4 e T-CD8, o que corrobora a redução na adesão celular encontrada na microscopia intravital, que é revertida na presença de antagonista CB<sub>2</sub> e mimetizada por JHW133. AEA e PEA levaram à redução desta molécula em linfócitos T-CD4 e CD8, apoiando sua interferência na adesão celular. Entretanto, PEA também levou à redução do rolamento das células nas paredes dos vasos, o que indica que outros mecanismos podem estar envolvidos e não apenas a redução de Mac-1 $\alpha$ . Em modelo murino de isquemia e reperfusão, DI PAOLA *et al.* (2012) descreveram que o tratamento com PEA cinco minutos antes da reperfusão levou à redução de ICAM-1 e L-selectina, moléculas de adesão em células endoteliais.

A L-selectina, CD62L é uma molécula glicoproteica transmembrana que é expressa em quase todos os leucócitos circulantes, sendo vital para o processo

de rolamento (IVETIC *et al.*, 2019). De maneira muito interessante, AEA não gerou alterações nesta molécula, porquanto PEA reduziu o MFI de CD62L tanto em populações de linfócitos T CD4 quanto T CD8. Este resultado demonstra que, apesar de desencadearem papéis similares em relação à CD11b e à redução da ativação de linfócitos, PEA atua em outros mecanismos além daqueles encontrados com o uso de AEA.

Estes mecanismos culminam, portanto, na proteção do intestino, entretanto, outro órgão-alvo da GVHD é o fígado. É importante observar que tanto AEA quanto PEA foram também capazes de proteger o este órgão, reduzindo o score histopatológico. Entretanto não encontramos alterações nas citocinas e quimiocinas avaliadas, mas deve-se ressaltar que apenas CCL2 encontrava-se aumentada no grupo veículo.

Sendo assim, é provável que, em nosso modelo experimental, a mortalidade ocorre antes mesmo que a GVHD se instaure neste órgão, como observado por PANOSKALTSIS-MORTARI *et al.* (2004). Em um ensaio temporal, a autora induziu a GVHD pelo transplante de células GFP<sup>+</sup>, permitindo a visualização das células transplantadas nos órgãos-alvo. Neste trabalho, a autora demonstra que imediatamente após o transplante, seja este singênico ou alogênico, ocorre migração das células transplantada para os órgãos linfoides e apenas ao terceiro dia, após o enxertamento, as células passam a migrar para os órgãos-alvo, mas principalmente o intestino. Ao sétimo dia, período escolhido por nós devido ao início da mortalidade, Panoskaltis-Mortari relata, entretanto, que neste período há baixo povoamento de células no fígado dos animais (Figura 44). Esta cronologia elucida nossos achados de alterações pontuais no fígado e mesmo assim observa-se proteção de PEA através da redução do score histopatológico.

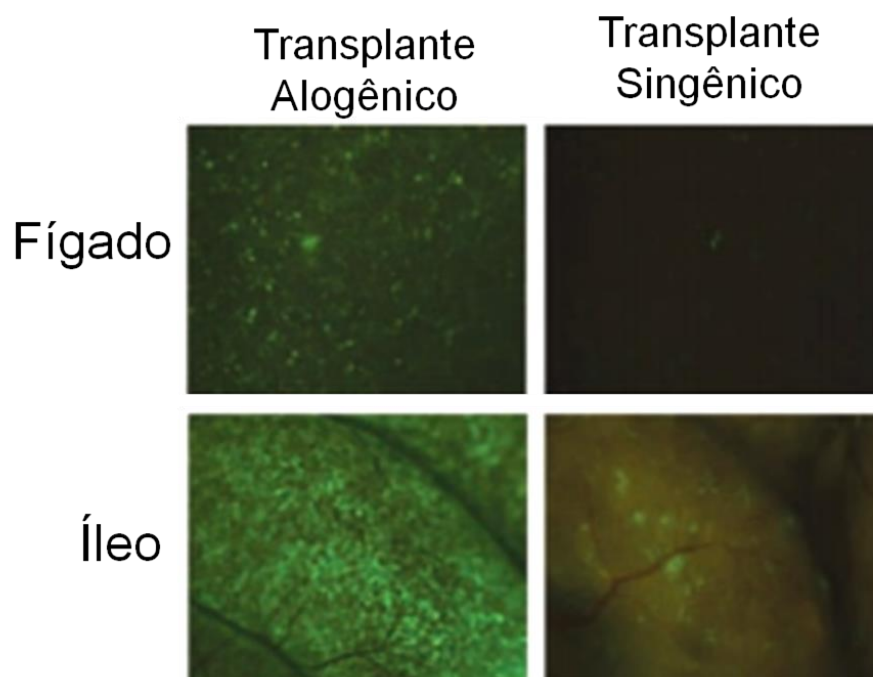


Figura 45. Migração de células GFP+ para os órgãos-alvo. A imagem de microscopia intravital apresenta as diferenças de migração de células GFP+ (verde) tanto no fígado quanto no íleo de animais que receberam transplante alogênico e singênico. Adaptada de PANOSKALTSIS-MORTARI *et al.* (2004).

Tendo em vista os efeitos destes fármacos nos principais órgãos-alvo, precisávamos entender, no contexto sistêmico, qual receptor poderia estar envolvido, de maneira predominante, no aumento de sobrevivência. Para tanto, nós inicialmente averiguamos a participação dos receptores canabinóides (CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>) na GVHD. E, de maneira interessante, o tratamento com antagonistas de ambos os receptores não levou a aumento substancial de sobrevivência em relação ao grupo veículo. Em modelo de colite induzida por TNBS, ENGEL *et al.* (2010) encontraram que animais desprovidos destes receptores se tornavam mais susceptíveis à colite, apresentando maior dano em análise histopatológica. SALAGA *et al.* (2014) descrevem ainda que o uso de AM251 bloqueou o efeito anti-inflamatório gerado pelo inibidor de FAAH, mas AM630 não apresentou efeito.

Conforme nossa hipótese inicial, o aumento de sobrevida resultante do tratamento com AEA se mostrou dependente de CB<sub>2</sub>, mas EHRHART *et al.* (2005) discutem que a ativação de CB<sub>2</sub> também seria responsável pela inibição da produção de citocinas além de reduzir a apresentação de antígenos, mas este primeiro efeito não foi observado em animais tratados com AEA. Por outro lado e de maneira inesperada, PEA se mostrou parcialmente dependente de CB<sub>1</sub>. Este achado vai de embate com o que havíamos encontrado no ensaio de ancoragem, de forma que esperávamos uma resposta similar àquela do AEA.

Em estudos anteriores, foi observado que Δ9-THC e CBD, que possuem a mesma fórmula molecular, se comportam de forma distinta em relação à sua interação com receptores canabinóides GALVE-ROPERH *et al.*, 2013)(BERG *et al.*, 2021b). Desta mesma forma, observamos que AEA e PEA, apesar de sua alta taxa de similaridade molecular desempenharam interações distintas em relação aos receptores canabinóides em relação ao aumento da sobrevida dos animais com GVHD, de forma que o primeiro se mostrou dependente de CB<sub>2</sub> e o segundo parcialmente dependente de CB<sub>1</sub>. Mas devido à similaridade de efeitos encontrados, não devemos descartar a possibilidade de que PEA esteja sim interagindo com CB<sub>2</sub>, apesar do antagonismo deste não interferir na sobrevida.

Em um modelo de células de rim isoladas que super-expressam o receptor vaniloide 1, um dos potenciais alvos das NAEs, DE PETROCELLIS *et al.* (2001) descrevem que o tratamento com PEA aumentou os efeitos de AEA sobre este receptor, levando ao aumento das concentrações de Ca<sup>2+</sup> intracelular. Em modelo de nocicepção induzida por injeção de formalina, CALIGNANO *et al.* (1998) discutem ainda que efeitos do PEA dependentes de CB<sub>2</sub> podem ser, na verdade, decorrentes da potencialização de AEA que então se ligaria a CB<sub>2</sub>. Em modelo de hiperalgesia inflamatória através de injeção com carragenina, JHAVERI *et al.* (2008) descrevem este efeito de potencialização como “entourage effect”, este termo elucida a interação sinérgica entre canabinóides.

Portanto, PEA poderia aumentar tanto a concentração como os efeitos de AEA endógena, o que justificaria as similaridades que encontramos, mesmo que primariamente, em nosso modelo, a ação de PEA tenha se mostrado dependente de CB<sub>1</sub> e não CB<sub>2</sub> como AEA.

Afinal, AEA e PEA, assim como diversas outras NAEs apresentam tanto vias de síntese como vias de inativação em comum, podendo dar origem a metabólitos ativos como eicosanoides e prostaglandinas, bem como ácidos graxos. Estas moléculas, principalmente as prostaglandinas, podem desencadear seus efeitos próprios que podem ou não ser conflitantes com os efeitos principais de imunomodulação de AEA e PEA (DI MARZO; PISCITELLI, 2015). Ademais, como os demais canabinóides, ambas estas moléculas apresentam promiscuidade farmacológica, podendo interagir com diversos outros receptores além dos receptores canabinóides que foram o foco de nosso estudo. Alguns exemplos sendo o receptor vanilóide de tipo 1, PPARs, 5HT, GPRs, dentre outros (PERTWEE, 2006b; 2015; PERTWEE; ROSS, 2002). Desta forma, nosso estudo esclarece apenas parte do complexo mecanismo de imunomodulação das NAEs, tendo como foco principal a interação de AEA e PEA com o receptor CB<sub>2</sub>.

# **Conclusão**

## 6. Conclusão

Nosso trabalho demonstra que alterações na disponibilidade de endocanabinóides, seja por uso de inibidores de enzimas responsáveis por sua degradação ou por administração exógena destas moléculas, leva a um efeito protetor e aumento da sobrevida de animais com GVHD. Evidencia-se que o tratamento com Anandamida promoveu o aumento de sobrevida através de interação com o receptor canabinóide do tipo 2. Este fármaco também promoveu a redução do número de linfócitos CD3, CD4 e CD8 no intestino, principal órgão alvo da GVHD, promovendo aumento de produção de IL-10 sem interferir no processo de enxertamento. Outro endocanabinóide avaliado, o Palmitoiletanolamida também aumentou a sobrevida, mas este fenômeno foi parcialmente dependente de CB<sub>1</sub> e não CB<sub>2</sub>. Observamos também efeito protetor nos órgãos-alvo, com redução de CD4 e CD8 no intestino e redução de CD8 no fígado. PEA levou também ao aumento de IL-10 no intestino e interferiu no processo de adesão e rolamento de células nos vasos mesentéricos, levando à redução da expressão de CD11b e CD62L em células CD4 e CD8 no intestino, porquanto AEA levou à redução apenas da adesão destas células e da expressão de CD11b. Desta forma, fica evidente que estes fármacos apresentam grande potencial terapêutico na doença do enxerto-contrahospedeiro, principalmente por serem moléculas também endogenamente produzidas e, portanto, bem suportadas tanto pelo organismo humano quanto murino. Mais investigações se fazem necessárias para compreender os mecanismos de ação de PEA, mas a possibilidade de que alguns de seus efeitos sejam por ação sinérgica à AEA endógena pode trazer vantagens ao tratamento com este fármaco, uma vez que além de seus próprios efeitos imunomodulatórios e anti-nociceptivos haveriam também os efeitos da AEA endógena. Com este trabalho esperamos ter elucidado alguns dos mecanismos e efeitos destes fármacos na doença do enxerto-contrahospedeiro, ressaltando o potencial terapêutico dos endocanabinóides.

The image features a white rectangular area in the lower-left quadrant, set against a background of a dark-to-light gray gradient that slopes upwards from the bottom-left corner. The word "Referências" is centered within the white area in a bold, black, sans-serif font.

# Referências

## 7. Referências

ADAMS, K. M.; HOLMBERG, L. A.; LEISENRING, W.; FEFER, A.; GUTHRIE, K. A.; TYLEE, T. S.; MCDONALD, G. B.; BENSINGER, W. I.; NELSON, J. L. Risk factors for syngeneic graft-versus-host disease after adult hematopoietic cell transplantation. **Blood**, 104, n. 6, p. 1894-1897, Sep 15 2004.

ADEVA-ANDANY, M. M.; CARNEIRO-FREIRE, N.; SECO-FILGUEIRA, M.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, C.; MOURINO-BAYOLO, D. Mitochondrial beta-oxidation of saturated fatty acids in humans. **Mitochondrion**, 46, p. 73-90, May 2019.

ALBERICH JORDA, M.; RAYMAN, N.; TAS, M.; VERBAKEL, S. E.; BATTISTA, N.; VAN LOM, K.; LOWENBERG, B.; MACCARRONE, M.; DELWEL, R. The peripheral cannabinoid receptor Cb2, frequently expressed on AML blasts, either induces a neutrophilic differentiation block or confers abnormal migration properties in a ligand-dependent manner. **Blood**, 104, n. 2, p. 526-534, Jul 15 2004.

ANWER, F.; SHAUKAT, A. A.; ZAHID, U.; HUSNAIN, M.; MCBRIDE, A.; PERSKY, D.; LIM, M.; HASAN, N.; RIAZ, I. B. Donor origin CAR T cells: graft versus malignancy effect without GVHD, a systematic review. **Immunotherapy**, 9, n. 2, p. 123-130, Jan 2017.

ARANTES, R. M.; NOGUEIRA, A. M. Distribution of enteroglucagon- and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. **Cell Tissue Res**, 290, n. 1, p. 61-69, Oct 1997.

AULETTA, J. J.; EID, S. K.; WUTTISARNWATTANA, P.; SILVA, I.; METHENY, L.; KELLER, M. D.; GUARDIA-WOLFF, R.; LIU, C.; WANG, F.; BOWEN, T.; LEE, Z.; SOLCHAGA, L. A.; GANGULY, S.; TYLER, M.; WILSON, D. L.; COOKE, K. R. Human mesenchymal stromal cells attenuate graft-versus-host disease and maintain graft-versus-leukemia activity following experimental allogeneic bone marrow transplantation. **Stem Cells**, 33, n. 2, p. 601-614, Feb 2015.

BAKER, 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, n. 6, p. 2645-2656, Jun 1 1996.

BARTON-BURKE, M.; DWINELL, D. M.; KAFKAS, L.; LAVALLEY, C.; SANDS, H.; PROCTOR, C.; JOHNSON, E. Graft-versus-host disease: a complex long-term side effect of hematopoietic stem cell transplant. **Oncology (Williston Park)**, 22, n. 11 Suppl Nurse Ed, p. 31-45, Oct 2008.

BEATTY, P. G.; MORI, M.; MILFORD, E. Impact of racial genetic polymorphism on the probability of finding an HLA-matched donor. **Transplantation**, 60, n. 8, p. 778-783, 1995.

BERDYSHEV, E. V.; SCHMID, P. C.; KREBSBACH, R. J.; SCHMID, H. H. Activation of PAF receptors results in enhanced synthesis of 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in immune cells. **FASEB J**, 15, n. 12, p. 2171-2178, Oct 2001.

BERG, B. B.; SOARES, J. S.; PAIVA, I. R.; REZENDE, B. M.; RACHID, M. A.; CAU, S. B. A.; ROMERO, T. R. L.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M.; CASTOR, M. Cannabidiol Enhances Intestinal Cannabinoid Receptor Type 2 Receptor Expression and Activation Increasing Regulatory T Cells and Reduces Murine Acute Graft-versus-Host Disease without Interfering with the Graft-versus-Leukemia Response. **J Pharmacol Exp Ther**, 377, n. 2, p. 273-283, May 2021a.

BERG, B. B.; SOARES, J. S.; PAIVA, I. R.; REZENDE, B. M.; RACHID, M. A.; CAU, S. B. A.; ROMERO, T. R. L.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M.; CASTOR, M. G. M. Cannabidiol Enhances Intestinal Cannabinoid Receptor Type 2 Receptor Expression and Activation Increasing Regulatory T Cells and Reduces Murine Acute Graft-versus-Host Disease without Interfering with the Graft-versus-Leukemia Response. **J Pharmacol Exp Ther**, 377, n. 2, p. 273-283, May 2021b.

BISOGNO, T.; MAURELLI, S.; MELCK, D.; DE PETROCELLIS, L.; DI MARZO, V. Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes. **J Biol Chem**, 272, n. 6, p. 3315-3323, Feb 7 1997.

BLAZAR, B. R.; MURPHY, W. J.; ABEDI, M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. **Nat Rev Immunol**, 12, n. 6, p. 443-458, May 11 2012.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol**, 37, n. 8, p. 911-917, Aug 1959.

BOCHER, W. O.; MARCUS, H.; SHAKARCHY, R.; DEKEL, B.; SHOUVAL, D.; GALUN, E.; REISNER, Y. Antigen-specific B and T cells in human/mouse radiation chimera following immunization in vivo. **Immunology**, 96, n. 4, p. 634-641, Apr 1999.

BRIZZI, A.; BRIZZI, V.; CASCIO, M. G.; CORELLI, F.; GUIDA, F.; LIGRESTI, A.; MAIONE, S.; MARTINELLI, A.; PASQUINI, S.; TUCCINARDI, T.; DI MARZO, V. New resorcinol-anandamide "hybrids" as potent cannabinoid receptor ligands endowed with antinociceptive activity in vivo. **J Med Chem**, 52, n. 8, p. 2506-2514, Apr 23 2009.

BURSTEIN, S. H.; ZURIER, R. B. Cannabinoids, endocannabinoids, and related analogs in inflammation. **AAPS J**, 11, n. 1, p. 109-119, Mar 2009.

CALCATERRA, C.; SFONDRINI, L.; ROSSINI, A.; SOMMARIVA, M.; RUMIO, C.; MENARD, S.; BALSARI, A. Critical role of TLR9 in acute graft-versus-host disease. **J Immunol**, 181, n. 9, p. 6132-6139, Nov 1 2008.

CALIGNANO, A.; LA RANA, G.; GIUFFRIDA, A.; PIOMELLI, D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. **Nature**, 394, n. 6690, p. 277-281, Jul 16 1998.

CASE, D. A.; CHEATHAM, T. E., 3rd; DARDEN, T.; GOHLKE, H.; LUO, R.; MERZ, K. M., Jr.; ONUFRIEV, A.; SIMMERLING, C.; WANG, B.; WOODS, R. J. The Amber biomolecular simulation programs. **J Comput Chem**, 26, n. 16, p. 1668-1688, Dec 2005.

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 $\alpha$ -binding protein evasin-1 protects from graft-versus-host disease but does not modify graft-versus-leukemia in mice. **J Immunol**, 184, n. 5, p. 2646-2654, Mar 1 2010.

CASTOR, M. G.; REZENDE, B. M.; BERNARDES, P. T.; VIEIRA, A. T.; VIEIRA, É. L.; ARANTES, R. M.; SOUZA, D. G.; SILVA, T. A.; TEIXEIRA, M. M.; PINHO, V. PI3K $\gamma$  controls leukocyte recruitment, tissue injury, and lethality in a model of graft-versus-host disease in mice. **Journal of leukocyte biology**, 89, n. 6, p. 955-964, 2011.

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. **Journal of leukocyte biology**, 91, n. 4, p. 629-639, 2012.

CIPPITELLI, A.; CANNELLA, N.; BRACONI, S.; DURANTI, A.; TONTINI, A.; BILBAO, A.; DEFONSECA, F. R.; PIOMELLI, D.; CICCOCIOPPO, R. Increase of brain endocannabinoid anandamide levels by FAAH inhibition and alcohol abuse behaviours in the rat. **Psychopharmacology (Berl)**, 198, n. 4, p. 449-460, Jul 2008.

CURTIS, R. E.; ROWLINGS, P. A.; DEEG, H. J.; SHRINER, D. A.; SOCIÉ, G.; TRAVIS, L. B.; HOROWITZ, M. M.; WITHERSPOON, R. P.; HOOVER, R. N.; SOBOCINSKI, K. A. Solid cancers after bone marrow transplantation. **New England Journal of Medicine**, 336, n. 13, p. 897-904, 1997.

D'ARGENIO, G.; VALENTI, M.; SCAGLIONE, G.; COSENZA, V.; SORRENTINI, I.; DI MARZO, V. Up-regulation of anandamide levels as an endogenous mechanism and a pharmacological strategy to limit colon inflammation. **FASEB J**, 20, n. 3, p. 568-570, Mar 2006.

DE PETROCELLIS, L.; DAVIS, J. B.; DI MARZO, V. Palmitoylethanolamide enhances anandamide stimulation of human vanilloid VR1 receptors. **FEBS Lett**, 506, n. 3, p. 253-256, Oct 12 2001.

DEVERGIE, A.; JANIN, A. Graft versus host disease. **EBMT-ESH handbook**, p. 218-234, 2008.

DI MARZO, V.; PETROSINO, S. Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. **Current opinion in lipidology**, 18, n. 2, p. 129-140, 2007.

DI MARZO, V.; PISCITELLI, F. The endocannabinoid system and its modulation by phytocannabinoids. **Neurotherapeutics**, 12, n. 4, p. 692-698, 2015.

DI PAOLA, R.; IMPELLIZZERI, D.; TORRE, A.; MAZZON, E.; CAPPELLANI, A.; FAGGIO, C.; ESPOSITO, E.; TRISCHITTA, F.; CUZZOCREA, S. Effects of palmitoylethanolamide on intestinal injury and inflammation caused by ischemia-reperfusion in mice. **J Leukoc Biol**, 91, n. 6, p. 911-920, Jun 2012.

DI VENERE, A.; DAINESE, E.; FEZZA, F.; ANGELUCCI, B. C.; ROSATO, N.; CRAVATT, B. F.; FINAZZI-AGRO, A.; MEI, G.; MACCARRONE, M. Rat and human fatty acid amide hydrolases: overt similarities and hidden differences. **Biochim Biophys Acta**, 1821, n. 11, p. 1425-1433, Nov 2012.

DICKE, K. A.; VAN BEKKUM, D. W. Transplantation of haemopoietic stem cell (HSC) concentrates for treatment of immune deficiency disease. **Adv Exp Med Biol**, 29, n. 0, p. 337-342, 1973.

DIPATRIZIO, N. V. Endocannabinoids in the Gut. **Cannabis and cannabinoid research**, 1, n. 1, p. 67-77, 2016.

EDAN, G.; KERBRAT, A. Inhibitor of Fatty Acid Amide Hydrolase - Learning from Tragic Failures. **N Engl J Med**, 376, n. 4, p. 393-394, Jan 26 2017.

EHRHART, J.; OBREGON, D.; MORI, T.; HOU, H.; SUN, N.; BAI, Y.; KLEIN, T.; FERNANDEZ, F.; TAN, J.; SHYTLE, R. D. Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation. **J Neuroinflammation**, 2, p. 29, Dec 12 2005.

EL-ATAWNEH, S.; GOLDBLUM, A. Candidate Therapeutics by Screening for Multitargeting Ligands: Combining the CB2 Receptor With CB1, PPARgamma and 5-HT4 Receptors. **Front Pharmacol**, 13, p. 812745, 2022.

EL-HAYEK, J. M.; ROGERS, T. E.; BROWN, G. 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, n. 4, p. 1001-1007, Oct 2005.

ELPHICK, M. R.; SATOU, Y.; SATOH, N. The invertebrate ancestry of endocannabinoid signalling: an orthologue of vertebrate cannabinoid receptors in the urochordate *Ciona intestinalis*. **Gene**, 302, n. 1-2, p. 95-101, Jan 2 2003.

ENGEL, M.; KELLERMAN, C.; RAU, T.; BURNAT, G.; HAHN, E.; KONTUREK, P. J. A. P. Ulcerative colitis in AKR mice is attenuated by intraperitoneally administered anandamide. *59*, n. 4, p. 673, 2008.

ENGEL, M. A.; KELLERMANN, C. A.; BURNAT, G.; HAHN, E. G.; RAU, T.; KONTUREK, P. C. Mice lacking cannabinoid CB1-, CB2-receptors or both receptors show increased susceptibility to trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis. **J Physiol Pharmacol**, 61, n. 1, p. 89-97, Feb 2010.

FARACI, M.; CAVIGLIA, I.; BIRAL, E.; MORREALE, G.; GIARDINO, S.; GARBARINO, L.; CASTAGNOLA, E.; DINI, G.; LANINO, E. Acute graft-versus-host disease in pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Single-center experience during 10 yr. **Pediatr Transplant**, 16, n. 8, p. 887-893, Dec 2012.

FERRARA, J.; YANIK, G. Acute graft versus host disease: pathophysiology, risk factors, and prevention strategies. **Clinical advances in hematology & oncology: H&O**, 3, n. 5, p. 415-419, 428, 2005.

FERRARA, J. L.; LEVINE, J. E.; REDDY, P.; HOLLER, E. Graft-versus-host disease. **Lancet**, 373, n. 9674, p. 1550-1561, May 2 2009.

FUJI, S.; MORI, T.; KHATTRY, N.; CHENG, J.; DO, Y. R.; YAKUSHIJIN, K.; KOHASHI, S.; FUKUDA, T.; KIM, S. W. Severe weight loss in 3 months after allogeneic hematopoietic SCT was associated with an increased risk of subsequent non-relapse mortality. **Bone Marrow Transplant**, 50, n. 1, p. 100-105, Jan 2015.

GALE, R. Bone marrow transplantation in leukemia. **Annals of clinical research**, 13, n. 4-5, p. 367-372, 1981.

GALVE-ROPERH, I.; CHIURCHIU, V.; DIAZ-ALONSO, J.; BARI, M.; GUZMAN, M.; MACCARRONE, M. Cannabinoid receptor signaling in progenitor/stem cell proliferation and differentiation. **Prog Lipid Res**, 52, n. 4, p. 633-650, Oct 2013.

GANETSKY, A.; SHAH, A.; MIANO, T. A.; HWANG, W. T.; HE, J.; LOREN, A. W.; HEXNER, E. O.; FREY, N. V.; PORTER, D. L.; RESHEF, R. Higher tacrolimus concentrations early after transplant reduce the risk of acute GvHD in reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant**, 51, n. 4, p. 568-572, Apr 2016.

GATZA, E.; REDDY, P.; CHOI, S. W. Prevention and Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease in Children, Adolescents, and Young Adults. **Biol Blood Marrow Transplant**, 26, n. 5, p. e101-e112, May 2020.

GLADSTONE, D. E.; PETRI, M.; BOLANOS-MEADE, J.; DEZERN, A. E.; JONES, R. J.; FINE, D.; BRODSKY, R. A. Long-term systemic lupus erythematosus disease control after allogeneic bone marrow transplantation. **Lupus**, 26, n. 7, p. 773-776, 2017.

GONZALEZ, M.; QUEZADA, S. A.; BLAZAR, B. R.; PANOSKALTSIS-MORTARI, A.; RUDENSKY, A. Y.; NOELLE, R. J. J. T. J. o. I. The balance between donor T cell anergy and suppression versus lethal graft-versus-host disease is determined by host conditioning. 169, n. 10, p. 5581-5589, 2002.

GRILL, M.; HOGENAUER, C.; BLESL, A.; HAYBAECK, J.; GOLOB-SCHWARZL, N.; FERREIROS, N.; THOMAS, D.; GURKE, R.; TROTZMULLER, M.; KOFELER, H. C.; GALLE, B.; SCHICHO, R. Members of the endocannabinoid system are distinctly regulated in inflammatory bowel disease and colorectal cancer. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 2358, Feb 20 2019.

GUEDES, I. A.; DE MAGALHAES, C. S.; DARDENNE, L. E. Receptor-ligand molecular docking. **Biophys Rev**, 6, n. 1, p. 75-87, Mar 2014.

GUINDON, J.; DE LEAN, A.; BEAULIEU, P. Local interactions between anandamide, an endocannabinoid, and ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in acute and inflammatory pain. **Pain**, 121, n. 1-2, p. 85-93, Mar 2006.

GUZMAN, M. Cannabinoids: potential anticancer agents. **Nat Rev Cancer**, 3, n. 10, p. 745-755, Oct 2003.

HARRIS, A. C.; YOUNG, R.; DEVINE, S.; HOGAN, W. J.; AYUK, F.; BUNWORASATE, U.; CHANSWANGPHUWANA, C.; EFEBERA, Y. A.; HOLLER, E.; LITZOW, M.; ORDEMANN, R.; QAYED, M.; RENTERIA, A. S.; RESHEF, R.; WOLFL, M.; CHEN, Y. B.; GOLDSTEIN, S.; JAGASIA, M.; LOCATELLI, F.; MIELKE, S.; PORTER, D.; SCHECHTER, T.; SHEKHOVTSOVA, Z.; FERRARA, J. L.; LEVINE, J. E. International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium. **Biol Blood Marrow Transplant**, 22, n. 1, p. 4-10, Jan 2016.

HARTMANN, O.; LE CORROLLER, A. G.; BLAISE, D.; MICHON, J.; PHILIP, I.; NOROL, F.; JANVIER, M.; PICO, J. L.; BARANZELLI, M. C.; RUBIE, H. Peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation for solid tumors and lymphomas: hematologic recovery and costs: a randomized, controlled trial. **Annals of internal medicine**, 126, n. 8, p. 600-607, 1997.

HARVEY, B. S.; SIA, T. C.; WATTCHOW, D. A.; SMID, S. D. Interleukin 17A evoked mucosal damage is attenuated by cannabidiol and anandamide in a human colonic explant model. **Cytokine**, 65, n. 2, p. 236-244, Feb 2014.

HAYES, A. W.; WEBER, K.; MOSER, P.; SOARES-DA-SILVA, P. Non-clinical toxicology evaluation of BIA 10-2474. **Crit Rev Toxicol**, 51, n. 1, p. 65-75, Jan 2021.

HE, X.; LIU, S.; LEE, T. S.; JI, B.; MAN, V. H.; YORK, D. M.; WANG, J. Fast, Accurate, and Reliable Protocols for Routine Calculations of Protein-Ligand Binding Affinities in Drug Design Projects Using AMBER GPU-TI with ff14SB/GAFF. **ACS Omega**, 5, n. 9, p. 4611-4619, Mar 10 2020.

HERNANDEZ-NUNEZ, A.; PASCUAL-LOPEZ, M.; FRAGA, J.; FERNANDEZ-HERRERA, J.; GARCIA-DIEZ, A. Syngeneic acute graft-versus-host disease. **Acta Derm Venereol**, 83, n. 1, p. 77-78, 2003.

HILL, L.; ALOUSI, A.; KEBRIAIEI, P.; MEHTA, R.; REZVANI, K.; SHPALL, E. New and emerging therapies for acute and chronic graft versus host disease. **Ther Adv Hematol**, 9, n. 1, p. 21-46, Jan 2018.

HRYHOROWICZ, S.; KACZMAREK-RYS, M.; ZIELINSKA, A.; SCOTT, R. J.; SLOMSKI, R.; PLAWSKI, A. Endocannabinoid System as a Promising Therapeutic Target in Inflammatory Bowel Disease - A Systematic Review. **Front Immunol**, 12, p. 790803, 2021.

HUA, T.; LI, X.; WU, L.; ILIOPOULOS-TSOUTSOUVAS, C.; WANG, Y.; WU, M.; SHEN, L.; BRUST, C. A.; NIKAS, S. P.; SONG, F.; SONG, X.; YUAN, S.; SUN, Q.; WU, Y.; JIANG, S.; GRIM, T. W.; BENCHAMA, O.; STAHL, E. L.; ZVONOK, N.; ZHAO, S.; BOHN, L. M.; MAKRIYANNIS, A.; LIU, Z. J. Activation and Signaling Mechanism Revealed by Cannabinoid Receptor-Gi Complex Structures. **Cell**, 180, n. 4, p. 655-665 e618, Feb 20 2020.

IVETIC, A.; HOSKINS GREEN, H. L.; HART, S. J. L-selectin: A Major Regulator of Leukocyte Adhesion, Migration and Signaling. **Front Immunol**, 10, p. 1068, 2019.

IZZO, A. A.; CAMILLERI, M. Cannabinoids in intestinal inflammation and cancer. **Pharmacol Res**, 60, n. 2, p. 117-125, Aug 2009.

IZZO, A. A.; FEZZA, F.; CAPASSO, R.; BISOGNO, T.; PINTO, L.; IUVONE, T.; ESPOSITO, G.; MASCOLO, N.; DI MARZO, V.; CAPASSO, F. Cannabinoid CB1-receptor mediated regulation of gastrointestinal motility in mice in a model of intestinal inflammation. **Br J Pharmacol**, 134, n. 3, p. 563-570, Oct 2001.

JAGGAR, S. I.; SELLATURAY, S.; RICE, A. S. The endogenous cannabinoid anandamide, but not the CB2 ligand palmitoylethanolamide, prevents the viscerovisceral hyper-reflexia associated with inflammation of the rat urinary bladder. **Neurosci Lett**, 253, n. 2, p. 123-126, Sep 4 1998.

JAKHAR, R.; DANGI, M.; KHICHI, A.; CHHILLAR, A. K. J. C. B. Relevance of molecular docking studies in drug designing. 15, n. 4, p. 270-278, 2020.

JAKSCH, M.; MATTSSON, J. The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. **Scand J Immunol**, 61, n. 5, p. 398-409, May 2005.

JHAVERI, M. D.; RICHARDSON, D.; ROBINSON, I.; GARLE, M. J.; PATEL, A.; SUN, Y.; SAGAR, D. R.; BENNETT, A. J.; ALEXANDER, S. P.; KENDALL, D. A.; BARRETT, D. A.; CHAPMAN, V. Inhibition of fatty acid amide hydrolase and cyclooxygenase-2 increases levels of endocannabinoid related molecules and produces analgesia via peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in a model of inflammatory pain. **Neuropharmacology**, 55, n. 1, p. 85-93, Jul 2008.

JIAN, W.; EDOM, R.; WENG, N.; ZANNIKOS, P.; ZHANG, Z.; WANG, H. Validation and application of an LC-MS/MS method for quantitation of three fatty acid ethanolamides as biomarkers for fatty acid hydrolase inhibition in human plasma. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, 878, n. 20, p. 1687-1699, Jun 15 2010.

JIANG, S.; FU, Y.; AVRAHAM, H. K. Regulation of hematopoietic stem cell trafficking and mobilization by the endocannabinoid system. **Transfusion**, 51 Suppl 4, p. 65S-71S, Nov 2011.

LAMBERT, D. M.; VANDEVOORDE, S.; JONSSON, K. O.; FOWLER, C. J. The palmitoylethanolamide family: a new class of anti-inflammatory agents? **Curr Med Chem**, 9, n. 6, p. 663-674, Mar 2002.

LATIF, T.; POHLMAN, B.; KALAYCIO, M.; SOBECKS, R.; HSI, E. D.; ANDRESEN, S.; BOLWELL, B. J. Syngeneic graft-versus-host disease: a report of two cases and literature review. **Bone Marrow Transplant**, 32, n. 5, p. 535-539, Sep 2003.

LAWSON, C.; WOLF, S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. **Pharmacol Rep**, 61, n. 1, p. 22-32, Jan-Feb 2009.

LEE, D. W.; SANTOMASSO, B. D.; LOCKE, F. L.; GHOBADI, A.; TURTLE, C. J.; BRUDNO, J. N.; MAUS, M. V.; PARK, J. H.; MEAD, E.; PAVLETIC, S.; GO, W. Y.; ELDJEROU, L.; GARDNER, R. A.; FREY, N.; CURRAN, K. J.; PEGGS, K.; PASQUINI, M.; DIPERSIO, J. F.; VAN DEN BRINK, M. R. M.; KOMANDURI, K. V.; GRUPP, S. A.; NEELAPU, S. S. ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells. **Biol Blood Marrow Transplant**, 25, n. 4, p. 625-638, Apr 2019.

LEVINE, J. E.; BRAUN, T. M.; HARRIS, A. C.; HOLLER, E.; TAYLOR, A.; MILLER, H.; MAGENAU, J.; WEISDORF, D. J.; HO, V. T.; BOLANOS-MEADE, J.; ALOUSI, A. M.; FERRARA, J. L.; BLOOD; MARROW TRANSPLANT CLINICAL TRIALS, N. A prognostic score for acute graft-versus-host disease based on biomarkers: a multicentre study. **Lancet Haematol**, 2, n. 1, p. e21-29, Jan 2015.

LJUNGMAN, P.; URBANO-ISPIZUA, A.; CAVAZZANA-CALVO, M.; DEMIRER, T.; DINI, G.; EINSELE, H. f.; GRATWOHL, A.; MADRIGAL, A.; NIEDERWIESER, D.; PASSWEG, J. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. **Bone marrow transplantation**, 37, n. 5, p. 439, 2006.

LO, S. K.; LEE, S.; RAMOS, R. A.; LOBB, R.; ROSA, M.; CHI-ROSSO, G.; WRIGHT, S. D. Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 stimulates the adhesive activity of leukocyte integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1, alpha m beta 2) on human neutrophils. **J Exp Med**, 173, n. 6, p. 1493-1500, Jun 1 1991.

LOCASCIULLI, A.; ONETO, R.; BACIGALUPO, A.; SOCIÉ, G.; KORTHOF, E.; BEKASSY, A.; SCHREZENMEIER, H.; PASSWEG, J.; FÜHRER, M. Outcome of patients with acquired aplastic anemia given first line bone marrow transplantation or immunosuppressive treatment in the last decade: a report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. **Haematologica**, 92, n. 1, p. 11-18, 2007.

LUCARELLI, G.; GALIMBERTI, M.; POLCHI, P.; ANGELUCCI, E.; BARONCIANI, D.; GIARDINI, C.; POLITI, P.; DURAZZI, S. M. T.; MURETTO, P.; ALBERTINI, F. Bone marrow transplantation in patients with thalassemia. **New England Journal of Medicine**, 322, n. 7, p. 417-421, 1990.

MACMILLAN, M. L.; HOLTAN, S. G.; RASHIDI, A.; DEFOR, T. E.; BLAZAR, B. R.; WEISDORF, D. J. Pediatric acute GVHD: clinical phenotype and response to upfront steroids. **Bone Marrow Transplant**, 55, n. 1, p. 165-171, Jan 2020.

MACMILLAN, M. L.; ROBIN, M.; HARRIS, A. C.; DEFOR, T. E.; MARTIN, P. J.; ALOUSI, A.; HO, V. T.; BOLANOS-MEADE, J.; FERRARA, J. L.; JONES, R.; ARORA, M.; BLAZAR, B. R.; HOLTAN, S. G.; JACOBSON, D.; PASQUINI, M.; SOCIE, G.; ANTIN, J. H.; LEVINE, J. E.; WEISDORF, D. J. A refined risk score for acute graft-versus-host disease that predicts response to initial therapy, survival, and transplant-related mortality. **Biol Blood Marrow Transplant**, 21, n. 4, p. 761-767, Apr 2015.

MAJOR-MONFRIED, H.; RENTERIA, A. S.; PAWARODE, A.; REDDY, P.; AYUK, F.; HOLLER, E.; EFEBERA, Y. A.; HOGAN, W. J.; WÖLFL, M.; QAYED, M. MAGIC biomarkers predict long-term outcomes for steroid-resistant acute GVHD. **Blood**, 131, n. 25, p. 2846-2855, 2018.

MAPARA, M. Y.; LENG, C.; KIM, Y. M.; 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. **Biol Blood Marrow Transplant**, 12, n. 6, p. 623-634, Jun 2006.

MARMONT, A. M. Immune ablation followed by allogeneic or autologous bone marrow transplantation: a new treatment for severe autoimmune diseases? **Stem Cells**, 12, n. 1, p. 125-135, 1994.

MARTIN, P. J.; MCDONALD, G. B.; SANDERS, J. E.; ANASETTI, C.; APPELBAUM, F. R.; DEEG, H. J.; NASH, R. A.; PETERSDORF, E. W.; HANSEN, J. A.; STORB, R. Increasingly frequent diagnosis of acute gastrointestinal graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, 10, n. 5, p. 320-327, May 2004.

MECHOULAM, R.; HANUS, L. Cannabidiol: an overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: chemical aspects. **Chem Phys Lipids**, 121, n. 1-2, p. 35-43, Dec 31 2002.

MENDIZÁBAL, V. E.; ADLER-GRASCHINSKY, E. Cannabinoid system as a potential target for drug development in the treatment of cardiovascular disease. **Current vascular pharmacology**, 1, n. 3, p. 301-313, 2003.

MONTECUCCO, F.; LENGLET, S.; BRAUNERSREUTHER, V.; BURGER, F.; PELLI, G.; BERTOLOTTI, M.; MACH, F.; STEFFENS, S. CB(2) cannabinoid receptor activation is cardioprotective in a mouse model of ischemia/reperfusion. **J Mol Cell Cardiol**, 46, n. 5, p. 612-620, May 2009.

MUKHOPADHYAY, B.; CINAR, R.; YIN, S.; LIU, J.; TAM, J.; GODLEWSKI, G.; HARVEY-WHITE, J.; MORDI, I.; CRAVATT, B. F.; LOTERSZTAJN, S.; GAO, B.; YUAN, Q.; SCHUEBEL, K.; GOLDMAN, D.; KUNOS, G. Hyperactivation of anandamide synthesis and regulation of cell-cycle progression via cannabinoid type 1 (CB1) receptors in the regenerating liver. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108, n. 15, p. 6323-6328, Apr 12 2011.

MUKHOPADHYAY, P.; BAGGELAAR, M.; ERDELYI, K.; CAO, Z.; CINAR, R.; FEZZA, F.; IGNATOWSKA-JANLOWSKA, B.; WILKERSON, J.; VAN GILS, N.; HANSEN, T.; RUBEN, M.; SOETHOUDT, M.; HEITMAN, L.; KUNOS, G.; MACCARRONE, M.; LICHTMAN, A.; PACHER, P.; VAN DER STELT, M. The novel, orally available and peripherally restricted selective cannabinoid CB2 receptor agonist LEI-101 prevents cisplatin-induced nephrotoxicity. **Br J Pharmacol**, 173, n. 3, p. 446-458, Feb 2016.

PANDEY, R.; HEGDE, V. L.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P. S. Targeting cannabinoid receptors as a novel approach in the treatment of graft-versus-host disease: evidence from an experimental murine model. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 338, n. 3, p. 819-828, 2011.

PANLILIO, L. V.; THORNDIKE, E. B.; NIKAS, S. P.; ALAPAFUJA, S. O.; BANDIERA, T.; CRAVATT, B. F.; MAKRIYANNIS, A.; PIOMELLI, D.; GOLDBERG, S. R.; JUSTINOVA, Z. Effects of fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors on working memory in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, 233, n. 10, p. 1879-1888, May 2016.

PANOSKALTSIS-MORTARI, A.; PRICE, A.; HERMANSON, J. R.; TARAS, E.; LEES, C.; SERODY, J. S.; BLAZAR, B. R. In vivo imaging of graft-versus-host-disease in mice. **Blood**, 103, n. 9, p. 3590-3598, 2004.

PECK, R. W.; HOLSTEIN, S. A.; VAN DER GRAAF, P. H. BIA 10-2474: Some Lessons are Clear but Important Questions Remain Unanswered. **Clin Pharmacol Ther**, 111, n. 2, p. 343-345, Feb 2022.

PENACK, O.; MARCHETTI, M.; RUUTU, T.; ALJURF, M.; BACIGALUPO, A.; BONIFAZI, F.; CICERI, F.; CORNELISSEN, J.; MALLADI, R.; DUARTE, R. F.; GIEBEL, S.; GREINIX, H.; HOLLER, E.; LAWITSCHKA, A.; MIELKE, S.; MOHTY, M.; ARAT, M.; NAGLER, A.; PASSWEG, J.; SCHOEMANS, H.; SOCIE, G.; SOLANO, C.; VRHOVAC, R.; ZEISER, R.; KROGER, N.; BASAK, G. W. Prophylaxis and management of graft versus host disease after stem-cell transplantation for haematological malignancies:

updated consensus recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. **Lancet Haematol**, 7, n. 2, p. e157-e167, Feb 2020.

PERTWEE, R. G. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. **Br J Pharmacol**, 147 Suppl 1, p. S163-171, Jan 2006a.

PERTWEE, R. G. The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. **Int J Obes (Lond)**, 30 Suppl 1, p. S13-18, Apr 2006b.

PERTWEE, R. G. Endocannabinoids and Their Pharmacological Actions. **Handb Exp Pharmacol**, 231, p. 1-37, 2015.

PERTWEE, R. G.; ROSS, R. A. Cannabinoid receptors and their ligands. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, 66, n. 2-3, p. 101-121, Feb-Mar 2002.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **J Comput Chem**, 25, n. 13, p. 1605-1612, Oct 2004.

PRZEPIORKA, D.; WEISDORF, D.; MARTIN, P.; KLINGEMANN, H. G.; BEATTY, P.; HOWS, J.; THOMAS, E. D. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. **Bone Marrow Transplant**, 15, n. 6, p. 825-828, Jun 1995.

QUISTAD, G. B.; SPARKS, S. E.; CASIDA, J. E. Fatty acid amide hydrolase inhibition by neurotoxic organophosphorus pesticides. **Toxicol Appl Pharmacol**, 173, n. 1, p. 48-55, May 15 2001.

RASHIDI, A.; DEFOR, T. E.; HOLTAN, S. G.; BLAZAR, B. R.; WEISDORF, D. J.; MACMILLAN, M. L. Outcomes and Predictors of Response in Steroid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. **Biol Blood Marrow Transplant**, 25, n. 11, p. 2297-2302, Nov 2019.

REGGIO, P. H. Endocannabinoid binding to the cannabinoid receptors: what is known and what remains unknown. **Curr Med Chem**, 17, n. 14, p. 1468-1486, 2010.

RESENDE, C. B.; REZENDE, B. M.; BERNARDES, P. T.; TEIXEIRA, G. M.; TEIXEIRA, M. M.; PINHO, V.; BITTENCOURT, H. Alemtuzumab as graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis strategy in a developing country: lower rate of acute GVHD, increased risk of cytomegalovirus reactivation. **Braz J Med Biol Res**, 50, n. 2, p. e5566, Feb 9 2017.

REZENDE, B. M.; BERNARDES, P. T.; RESENDE, C. B.; ARANTES, R. M.; SOUZA, D. G.; BRAGA, F. C.; CASTOR, M. G.; TEIXEIRA, M. M.; PINHO, V. Lithothamnion muelleri controls inflammatory responses, target organ injury and lethality associated with graft-versus-host disease in mice. **Mar Drugs**, 11, n. 7, p. 2595-2615, Jul 18 2013.

ROBAK, K.; ZAMBONELLI, J.; BILINSKI, J.; BASAK, G. W. Diarrhea after allogeneic stem cell transplantation: beyond graft-versus-host disease. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, 29, n. 5, p. 495-502, May 2017.

ROBIN, M.; PORCHER, R.; DE CASTRO, R.; FISHER, G.; DE LATOUR, R. P.; RIBAUD, P.; PETROPOULOU, A. D.; ROCHA, V.; DEVERGIE, A.; MARY, J. Y.; SOCIE, G. Initial liver involvement in acute GVHD is predictive for nonrelapse mortality. **Transplantation**, 88, n. 9, p. 1131-1136, Nov 15 2009.

ROBINSON, R. H.; MEISSLER, J. J.; FAN, X.; YU, D.; ADLER, M. W.; EISENSTEIN, T. K. A CB2-Selective Cannabinoid Suppresses T-Cell Activities and Increases Tregs and IL-10. **J Neuroimmune Pharmacol**, 10, n. 2, p. 318-332, Jun 2015.

ROSS, R. A.; GIBSON, T. M.; BROCKIE, H. C.; LESLIE, M.; PASHMI, G.; CRAIB, S. J.; DI MARZO, V.; PERTWEE, R. G. Structure-activity relationship for the endogenous cannabinoid, anandamide, and certain of its analogues at vanilloid receptors in transfected cells and vas deferens. **Br J Pharmacol**, 132, n. 3, p. 631-640, Feb 2001.

SALAGA, M.; MOKROWIECKA, A.; ZAKRZEWSKI, P. K.; CYGANKIEWICZ, A.; LEISHMAN, E.; SOBCZAK, M.; ZATORSKI, H.; MALECKA-PANAS, E.; KORDEK, R.; STORR, M.; KRAJEWSKA, W. M.; BRADSHAW, H. B.; FICHNA, J. Experimental colitis in mice is attenuated by changes in the levels of endocannabinoid metabolites induced

by selective inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH). **J Crohns Colitis**, 8, n. 9, p. 998-1009, Sep 2014.

SALMASO, V.; MORO, S. Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. **Front Pharmacol**, 9, p. 923, 2018.

SANBER, K.; SAVANI, B.; JAIN, T. Graft-versus-host disease risk after chimeric antigen receptor T-cell therapy: the diametric opposition of T cells. **Br J Haematol**, 195, n. 5, p. 660-668, Dec 2021.

SANDMAIER, B. M.; KORNBLIT, B.; STORER, B. E.; OLESEN, G.; MARIS, M. B.; LANGSTON, A. A.; GUTMAN, J. A.; PETERSEN, S. L.; CHAUNCEY, T. R.; BETHGE, W. A.; PULSIPHER, M. A.; WOOLFREY, A. E.; MIELCAREK, M.; MARTIN, P. J.; APPELBAUM, F. R.; FLOWERS, M. E. D.; MALONEY, D. G.; STORB, R. Addition of sirolimus to standard cyclosporine plus mycophenolate mofetil-based graft-versus-host disease prophylaxis for patients after unrelated non-myeloablative haemopoietic stem cell transplantation: a multicentre, randomised, phase 3 trial. **Lancet Haematol**, 6, n. 8, p. e409-e418, Aug 2019.

SCHICHO, R.; STORR, M. IBD: Patients with IBD find symptom relief in the Cannabis field. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, 11, n. 3, p. 142-143, Mar 2014.

SCHROEDER, M. A.; DIPERSIO, J. F. Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. **Dis Model Mech**, 4, n. 3, p. 318-333, May 2011.

SCHUSTER, S. J.; BISHOP, M. R.; TAM, C. S.; WALLER, E. K.; BORCHMANN, P.; MCGUIRK, J. P.; JAGER, U.; JAGLOWSKI, S.; ANDREADIS, C.; WESTIN, J. R.; FLEURY, I.; BACHANOVA, V.; FOLEY, S. R.; HO, P. J.; MIELKE, S.; MAGENAU, J. M.; HOLTE, H.; PANTANO, S.; PACAUD, L. B.; AWASTHI, R.; CHU, J.; ANAK, O.; SALLES, G.; MAZIARZ, R. T.; INVESTIGATORS, J. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. **N Engl J Med**, 380, n. 1, p. 45-56, Jan 3 2019.

SHULMAN, H. M.; CARDONA, D. M.; GREENSON, J. K.; HINGORANI, S.; HORN, T.; HUBER, E.; KREFT, A.; LONGERICH, T.; MORTON, T.; MYERSON, D. NIH Consensus

development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: II. The 2014 Pathology Working Group Report. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, 21, n. 4, p. 589-603, 2015.

SJOGREN, S.; RYBERG, E.; LINDBLOM, A.; LARSSON, N.; ASTRAND, A.; HJORTH, S.; ANDERSSON, A.; GROBLEWSKI, T.; GREASLEY, P. A new receptor for cannabinoid ligands in 2005 Symposium on the Cannabinoids. **Clearwater, FA: International Cannabinoid Research Society**, 2005.

SKAPER, S. D.; BURIANI, A.; DAL TOSO, R.; PETRELLI, L.; ROMANELLO, S.; FACCI, L.; LEON, A. The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 93, n. 9, p. 3984-3989, Apr 30 1996.

SOLINAS, M.; JUSTINOVA, Z.; GOLDBERG, S. R.; TANDA, G. Anandamide administration alone and after inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH) increases dopamine levels in the nucleus accumbens shell in rats. **J Neurochem**, 98, n. 2, p. 408-419, Jul 2006.

STANCIU, L. A.; DJUKANOVIC, R. The role of ICAM-1 on T-cells in the pathogenesis of asthma. **Eur Respir J**, 11, n. 4, p. 949-957, Apr 1998.

SUGIURA, T.; KONDO, S.; SUKAGAWA, A.; NAKANE, S.; SHINODA, A.; ITOH, K.; YAMASHITA, A.; WAKU, K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. **Biochem Biophys Res Commun**, 215, n. 1, p. 89-97, Oct 4 1995.

SZYSKA, M.; NA, I. K. Bone Marrow GvHD after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Front Immunol**, 7, p. 118, 2016.

TEIXEIRA, G. M.; BITTENCOURT, H.; DE MACEDO, A. V.; MARTINHO, G. H.; COLOSIMO, E. A.; REZENDE, S. M. Assessing the Influence of Different Comorbidities Indexes on the Outcomes of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in a Developing Country. **PLoS One**, 10, n. 9, p. e0137390, 2015.

THOMAZ, D. V.; DO COUTO, R. O.; GOLDONI, R.; MALITESTA, C.; MAZZOTTA, E.; TARTAGLIA, G. M. Redox Profiling of Selected Apulian Red Wines in a Single Minute. **Antioxidants (Basel)**, 11, n. 5, Apr 27 2022.

THOMAZ, D. V.; RODRIGUES, E. S. B.; MACHADO, F. B.; DE MACEDO, I. Y. L. J. T. N. P. o. S. Investigation of Cyclobenzaprine Interactions with P450 Cytochromes CYP1A2 and CYP3A4 through Molecular Docking Tools. 5, n. 2, p. 4001-4006, 2019.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **J Comput Chem**, 31, n. 2, p. 455-461, Jan 30 2010.

VERMA, N. K.; KELLEHER, D. An Introduction to LFA-1/ICAM-1 Interactions in T-Cell Motility. **Methods Mol Biol**, 1930, p. 1-9, 2019.

WALTERS, M. C.; PATIENCE, M.; LEISENRING, W.; ECKMAN, J. R.; SCOTT, J. P.; MENTZER, W. C.; DAVIES, S. C.; OHENE-FREMPONG, K.; BERNAUDIN, F.; MATTHEWS, D. C. Bone marrow transplantation for sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, 335, n. 6, p. 369-376, 1996.

WILL, A.; WYNN, R. Diagnosis of acute graft-versus-host disease. **Transplantation**, 81, n. 4, p. 505-506, Feb 27 2006.

WYSOCKI, C. A.; PANOSKALTSIS-MORTARI, A.; BLAZAR, B. R.; SERODY, J. S. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. **Blood**, 105, n. 11, p. 4191-4199, Jun 1 2005.

XHAARD, A.; ROCHA, V.; BUENO, B.; DE LATOUR, R. P.; LENGLET, J.; PETROPOULOU, A.; RODRIGUEZ-OTERO, P.; RIBAUD, P.; PORCHER, R.; SOCIE, G.; ROBIN, M. Steroid-refractory acute GVHD: lack of long-term improved survival using new generation anticytokine treatment. **Biol Blood Marrow Transplant**, 18, n. 3, p. 406-413, Mar 2012.

YANG, F.; LU, D.; HU, Y.; HUANG, X.; HUANG, H.; CHEN, J.; WU, D.; WANG, J.; WANG, C.; HAN, M.; CHEN, H. Risk Factors for Graft-Versus-Host Disease After Transplantation of Hematopoietic Stem Cells from Unrelated Donors in the China Marrow Donor Program. **Ann Transplant**, 22, p. 384-401, Jun 27 2017.

YESHURUN, M.; SHPILBERG, O.; HERSCOVICI, C.; SHARGIAN, L.; DREYER, J.; PECK, A.; ISRAELI, M.; LEVY-ASSARAF, M.; GRUENEWALD, T.; MECHOULAM, R.; RAANANI, P.; RAM, R. Cannabidiol for the Prevention of Graft-versus-Host-Disease after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Results of a Phase II Study. **Biol Blood Marrow Transplant**, 21, n. 10, p. 1770-1775, Oct 2015.

ZEISER, R.; BLAZAR, B. R. Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy. **N Engl J Med**, 377, n. 22, p. 2167-2179, Nov 30 2017.

ZHOU, L.; ZHOU, S.; YANG, P.; TIAN, Y.; FENG, Z.; XIE, X. Q.; LIU, Y. Targeted inhibition of the type 2 cannabinoid receptor is a novel approach to reduce renal fibrosis. **Kidney Int**, 94, n. 4, p. 756-772, Oct 2018.

## **8. Nota de agradecimento às agências de fomento:**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001; pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

O trabalho recebeu também apoio do Laboratório de Radiação Gamma do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), bem como do centro de bioterismo do Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz).

## 9. Anexo I – Trabalhos publicados relacionados ao trabalho

A seguir encontram-se dois artigos publicados sob a orientação da professora Marina G. M. C. Romero. Cujas temáticas se relacionam diretamente com os objetivos propostos pelo presente trabalho.

- I. “Cannabidiol Enhances Intestinal Cannabinoid Receptor Type 2 Receptor Expression and Activation Increasing Regulatory T Cells and Reduces Murine Acute Graft-versus-Host Disease without Interfering with the Graft-versus-Leukemia Response”, Este artigo foi resultado de meu trabalho de mestrado, sendo publicado em meu primeiro ano de doutorado.

DOI: <https://doi.org/10.1124/jpet.120.000479>.

- II. “Involvement of the cannabinoid system in chronic inflammatory intestinal diseases: opportunities for new therapies”. Trata-se de uma revisão feita em conjunto com uma egressa do curso de Especialização em Farmacologia.

DOI: <https://doi.org/10.5217/ir.2021.00160>.