

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -  
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**EFEITO DO USO DE CANABIDIOL NA DOENÇA  
DO ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO EM  
CAMUNDONGOS**

Belo Horizonte

2018

**BÁRBARA BETÔNICO BERG**

**EFEITO DO USO DE CANABIDIOL NA DOENÇA DO  
ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO EM  
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

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

Belo Horizonte  
2018

043 Berg, Bárbara Betônico.  
Efeito do uso de Canabidiol na doença do enxerto-contra-hospedeiro em camundongos [manuscrito] / Bárbara Betônico Berg. - 2018.  
112 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Marina Gomes Miranda e Castor Romero.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Canabidiol. 2. Canabinoides. 3. Doença Enxerto-Hospedeiro. 4. Efeito Enxerto vs Leucemia. 5. Fatores de Transcrição Forkhead. I. Romero, Marina Gomes Miranda e Castor. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615

## Folha de aprovação

# "EFEITO DO USO DE CANABIDIOL NA DOENÇA DO ENXERTO VERSUS HOSPEDEIRO EM CAMUNDONGOS"

**BÁRBARA BETÔNICO BERG**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **04 de dezembro de 2018**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



**PROF. DR. ANTÔNIO CARLOS PINHEIRO DE OLIVEIRA**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**PROFA. DRA. LUCÍOLA DA SILVA BARCELOS**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**PROFA. DR. MARINA GOMES MIRANDA E CASTOR ROMERO**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ORIENTADO

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

**Belo Horizonte, 04 de dezembro de 2018.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos colegas de laboratório Alexandre, Patrícia, Karla, Tales, Karol, Pedro, Polly, Fábio, Isabela, Isabela Sá, Renata, André pelo apoio, convivência, amizade e lanchinhos.

Um agradecimento especial a Marcelle, pela amizade, por me trazer ao laboratório e por ser a melhor amiga que se poderia ter; para Jaque, que me ensinou tudo sobre GVHD e me treinou nos experimentos e para o Lucas, que sempre trouxe alegria para nossas tarefas diárias.

Agradeço ao Eduardo por sempre me apoiar e incentivar, independente de quantos finais de semana tivesse que dedicar ao laboratório. Agradeço também à minha família que me incentivou a seguir a área acadêmica.

A todos os professores do departamento de Fisiologia e Farmacologia pelos ensinamentos. Ao Stêfany por toda a sua paciência e carinho e ao Webster por me salvar em diversas ocasiões.

À professora Marina, que me deu uma oportunidade no laboratório, pelo qual tenho muito carinho, e por toda a paciência para comigo. E ao professor Mauro M. Teixeira e ao professor Thiago Romero por todo o apoio no desenvolvimento deste projeto.

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.

*“You live and learn. At any rate, you live.”*

*“I may not have gone where I intended to go.  
But I have ended up where I needed to be.”*

Douglas Noël Adams

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-HT1A** - 5-hidroxitriptamina 1<sup>a</sup> ou receptor de serotonina 1A
- A2A** - receptor de adenosina
- aGVHD** – acute Graft-versus-Host-disease ou GVHD aguda
- APC** - 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 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
- cGVHD** - chronic Graft-versus-Host-disease ou GVHD crônica
- Co-60** - Cobalto 60
- DAMPs** - Padrões Moleculares Associados a Danos
- EBMT** - European Society of Blood and Marrow Transplantation
- ELISA** – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ou ensaio de imunoenzimático
- FoxP3** - Forkhead helix transcription factor p3
- GFP** - green fluorescent protein ou proteína verde fluorescente
- GPR55** - receptor acoplado a proteína G 55
- 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
- IL-17** – interleucina 17
- INF- $\gamma$**  - interferon gama
- JI** – Jejunó-íleo
- MHC** - complexo principal de histocompatibilidade
- miHA** - antígeno de histocompatibilidade menor

**NIH** - National Institutes of Health

**PAMPs** - Padrões Moleculares Associados a Patógenos

**PBS** – tampão salina fosfato

**PFA** - paraformaldeído

**PPAR $\gamma$**  - receptore ativado por proliferador de peroxissoma gama

**rpm** - rotações por minuto

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

**SBF** – Soro fetal bovino

**TMO** – Transplante de Medula óssea

**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



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. PROGRESSÃO DE EVENTOS DURANTE A AGVHD EM CAMUNDONGOS.....	18
FIGURA 2. FORMULAS QUÍMICAS DOS PRINCIPAIS CANABINOIDES COM POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO, JÁ DESCRITO.....	27
FIGURA 3. INDUÇÃO DA GVHD. ....	37
FIGURA 4. TRATAMENTOS COM ANTAGONISTAS E POSTERIORMENTE COM CBD.. ....	38
FIGURA 5. ESCALA CLÍNICA. A ESCALA, OU SCORE CLINICO.....	39
FIGURA 6. LÂMINA DE JEJUNO-ÍLEO .....	40
FIGURA 7. CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE SECÇÕES DE JEJUNO-ÍLEO. ....	41
FIGURA 8. CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE SECÇÕES DE FÍGADO.. ....	42
FIGURA 9. CURVA PADRÃO PARA ELISA. ....	43
FIGURA 10. PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DE RECRUTAMENTO CELULAR. ....	45
FIGURA 11. VÊNULA COM CÉLULAS GFP+. A .....	45
FIGURA 12. PORCENTAGEM DE QUIMERIZAÇÃO DE ANIMAIS TRATADOS COM VEÍCULO E ANIMAIS TRATADOS COM CANABIDIOL.....	53
FIGURA 13. DETALHAMENTO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA QUIMERIZAÇÃO. ....	54
FIGURA 14. CURVA DE SOBREVIVÊNCIA. ....	55
FIGURA 15. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS DOS ANIMAIS. ....	56
FIGURA 16. FOTOMICROSCOPIA DO JEJUNO-ILEO .....	58
FIGURA 17. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DANOS DE HISTOPATOLOGIA.....	59
FIGURA 18. ANÁLISE DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS ATRAVÉS DE ELISA EM AMOSTRAS DE JEJUNO-ÍLEO. ....	61
FIGURA 19. ANÁLISE DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS ATRAVÉS DE ELISA EM AMOSTRAS DE FÍGADO. ....	62
FIGURA 20. ANÁLISE DE MIGRAÇÃO CELULAR. ....	63
FIGURA 21. QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS CD4 <sup>+</sup> NO JEJUNO-ÍLEO. ....	65
FIGURA 22. QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS CD8 <sup>+</sup> NO JEJUNO-ÍLEO.....	66
FIGURA 22. QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS CD28 <sup>+</sup> NO JEJUNO-ÍLEO.....	68
FIGURA 23. QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS FoxP3 <sup>+</sup> NO JEJUNO-ÍLEO.....	69

FIGURA 24. QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS CD4 <sup>+</sup> NO FÍGADO. ....	70
FIGURA 25. QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS CD8 <sup>+</sup> NO FÍGADO. ....	71
FIGURA 26. QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS CD28 <sup>+</sup> NO FÍGADO. ....	73
FIGURA 27. QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOSFOXP3 <sup>+</sup> NO FÍGADO.. ....	74
FIGURA 28. QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS CD4 <sup>+</sup> NO BAÇO. ....	75
FIGURA 29. QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS CD8 <sup>+</sup> NO BAÇO.. ....	76
FIGURA 30. QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS CD28 <sup>+</sup> NO BAÇO. ....	78
FIGURA 31. QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS FOXP3 <sup>+</sup> NO BAÇO.. ....	79
FIGURA 32. EFEITO GVL EM CÉLULAS P815+GFP+. ....	81
FIGURA 33. LINFONODOS MESENTÉRICOS E IGUINAIS. ....	82
FIGURA 34. TRATAMENTO COM CBD E AM251 EM CONJUNTO COM CBD.....	83
FIGURA 35. TRATAMENTO COM CBD E AM630 EM CONJUNTO COM CBD.....	84
FIGURA 36. FIGURA ADAPTADA DE PANOSKALTSIS-MORTARI ET.AL. (2016). ....	89
FIGURA 37. ATIVAÇÃO DO RECEPTOR CB2 É PARTE DO MECANISMO REGULATÓRIO DE CBD. .....	97

## RESUMO

O transplante de medula óssea (TMO) é uma terapia curativa para diversas enfermidades de origem hematológica, tumores e cânceres, bem como para algumas doenças de origem autoimune. A principal preocupação em relação ao TMO é que pacientes que recebem transplante alogênico ou semialogênico podem desenvolver a doença do enxerto-contra-hospedeiro (*Graft versus host disease* – GVHD), em que as células da medula transplantada reconhecem diferenças antigênicas entre o doador e o receptor iniciando uma resposta efetora contra o organismo do receptor. A incidência de GVHD em humanos é de 30-60% (Martin *et al.*, 2015) e, dentre aqueles que desenvolvem a doença, há uma taxa de 50% de mortalidade (Barton-Burke, 2008). Atualmente, o principal tratamento de GVHD é o uso ininterrupto de altas doses de corticoides, que levam à imunodepressão e aumentam as chances de recidiva tumoral. Desta forma, nosso objetivo foi avaliar se o Canabidiol (CBD), um potente anti-inflamatório e principal constituinte não psicoativo da *Cannabis sativa*, seria capaz de reduzir os danos causados pela GVHD. As ações do CBD foram avaliadas em modelo murino de GVHD, induzida através do transplante de medula ( $1 \times 10^7$  células) e esplenócitos ( $3 \times 10^7$  células) de camundongos C57BL/6j para Balb/C. Os animais receptores foram tratados diariamente com CBD (30mg/Kg) ou veículo (5% Tween80) por sete dias, sendo então eutanasiados e os tecidos coletados para análises histopatológicas, ELISA e citometria de fluxo. CBD não apenas gerou aumento da sobrevivência, como também reduziu os níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CCL2, CCL3 e CCL5 no intestino e aumento do número de linfócitos FoxP3<sup>+</sup> neste mesmo órgão. Entretanto, no fígado, o tratamento com CBD levou à redução de IFN- $\gamma$  e CCL3, mas não alterou o número de linfócitos FoxP3<sup>+</sup>. Além disso, CBD também não alterou efeito citotóxico do enxerto-contra-tumor e, em estudo com antagonistas CB1 e CB2, se mostrou parcialmente dependente deste receptor canabinoide para exercer seu efeito na sobrevivência dos camundongos com GVHD, mas não de CB1. De acordo com nossos dados, CBD se apresenta como um tratamento em potencial para a GVHD devido a seus efeitos imuno-regulatórios e ao aumento de sobrevivência, relacionado ao receptor CB2.

**Palavras-chave:** GVHD, Canabidiol, FoxP3, GVL, canabinoides.

## ABSTRACT

Bone-marrow transplant (BMT) is a curative therapy for several hematological diseases, tumors, cancers and even some autoimmune diseases. However, the main concern about BMT is that patients that undergo allogenic or semi-allogenic transplants might develop a secondary disease known as Graft versus host disease (GVHD), in which the bone marrow transplanted cells recognize antigenic disparities between donor and host, leading to an active immune response against the host organism. The incidence of GVHD in humans ranges from 30 to 60% (Martin *et al.*, 2015) and, among those who develop this disease, the mortality rate is up to 50% (Barton-Burke, 2008). Currently, the main treatment for GVHD is the permanent and unceasing usage of high doses of corticosteroids, that lead to immune suppression and increases the chances of tumor reoccurrence. Therefore, our goal was to evaluate the actions of CBD, a potent anti-inflammatory drug and main non-psychoactive component of *Cannabis sativa*, in a murine model of GVHD, induced by the transplant of bone marrow cells ( $1 \times 10^7$ ) and splenocytes ( $3 \times 10^7$ ), from C67BL-6j to Balb-c mice. The mice host were daily treated with CBD (30mg/Kg) or vehicle (5% Tween80) for seven days, starting on the day of the transplant, the mice were then euthanized and their tissues were collected for histopathological, ELISA and flow cytometry analyses. CBD not only led to an increase in survival rates, but also reduced the levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CCL2, CCL3 and CCL5 in the intestines, also increasing the number of FoxP3<sup>+</sup> lymphocytes. However, in the liver, the treatment with CBD led to the reduction only of IFN $\gamma$  and CCL3, but the number of FoxP3<sup>+</sup> lymphocytes were not altered. Besides, CBD also did not affect the cytotoxic effect against tumor or graft-versus-tumor effect (GVL) and, in a study with CB1 and CB2 antagonists, CBD demonstrated to be partially dependent of CB2, but not CB1 cannabinoid receptor to promote an increased survival. Therefore, according to this data, CBD is a potential treatment for GVHD due to its immunomodulatory and the increased survival, related to CB2 cannabinoid receptor.

**Key-words:** GVHD, cannabidiol, FoxP3, GVL, cannabinoids.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1. <i>Doença do enxerto-contra-hospedeiro (GVHD)</i> .....	16
1.2.1. <i>Tratamentos</i> .....	22
1.2.2. <i>Modelo experimental de GVHD</i> .....	24
1.3. <i>Sistema canabinoide</i> .....	26
1.3.1. <i>Canabidiol</i> .....	30
<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>31</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
3.1. <i>Objetivo Geral</i> .....	34
3.2. <i>Objetivos Específicos</i> .....	34
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
4.1. <i>Animais</i> .....	36
4.2. <i>Indução da doença do enxerto-contra-hospedeiro (GVHD) aguda</i> .....	36
4.3. <i>Grupos experimentais</i> .....	37
4.4. <i>Tratamentos utilizados</i> .....	38
4.5. <i>Avaliação de parâmetros clínicos</i> .....	39
4.6. <i>Análise Histológica</i> .....	40
4.6.1. <i>Avaliação dos parâmetros histopatológicos</i> .....	41
4.7. <i>Quantificação de citocinas e quimiocinas</i> .....	43
4.8. <i>Análise de recrutamento celular</i> .....	44
4.9. <i>Resposta do enxerto-contra-o-tumor (Graft-versus-leukemia - GVL)</i> .....	46
4.10. <i>Citometria de Fluxo</i> .....	47
4.11. <i>Análise estatística</i> .....	50
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
5.1. <i>Efeito do CBD sobre a quimerização após o transplante</i> .....	52
5.2. <i>Efeito do CBD na sobrevivência de camundongos com GVHD</i> .....	54
5.3. <i>Efeito do CBD na evolução clínica de camundongos com GVHD</i> .....	55
5.4. <i>Efeito do CBD sobre a lesão intestinal e hepática em camundongos com GVHD</i> .....	57

5.5. Efeito do CBD sobre a concentração de citocinas e quimiocinas no intestino e no fígado de camundongos com GVHD .....	60
5.6. Efeitos do CBD sobre o recrutamento de células inflamatórias para o intestino de camundongos com GVHD .....	63
5.7. Citometria de fluxo .....	64
5.8. Graft-versus-leukemia (GVL).....	80
5.9. Participação dos receptores CB <sub>1</sub> e CB <sub>2</sub> no efeito do tratamento com CBD na sobrevivência de camundongos com GVHD.....	83
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>96</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>98</b>

# ***INTRODUÇÃO***

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Doença do enxerto-contra-hospedeiro (GVHD)

Após o término da segunda guerra mundial, dentre os sobreviventes às detonações atômicas, residentes das cidades de Hiroshima e Nagasaki, no Japão, começaram a falecer devido a uma “doença primária” ou aplasia de medula óssea. No intuito de salvar estes pacientes, foi realizada transfusão intravenosa de células de medula óssea de doadores saudáveis. Entretanto, apesar de adiar a mortalidade, a terapia resultou em uma “doença secundária” que também poderia levar os pacientes ao óbito (Vriesendorp et al., 2016).

Esta doença secundária ao transplante de medula óssea (TMO), que se resume em um conjunto de reações imunes, foi nomeada “Doença do enxerto-contra-hospedeiro” ou *Graft-versus-host disease* (GVHD) por Van Bekkum em 1956, sendo que este foi, também, o responsável por identificar as variáveis que levavam ao surgimento da GVHD e por estabelecer modelos experimentais clássicos, como o uso de cães da raça Beagle, para o estudo da doença (Dicke et al., 1973). Esta doença é a principal complicação decorrente do TMO e leva à resistência médica em optar por esta terapia (Margaret Barton-burke et al., 2008; Shlomchik et al., 2007; Ferrara et al., 2009). A GVHD é também a maior causa de morte, não relacionada à reincidência tumoral, em pacientes que realizam o TMO (Major-Monfried, 2018). No entanto, o TMO é a principal terapia curativa utilizada para o tratamento de doenças de origem hematológica, tais como: leucemias (Gale, 1981), anemia falciforme (Walters, et al., 1996), talassemias (Lucarelli et al., 1990), anemia aplástica (Locasciulli et.al, 2007) e vem surgindo como uma alternativa terapêutica para o tratamento de tumores sólidos, linfomas (Hartmann, 1997; Curtis, 1997) e também para doenças autoimunes como lúpus (Marmont, 1994; Gladstone, 2017).

Dentre os pacientes que desenvolvem GVHD, a taxa de mortalidade também é alta, chegando a 50% dos casos (Margaret Barton-burke et al., 2008). A GVHD surge quando as células T oriundas do transplante reconhecem disparidades antigênicas entre o doador e o receptor, ou seja, o HLA das células do receptor e das células transplantadas será suficientemente distinto para ativar mecanismos imunológicos, gerando uma reação inflamatória que irá causar danos aos tecidos do hospedeiro (Devergie et al., 2008). Desta forma, uma vez ativadas estas



células se diferenciam em células, T CD4 e T CD8, efectoras que migram para os órgãos alvo da doença, recrutam outros tipos celulares e levam à inflamação do tecido alvo e sua consequente destruição (MacDonald et al., 2017) (Figura 1).

As manifestações clínicas da GVHD são caracterizadas pelo extenso dano a diversos órgãos e sistemas, incluindo o trato gastrointestinal, fígado, pele e pulmões, de forma que estes últimos são considerados órgãos alvo da doença (Devergie et al., 2008). Historicamente, a GVHD é diferenciada entre aguda (aGVHD), ou seja, aquela que se inicia até 100 dias após o transplante; e crônica (cGVHD), caso fosse iniciada após 100 dias do transplante, independente da sintomatologia (Vigorito et al., 2009). Entretanto, em 2005 o *National Institutes of Health* (NIH) elaborou um consenso que passou a definir que o diagnóstico entre aGVHD e cGVHD seria feito através das manifestações clínicas e não pelo tempo após o transplante.

Desta forma, a aGVHD é definida por *rash* eritematoso, sintomas gastrointestinais, hepatite colestática, infiltrado de células T e apoptose tecidual, (Zeng et al., 2018) sendo ainda dividida em aGVHD clássica, ocorrendo em até 100 dias após o transplante e aGVHD tardia, sendo esta última persistente, recidiva e de aparecimento tardio. Já na cGVHD o paciente apresentaria hiperbilirubinemia, poiquilodermia, líquen plano e escleroso na pele e mucosas, estenose esofaríngea, bronquiolite obliterante, fascite e outros. (Flipovich, 2005). Mesmo com o avanço das pesquisas e tratamentos profiláticos, Yang et.al. (2017) encontraram uma incidência de 49.29% e 27.3%, para GVHD aguda e crônica, respectivamente em humanos.

A incidência da GVHD depende de diversos fatores etiológicos, como o tipo de transplante realizado, compatibilidade entre o doador e o receptor, regime de condicionamento, idade, medicação preventiva, doença prévia, dentre outros.

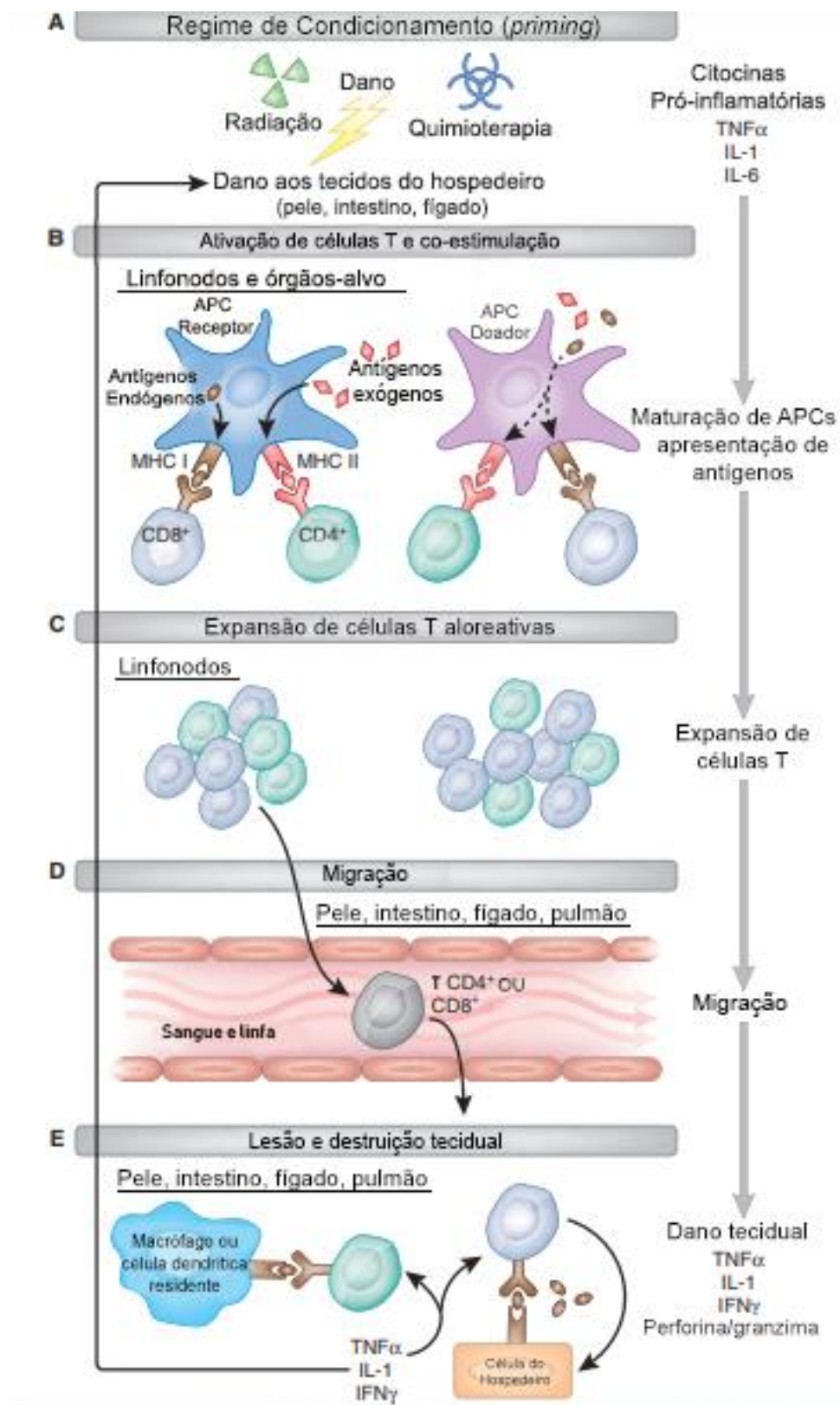


Figura 1. Progressão de eventos durante a aGVHD em camundongos. Os cinco passos cruciais são (A) Regime de condicionamento (*priming*), (B) ativação, (C) expansão de células T, (D) migração de células T e (E) lesão e destruição tecidual. Adaptado de Schroeder et al., 2011.

Existem alguns tipos de transplante que podem ser realizados, autólogo, singênico e alogênico; sendo o primeiro relativo ao transplante de células do

18

próprio paciente, o segundo quando o paciente possui um doador geneticamente idêntico e o terceiro, chamado de transplante alogênico de células hematopoiéticas (HSCT), recebe este nome por ser realizado entre indivíduos geneticamente distintos, mas suficientemente compatíveis (Beatty et al., 1995; Ljungman et al., 2006). Quanto maior o grau de compatibilidade (8/8 alelos), maior serão as chances de sobrevida do paciente, de forma que a incompatibilidade de apenas um alelo (7/8) leva à redução de mais de 10% das chances de sobrevida do paciente (Lee et al., 2007). Apesar de o transplante alogênico levar ao aumento da incidência da GVHD, as células T maduras contidas nos aloenxertos reconstituem a imunidade e podem ser tornar ativas contra células tumorais remanescentes da doença de origem do hospedeiro (Shlomchik et al., 2007). Esta ação antitumoral recebe o nome de *Graft-versus-Leukemia* (GVL), sendo um argumento importante na decisão médica em seguir com o HSCT como opção terapêutica. Deve-se ressaltar que, apesar da maior probabilidade de que os pacientes desenvolvam GVHD, o transplante alogênico proporciona um maior efeito GVL quando comparado a outros tipos de transplante (Kolb, 2008). Conclui-se, portanto, que uma terapia ideal à pacientes com GVHD seria o uso de fármacos que modulassem a resposta inflamatória ao invés de suprimi-la, criando equilíbrio entre o GVL e a GVHD (Van-Besien, 2013).

Segundo a *European Society of Blood and Marrow Transplantation* (EBMT) mais de cinquenta mil transplantes são realizados anualmente de forma cosmopolita, deste número, cerca de 43% correspondem a transplantes alogênicos (Passweg et al., 2017; Gratwohl, 2018). Segundo Vriesendrop & Heidt (2016), o primeiro relato de ampla utilização do HSCT se deu após a segunda guerra mundial, em que sobreviventes de Hiroshima e Nagasaki passaram a morrer devido a uma “doença primária” decorrente da irradiação de corpo total oriunda da radiação da bomba nuclear. Como medida de urgência os pacientes receberam transplante de células de medula óssea, que, em um primeiro momento, levaram à melhora dos sintomas da doença primária e elevaram a sobrevida dos pacientes. Entretanto, os pacientes passaram a morrer de uma “doença secundária” (Vriesendrop & Heidt, 2016). Thomas et.al. (1979) introduziram o HSCT para pacientes com leucemia e, apesar da metodologia envolvida ter progredido imensamente desde então, até hoje a maior causa

*mortis* dos pacientes que sobrevivem ao transplante permanece sendo o conjunto de reações imunológicas que se sucede ao HSCT (Singh et al., 2016).

A origem das células a serem utilizadas no transplante também pode influenciar o resultado do transplante (Sakellari et.al, 2018). Células originárias de cordão umbilical, mesmo quando há diferença de até três antígenos no HLA e o doador não é aparentado, irão levar a uma incidência muito menor de GVHD aguda (aGVHD), sendo esta cerca de 11% (Wagner et al., 1996; Ferrara et al., 2005). Sendo assim, deve-se ainda salientar que o principal fator que leva à GVHD, é a compatibilidade do doador e do receptor. O grau de compatibilidade se dá pela comparação dos antígenos de histocompatibilidade humana (HLA). Tradicionalmente os antígenos HLA de classe I (HLA-A e HLA-B) e o antígeno de classe II (HLA-DR $\beta$ 1) têm sido mais utilizados para avaliar o grau de compatibilidade entre doador e receptor, entretanto, outros antígenos de HLA, como HLAC, HLADQ, e HLADP também se mostraram importantes na aGVHD e diferenças de apenas um *locus* podem ser determinantes para o desenvolvimento de GVHD (Cutler & Antin, 2009). Há ainda os antígenos de histocompatibilidade menor (miHA) que, associados a quaisquer HLA, podem ser apresentados a células apresentadoras de antígenos (APC), levando à uma reposta imune.

O regime de condicionamento, ou seja, o procedimento realizado através de radiação letal ou subletal (Gonzales et al., 2002), ou por drogas imunossupressoras (Mapara et al., 2006) a fim de reduzir as chances de rejeição levando à destruição total ou parcial das células do sistema imune do receptor é realizado antes do transplante das células de medula no doador para o receptor. Estes procedimentos são realizados com o intuito de eliminar o sistema imune do receptor, tornando-o menos suscetível a eventos de rejeição e facilitando o processo de quimerização com a nova medula.

É interessante ressaltar que o tempo de duração deste regime e o grau de letalidade são proporcionais à maior incidência da GVHD, de forma que um regime de duração mais longo, ou radiação em doses letais, levarão à maior destruição tecidual do hospedeiro antes do transplante, criando um ambiente pró-inflamatório antes mesmo que seja realizado o HSCT. A idade do hospedeiro é um importante fator que irá influenciar o regime de condicionamento a ser escolhido, de forma que paciente com mais de 50 anos não devem ser sujeitos a

regimes que causem mielo-ablação (Alyea et al., 2006). O regime de condicionamento também pode sofrer variações de acordo com o estágio e tipo de doença prévia que acometia o paciente (Goyal et al., 2015; Yang et al., 2017).

A GVHD é, portanto, uma desordem imunológica que pode ocorrer mesmo quando há profilaxia agressiva com imunossupressores tais como: imunossupressores e corticoides. Os corticóides 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, como 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 disso, de 30% a 60% dos pacientes adquirem resistência ao fármaco e desenvolvem a DECH refrataria ao corticoide, a qual tem uma taxa de sobrevida entre 30 a 40% (XHAARD et al., 2015). (Devergie et al., 2008). Imunossupressores também vêm sendo utilizados como profilaxia e durante o regime de condicionamento. Este é o caso do fármaco alemtuzumab, um anticorpo anti-CD32 (Rezende et al., 2017; Teixeira et al., 2015) e outros fármacos, como Sirolimus (Sandmaier et al., 2016), ciclosporina (Zeiser et al., 2017) ou tacrolimus (Ganetsky et al., 2016).

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 também reduza a probabilidade de desenvolvimento desta doença.

### 1.2.1. Tratamentos

Não existe unanimidade na comunidade científica em relação a um regime padrão a ser recomendado para a profilaxia do GVHD e devido a isso, existe também grande variação quanto à opção terapêutica (Ram & Storb, 2013). Entretanto, a terapia mais comum para pacientes que passaram por regime de mieloablação consiste na combinação de ciclosporina e metotrexato, um inibidor de ácido fólico. Apesar de o mecanismo preciso de prevenção da GVHD através do metotrexato não estar completamente esclarecido, sabe-se que este fármaco atua como imunossupressor e seus efeitos apenas são significantes na presença de ciclosporina. A ciclosporina, por sua vez, é um inibidor de calcineurina, que irá agir no bloqueio do sinal cálcio-dependente, e conseqüentemente a transdução de sinais para produção de IL-2 e ativação de células T, sendo também imunossupressora (Hows et al., 1983). Desta forma, independente do tipo de GVHD, o tratamento atual permanece sendo o uso crônico e contínuo de altas doses de fármacos imunossupressores.

Assim como a ciclosporina, tacrolimus é um fármaco inibidor da ativação de linfócitos T (Bishop & Li, 1992) Entretanto, ao contrário da ciclosporina, tacrolimus é capaz de abolir a conversão de linfócitos precursores em linfócitos T-regulatórios, apresentando atividade imunossupressora até cem vezes maior que a ciclosporina (Bishop & Li, 1992). Este fármaco pode ser utilizado em combinação com Sirolimus, uma lactona macrolítica e lipofílica que inibe linfócitos T citotóxicos enquanto mantém o efeito GVHD relacionado às células T-regulatórias (Johnscen, 2002; Abouelnasr et al., 2013).

Um fármaco mais recente que vem sendo utilizado é o Alemtuzumab, um anticorpo monoclonal humanizado do subtipo IgG1 que age contra os antígenos CD52 humanos, tanto em linfócitos T quanto linfócitos B, levando à lise destas células. Alguns estudos tem demonstrado a eficiência deste regime profilático em prevenir o desenvolvimento de aGVHD e cGVHD, devido à depleção de células T e B (Hamblin et al., 1996). Entretanto esta terapia ainda é recente e necessita de maiores estudos.

Os anti-inflamatórios esteroidais compõe outra classe de fármacos que podem ser utilizados no regime profilático, entretanto, é mais comumente utilizado no tratamento da GVHD. Corticoides exercem ação linfocítica, levando

também à redução de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  (Cohen et al., 1970; Holler & Kolb, 1993). Sendo assim, fármacos imunossupressores, como os corticoides (Vicent et al., 2010), aumentam as chances de infecções e outras complicações (Ferrara et al., 2009). De forma que a primeira linha de tratamento consiste no uso de fármacos imunossupressores como a Ciclosporina, um inibidor de calcineurina, junto a corticoides (Devergie et al., 2008). Portanto, o tratamento com corticoides, de forma sistêmica, vem sendo utilizado para controlar os danos causados pela GVHD, não sendo, de forma alguma, uma terapia curativa.

Está claro que a imunossupressão a longo prazo não é uma abordagem ideal ou segura, não sendo sequer efetiva em pacientes que apresentem GVHD refratária (Luft et al., 2011), aumentando a probabilidade de infecções oportunistas, como as fúngicas (Stanghellini et al., 2017), e também a probabilidade de recidiva tumoral (Van-Besien, 2013).

Existe, portanto, a necessidade de novos tratamentos e terapias curativas, cujo progresso tem sido retardado pelo diagnóstico complexo da GVHD (Arai et al., 2011; Jacobsohn et al., 2012), falta uniformidade nos critérios de resposta do tratamento (Shulman et al., 2015), escassez de ensaios controlados (Martin et al., 2015) e pouco acesso à novas terapias estabelecidas conceitualmente fortes ou com forte base fisiopatológica em modelos pré-clínicos (Macdonald et al., 2017). O potencial terapêutico completo do HSCT não será alcançado até que seja possível minimizar a incidência de GVHD ao mesmo tempo em que são mantidos os efeitos benéficos, como o GVL (Shlomchik et al., 2007).

### 1.2.2. Modelo experimental de GVHD

A despeito de o primeiro HSCT ter sido realizado em humanos em 1957 e haverem inúmeros relatos de transplantes em animais e entre diferentes espécies, apenas em 1995, Krenger et.al. elaboraram um modelo murino de HSCT, sendo este facilmente replicável. No modelo proposto por Krenger et al., 1995, eram transplantadas  $5 \times 10^5$  células de medula óssea extraídas de camundongos B6.C-H2bm12 fêmeas para camundongos B6.PL-Thy1a também fêmeas.

Existem diversos protocolos abrangendo diferentes modelos experimentais, entretanto, a progressão de eventos na aGVHD, se mantém a mesma. De forma que a indução da doença se inicia com o regime de condicionamento para ablação da medula do animal receptor, em seguida é realizado o do transplante alogênico ou semi-alogênico, de células de um animal doador, ativação e proliferação celular devido a disparidades antigênicas, culminando em uma resposta inflamatória intensa levando a dano tecidual. Este dano tecidual será traduzido em perda de peso, diarreia grave, alterações epiteliais e alta mortalidade (Schroeder et al., 2011). Desta forma, a maioria dos modelos de aGVHD envolve o transplante de diferentes classes fenotípicas de linfócitos T de animais doadores para animais receptores letalmente irradiados (Schroeder et al., 2011).

A gravidade da aGVHD em cada modelo irá depender de diversos fatores, como a quantidade e o tipo celular transplantado (Edinger et al., 2003); dose de radiação, sendo diretamente proporcional ao grau de dano tecidual e à liberação de citocinas subsequentes e também à mortalidade associada a aGVHD (Schwarte et al., 2007). Schroeder et al., 2011, salienta ainda que diferentes linhagens de camundongo apresentam diferentes suscetibilidades ao desenvolvimento da doença, de forma que linhagens que sofreram maior *inbreeding* serão mais suscetíveis, sendo assim, animais Balb-c são mais propensos que animais C57BL/6j. Em suma, disparidades antigênicas são o fator determinante na aGVHD, de forma que mesmo que o receptor seja compatível ao doador a nível de MHC, disparidades de miHas levarão ao desenvolvimento da doença.



O modelo, com disparidade de MHC, mais utilizado para o estudo da aGVHD é o transplante de doadores C57BL/6j (H2D<sup>b</sup>) para BALB-c (H2D<sup>d</sup>) receptores, cujo regime de condicionamento inclui doses distanciadas de radiação de aproximadamente 9Gy. Estes animais irradiados recebem, então, células de medula óssea e esplenócitos irradiados (Schroeder et al., 2011). Entretanto, modelos envolvendo uso de linhagens transgênicas com MHC mutante ou cuja indução envolve o transplante seletivo de linfócitos CD4+ ou CD8+ tem-se tornado mais comuns, no intuito de estudar diferentes mecanismos que podem influenciar no desenvolvimento e grau da GVHD.

Por fim, é importante observar que, além dos modelos de transplante murino, existem também modelos xenogênicos. Neste tipo de modelo, são transplantadas células humanas para camundongos, no intuito de estudar aGVHD mediada por células T humanas *in vivo*. O principal desafio deste modelo é, entretanto, o baixo grau de quimerismo obtido devido à alta disparidade entre doador e receptor (van Rijn et al., 2003). Atualmente o modelo xenogênico mais utilizado envolve o transplante de células humanas mononucleares de sangue periférico, que levam o animal a desenvolver uma síndrome similar à aGVHD, levando ao aumento de infiltrado de células T na pele, fígado, intestinos, pulmões e rins dos animais receptores (Ito et al., 2009).

Estes protocolos vêm, também, servindo como base para a busca de novos fármacos com potencial profilático e terapêutico contra a GVHD, como a Evasina-1, proteína ligante de quimiocinas, que se liga com alta afinidade à CCL3, reduzindo a resposta inflamatória nos órgãos alvo do hospedeiro (Castor et al., 2010) e, mais recentemente, o Abatacept um modulador da co-estimulação, que atua sobre a célula T, inibindo principalmente a ligação entre a molécula co-estimulatória CD28 das células T com a B7 das células apresentadoras de antígenos, reduzindo sua ativação e, conseqüentemente, sua função efetora contra os tecidos do hospedeiro (Chaudhury et al., 2018).

### 1.3. Sistema canabinoide

O sistema canabinoide é composto pelos receptores canabinoides, canabinoides endógenos e as enzimas responsáveis por sua produção e degradação. Desta forma, canabinoides induzem seus efeitos biológicos através da interação com receptores específicos (CB), receptor canabinoide 1 (CB1), presente em grandes proporções nos tecidos nervosos sendo um dos GPCRs mais abundantes no cérebro (Sharkey et al., 2016); e receptor canabinoide 2 (CB2), majoritariamente expresso em células do sistema imune (Adams et al., 2018). Além de estes receptores estarem constitutivamente presentes em abundância no sistema imune, nos órgãos linfoides e células imunes (Galiegue e cols., 1995, Cabral e Griffin-Thomas, 2009), podem também ser induzidos em processos inflamatórios (Massi e cols., 2006; Tanasescu e Constantinescu, 2010; Burstein e Zurier, 2009). Os receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> do sistema endocanabinoide são acoplados a proteína G, especificamente a família Gi (KLEIN, 2005), cujos principais efeitos são a inibição da adenilato ciclase, a menor formação de AMPc e conseqüentemente a menor ativação de proteínas quinases (RANG et al., 2011). A ativação da proteína Gi leva à modulação de diversos fatores de transcrição que possuem papel importante na ativação e proliferação celular, na inflamação, apoptose, resposta imunitária (RANG et al., 2011).

Canabinoides são moléculas lipídicas, podendo ser de origem sintética endógena ou natural. Dentre os canabinoides de origem endógena, ou Endocanabinoides, destacam-se Palmitoiletanolamida, Anandamida, 2-araquinoil-glicerol e Oleoiletanolamina, sendo moléculas naturalmente produzidas pelo organismo e sendo importante na regulação de funções biológicas, como processos inflamatórios.

Os canabinoides naturais são oriundos da planta *Cannabis sativa*, e são chamados de Fitocanabinoides, dentre os quais se destacam  $\Delta^9$ THC, Canabinol e Canabidiol (Figura 2). A *Cannabis sativa*, tem sua utilização descrita desde 2737 a.C., sendo prescrita pelo imperador Shen-Nung para tratamento de diversas patologias, dentre elas doenças autoimunes e inflamatórias (Bloomquist, 1968; Guy e cols., 2004).

Na última década, estudos publicados sugerem que canabinoides estão sendo usados com sucesso no tratamento de diversas condições patológicas como glaucoma (Tomida et al., 2004), caquexia e náusea (Kunos e Pacher, 2004), dores agudas e crônicas (Mechoulam et al., 2002), inflamação (Klein et al., 2005), esclerose múltipla (Baker e Pryce, 2003), doenças cardiovasculares (Mendizabal e Adler-Graschinsky, 2003) e alguns tipos de cânceres como linfomas, leucemias e gliomas (Guzman et al., 2003). Canabinóides são moléculas com conhecido papel anti-inflamatório, modulando a produção de citocinas pró-inflamatórias e acúmulo de células inflamatórias nos órgãos-alvo.

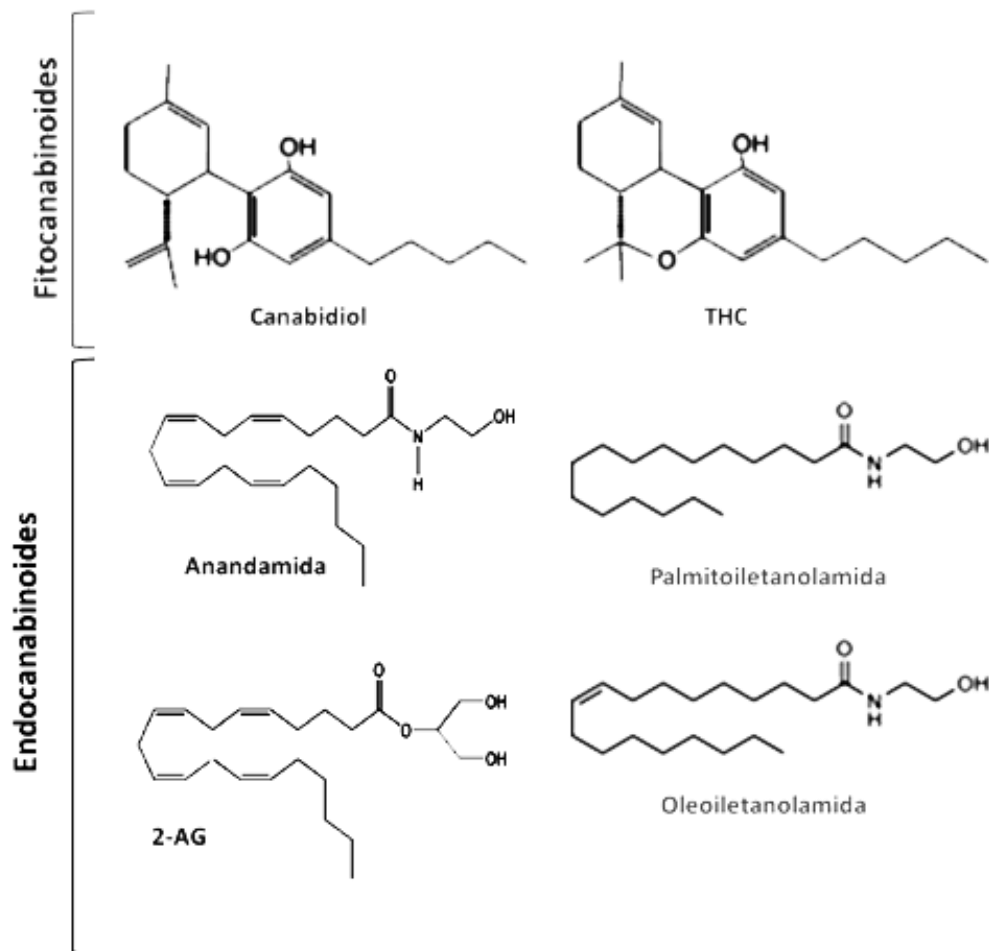


Figura 2. Formulas químicas dos principais canabinoides com potencial anti-inflamatório, já descrito. As moléculas encontram-se separadas entre fitocannabinoides derivados da *Cannabis sativa* e canabinoides endógenos, ou endocannabinoides. Adaptado de Burstein (2015) e Guzman (2003).

Os endocanabinoides derivam de duas grandes classes de lipídeos, as N-acetiletanolaminas (NAEs) e os 2-acilgliceróis (2AcGs), de forma que, seus principais representantes são, respectivamente, Anandamida e 2AG (Greig et al., 2016; Di Marzo, 2018). Os 2AcGs são sintetizados por meio da ação sequencial da fosfolipase C (PLCs) em fosfolípidos, através de enzimas Sn-1-diacilglicerol  $\alpha/\beta$ -lipase (DGL $\alpha/\beta$ ) (HSU et al., 2013; Appiah et al., 2014; Baggelaar et al., 2015). Em contraste, NAEs são derivados do processamento de N-acilfosfatiletanolaminas (NAPEs), principalmente pela NAPE-fosfolipase D ou NAPE-PLD (Bisogno et al., 2013; Janssen, 2016; Wilkerson et al., 2016).

Em relação às reações de catabolismo, existe também diferença entre estas classes, de forma que, grande parte dos NAEs é hidrolisado pela amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH), sendo degradados em etanolamina e ácido araquidônico (Cravatt et al., 1996). Porquanto, a hidrólise dos 2AcGs é realizada principalmente pela monoacilglicerol lípase (MAGL), sendo degradados em ácido araquidônico e glicerol (LABAR, et al., 2010). Os endocanabinoides também podem ser catabolizados por oxidação através da cascata do ácido araquidônico, que inclui COX-2 (Kozak et al., 2004), lipoxigenases (Ueda et al., 1995) e oxidases do citocromo P450 (Snider et al., 2010). É importante ressaltar que estas enzimas também podem estar relacionadas à metabolização de moléculas exógenas, como os fitocanabinoides (Bih et al., 2015).

De uma maneira geral canabinóides podem agir como moduladores do sistema imune (Adams et al., 2018). Seus principais efeitos estão relacionados com inibição da proliferação, ativação e potencial citotóxico de células T CD8+ (Fisher-Stenger e cols., 1992). Inibição da diferenciação de células T CD4+ em Th1 e estimulação da diferenciação em Th2, com aumento da produção de IL-10 e TGF- $\beta$  (Croxford e Yamamura, 2005; Ehrhart e cols., 2005). Supressão da liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias como IL1- $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-12, IL-8, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Cabral e cols., 1995; Berdyshev e cols., 2001; Croxford e Yamamura, 2005). E, finalmente inibição da ativação, migração e acúmulo de macrófagos e neutrófilos nos sítios inflamatórios (Rarborn e cols., 2008; Sacerdote e cols., 2005; Deusch e cols., 2003).

Devido ao seu potencial anti-inflamatório, canabinoides já vem sendo utilizados no tratamento de diversas patologias, como Glaucoma (Tomida et

al.,2004), Colite (Salaga et al., 2014), esclerose múltipla (Rachimi et al., 2015), doenças cardiovasculares (Mendizabal & Adler-Graschinsky, 2003) e até mesmo no controle de dores agudas e crônicas (Klein, 2005; Mechoulam e cols., 2002).

Neste contexto, canabinoides seletivos para receptores CB1 e CB2 poderiam ser usados no manejo de doenças de difícil controle que apresentam inflamação exacerbada e sistêmica como a GVHD.

### 1.3.1. Canabidiol

Dentre os fitocanabinoides mais proeminentes destaca-se o canabidiol (CBD - C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>). Esta molécula foi inicialmente isolada por Roger Adams em 1940 e que constitui cerca de 40% da *Cannabis sativa*. O CBD apresenta efeitos imunomodulatórios, ausência de efeitos psicoativos e está sendo bem tolerado por humanos e por animais em experimentação, mesmo que por períodos prolongados (Yeshurun et al., 2015; Jones et al., 2012). A administração de CBD resulta na atenuação da resposta inflamatória em diversas patologias em modelos animais, como esclerose múltipla (Kozela et al., 2011), artrite reumatóide (Malfait et al., 2000), doença inflamatória intestinal (Schicho et al., 2012), colite (Borrelli et al., 2009) e diabetes mellitus (Weiss et al., 2006).

O CBD é uma molécula altamente lipídica que é, principalmente, metabolizado no fígado por enzimas da família dos citocromos P450 (Bih et al., 2015) e seus metabólitos são eliminados principalmente na urina (Ujváry, 2016). Após sua administração, o CBD se difunde rapidamente pelos tecidos e apresenta uma meia-vida de eliminação terminal que ultrapassa 24h (Fine et al., 2013).

Os efeitos de CBD são provavelmente mediados por interações com células T, inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1b, IL-6, e IL-17) e estimulação de produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13) (Malfait et al., 2000). Ao contrário de diversos outros canabinoides como o  $\Delta$ 9-THC e os endocanabinoides, CBD apresenta baixa atividade nos receptores canabinoides (Schicho et al., 2012). Apesar de evidências de que o CBD interage como agonista dos receptores TRPV1, 5-HT1A, PPAR $\gamma$ , A2A e como antagonista de GPR55, ainda não existe consenso acerca de qual o mecanismo principal de ação deste canabinoide na regulação do processo inflamatório de forma geral (Crippa et al., 2010; Irving et al., 2017; Pernoncini et al., 2018; Carrier et al., 2006; Burstein et al., 2015).

Desta forma, esperamos que o CBD, possa modular a resposta inflamatória ocasionada pela doença do enxerto-contra-hospedeiro, reduzindo a mortalidade dos camundongos submetidos à GVHD e, portanto, sendo utilizado como tratamento profilático contra GVHD.

## ***JUSTIFICATIVA***

## 2. JUSTIFICATIVA

O transplante de medula óssea é a única terapia curativa para uma série de doenças hematológicas, algumas deficiências imunes e no tratamento de alguns tipos de câncer. Entretanto, o sucesso desta terapia muitas vezes não é alcançado devido à ocorrência de uma doença secundária conhecida como doença do enxerto-contra-hospedeiro (DECH) ou *graft-versus-host disease* (GVHD) (Ferrara e cols., 2009). Esta é uma doença sistêmica que evolui rapidamente, caracterizada por resposta inflamatória exacerbada e lesão tecidual em vários órgãos como intestino, pele, fígado e pulmão (Ferrara e cols., 2005; 2006; 2009), levando a significativa morbidade e mortalidade em humanos (Blazar, 2012). Atualmente, os tratamentos disponíveis falham em gerar equilíbrio entre a inflamação sistêmica generalizada e a imunossupressão, levando o paciente a um estado de susceptibilidade a outras doenças que podem agravar seu estado. Nesse contexto, terapias baseadas em canabinoides, preferencialmente utilizando aqueles que não possuem efeito psicoativo, apresentam grande potencial para uso em doenças que apresentam uma resposta inflamatória exacerbada e/ou crônica. Desta forma, o Canabidiol, principal constituinte não psicoativo da *Cannabis sativa*, poderia ser usado no manejo da GVHD.



## ***OBJETIVOS***

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Estudar o efeito do uso de Canabidiol e os seus mecanismos de ação no sob a resposta inflamatória associada à doença do enxerto-contra-hospedeiro, induzida em camundongos.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito do Canabidiol na sobrevida e na evolução da doença em camundongos.
- Avaliar o efeito do Canabidiol na resposta inflamatória associada à doença. Foram avaliados os seguintes parâmetros:
  - Aspectos histopatológicos no intestino e fígado;
  - Níveis das citocinas e quimiocinas envolvidas na GVHD aguda;
  - Recrutamento, acúmulo e ativação de células inflamatórias para o principal órgão alvo da doença, órgãos alvo e linfóides;
  - Eventos vasculares de rolamento e adesão de células inflamatórias no intestino.
- Avaliar o efeito do Canabidiol na resposta do enxerto-contra-tumor (*graft versus leukemia* - GVL).
- Avaliar a participação dos receptores canabinoides (CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>) no efeito do Canabidiol na GVHD.

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Animais

Foram utilizados camundongos de sete a oito semanas de vida, isogênicos, das linhagens C57BL/6j, C57BL/6j-GFP<sup>+</sup> e Balb-c, machos, advindos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram acondicionados em estante ventilada (Alesco® ES2), em sala com controle de temperatura ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo claro-escuro (7am-7pm). Todos os animais tinham acesso livre à água e ração (*ad libitum*). Todos os procedimentos experimentais realizados no decorrer deste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG) através do protocolo 337/2014.

### 4.2. Indução da doença do enxerto-contra-hospedeiro (GVHD) aguda

Os camundongos receptores, Balb-c, sofreram ablação total da medula através de duas doses de 3,5Gy de radiação gama, fonte de Co-60. Imediatamente após a segunda dose de irradiação, os animais receberam  $3 \times 10^7$  esplenócitos e  $1 \times 10^7$  de medula i.v.. O grupo controle recebeu células de Balb-c, ou seja, transplante singênico, não desenvolvendo GVHD; porquanto o grupo GVHD recebeu células de C57Bl-6j, ou seja, transplante alogênico, e veio a desenvolver a doença (Figura 3).

Os esplenócitos foram adquiridos através de um “pool” de células de baço. E então, os baços dos animais doadores foram retirados, macerados e filtrados em um filtro Cell Strainer Falcon® de nylon (70 $\mu\text{m}$ ) e mantidos em RPMI-1640 Cultilab® gelado. As células resultantes foram centrifugadas à 1200 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet remanescente foi ressuscitado em 10mL de meio RPMI-1640. Destes 10ml, 10 $\mu\text{L}$  foram retirados e ressuscitados em 900 $\mu\text{L}$  de RPMI-1640 e desta solução foram pipetados 50 $\mu\text{L}$  que foram homogeneizados com 50 $\mu\text{L}$  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 que seriam injetadas no animal receptor.

## Doadores

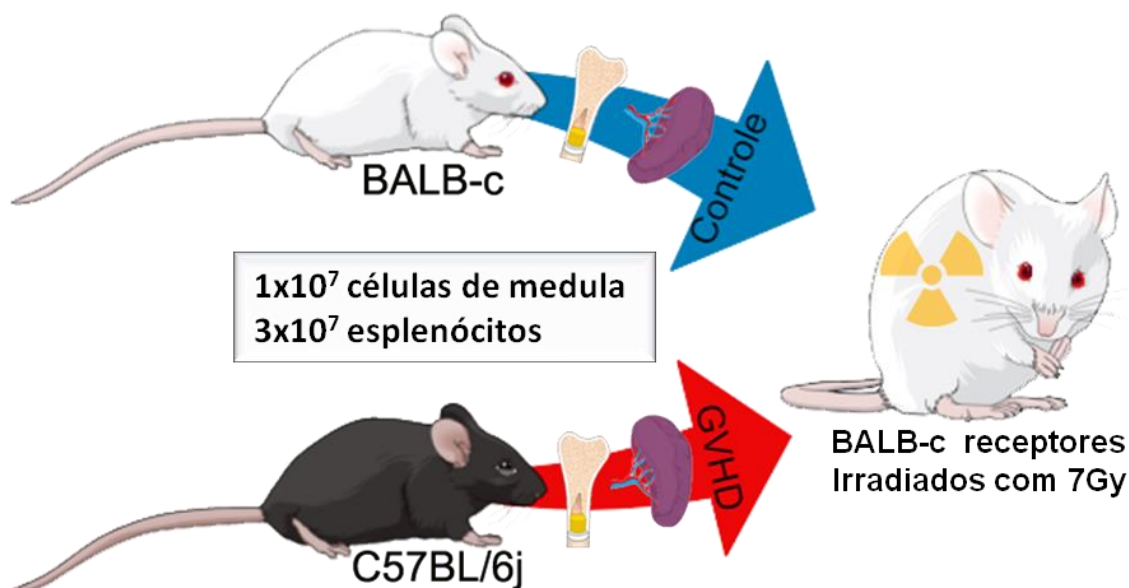


Figura 3. Indução da GVHD. Camundongos Balb-c receberam células de camundongos doadores Balb-c ou C57BL/6j, para os grupos Controle e GVHD, respectivamente. Imagens modificadas de MindTheGraph®.

### 4.3. Grupos experimentais

Os animais foram divididos com número amostral de cinco animais por grupo. Desta forma, o grupo controle foi composto por animais que receberam transplante singênico, ou seja, transplante de Balb-c para Balb-c. Este grupo foi utilizado como controle de irradiação, garantindo que a mortalidade foi causada pela GVHD e não pelo regime de condicionamento. O grupo veículo foi composto por animais que receberam transplante alogênico de C57BL/6j para Balb-c, assim como o grupo CBD, diferindo apenas em relação ao tratamento conforme descrito adiante.

#### 4.4. Tratamentos utilizados

Os animais com GVHD foram divididos primariamente entre os grupos tratados com Canabidiol (CBD) na dose de 30mg/Kg e seu respectivo veículo 5% Tween80 em PBS-1x estéril. O CBD utilizado apresenta 89% de pureza, com 11% de  $\Delta^9$ THC remanescente (THC-Pharm, Frankfurt, Germany, e STI-Pharm, Brentwood, UK). É importante ressaltar que foram realizados experimentos em triplicata para averiguar a melhor dose de Canabidiol a ser utilizada no tratamento dos animais. Com base em artigos que investigaram o efeito de CBD em outros modelos inflamatórios, foram escolhidas as doses de 10 mg/kg e 30mg/kg para um estudo piloto de avaliação de sobrevida (Vilela, 2015; Pagano, 2016; Callejas, 2018).

Para a avaliação do papel dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> no mecanismo de ação do CBD os animais foram tratados com AM251(1mg/Kg) ou AM630 (1mg/Kg) ambos da marca Tocris®. O grupo veículo destes antagonistas foi composto por camundongos que receberam 2,5% DMSO em PBS-1x estéril.

Todos os tratamentos foram realizados via i.p. diariamente, de forma que os grupos que receberam antagonistas somente foram tratados com CBD uma hora após a administração do antagonista (Figura 4).

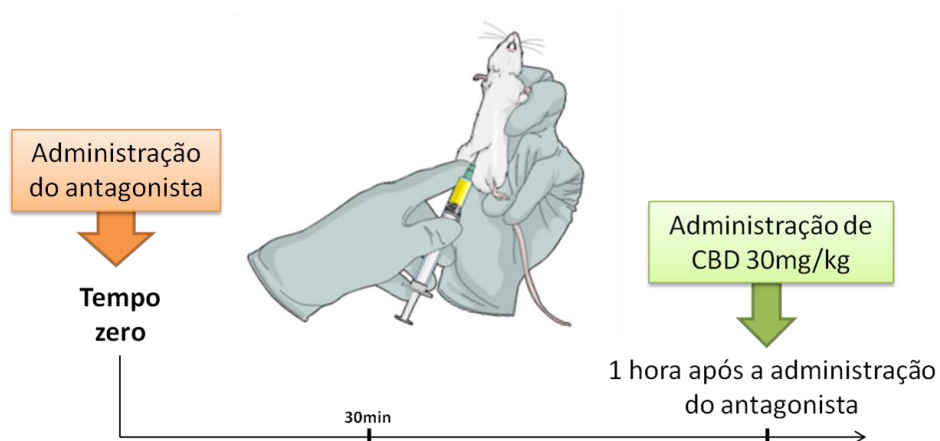


Figura 4. Tratamentos com antagonistas e posteriormente com CBD. Os animais receberam injeção intraperitoneal de antagonista CB<sub>1</sub> ou CB<sub>2</sub> e, após uma hora, receberam uma segunda injeção com o canabinoide de interesse. Imagem modificada de MindTheGraph®.

#### 4.5. Avaliação de parâmetros clínicos

Após a indução da GVHD, foi realizado acompanhamento da evolução dos sinais clínicos dos animais, a cada dois dias, através de uma escala clínica (Colson et al., 2004; Cooke, et al., 1998; Rezende et al., 2013; Bernardes et al., 2015), cuja pontuação varia de 0 a 14 (Figura 5). A escala permite avaliar a variação de peso corporal, o aspecto do pelo, descamação da pele, atividade do camundongo, postura e flexão corporal, presença de diarreia, bem como presença de sangue nas fezes.

Parâmetro	Pontuação (Score)
Peso	0: normal/ 1: perda até de 10% do peso corporal/ 1,5: perda de até 15%/ 2: perda acima de 15%
Postura	0: normal/ 1: inclinação leve/ 2: inclinação grave
Atividade	0: normal/ 1: alteração da atividade/ 2: letargia grave
Textura do pelo (pelo arrepiado)	0: ausência/ 1: leve/ 2: intenso
Integridade da pele	0: sem alterações/ 1: descamação da pele e perda de pelo/ 2 descamações da pele, perda de pelo, eritema ou ferida aberta
Sangue visível nas fezes	0: ausência/ 2: presença
Fezes	0: branda/ 1: pastosa/ 2: líquida
Score máximo	14 pontos

Figura 5. Escala clínica. A escala, ou score clínico, avalia a progressão e manifestação da inflamação desencadeada pela GVHD.

Os parâmetros da escala clínica foram avaliados do dia da indução da GVHD até o dia da eutanásia, de forma que, em experimentos de sobrevivência os animais foram acompanhados até que o grupo veículo, de cada tratamento, completasse a mortalidade.

#### 4.6. Análise Histológica

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 dos animais veículo, CBD e controle. 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, sendo esta aberta de forma longitudinal e espiralada, conforme descrito por Arantes & Nogueira (1997). Estas espirais (Figura 6) foram então acondicionadas em cassetes de plástico e conservadas em PFA 10% por 24 horas e, em seguida, 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 5 $\mu$ m 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). As lâminas foram, então, coradas com hematoxilina-eosina para posterior análise histopatológica. As amostras de fígado foram acondicionadas em PFA 10% e processadas conforme acima descrito.

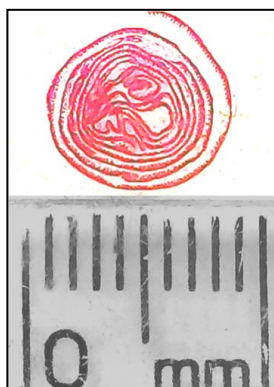


Figura 6. Lâmina de Jejuno-íleo. Exemplo de tecido em formato de rocambole.



#### 4.6.1. Avaliação dos parâmetros histopatológicos

A partir das secções de Jejunó-íleo corados em H&E, foram analisadas as seguintes regiões: epitélio, lâmina própria, camada muscular e serosa. Nas secções de fígado, foram analisados os lóbulos hepáticos, veias centrolobulares e espaço porta, considerando aspectos do parênquima e do estroma do órgão. Ambas as análises foram realizadas por microscopia óptica nos aumentos de 10x, 20x e 40x. A análise foi realizada através de teste cego, por uma patologista, que atribuiu valores às alterações observadas nos tecidos, de acordo com os critérios apresentados nas tabelas abaixo (Figuras 7 e 8).

#### Avaliação histopatológica de Jejunó-íleo

Critérios avaliados no Jejunó-íleo			
	Epitélio	Lâmina Própria	Camada Muscular e Serosa
0	Sem alterações perceptíveis.	Aspecto normal.	Sem alterações perceptíveis.
1	Alterações reacionais discretas.	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.

Figura 7. Critérios utilizados para avaliação histopatológica de secções de Jejunó-íleo. Observam-se parâmetros utilizados para embasar a análise comparativa epitélio, lâmina própria e camadas muscular e serosa no jejuno-íleo.

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.

#### Avaliação histopatológica de Fígado

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

Figura 8. Critérios utilizados para avaliação histopatológica de secções de Fígado. Observam-se os parâmetros utilizados para embasar a análise comparativa de parênquima e infiltrado inflamatório no fígado.

Os animais receberam graduações geradas pelo somatório destes critérios, chegando ao máximo de 6 pontos. Esta metodologia já está bem estabelecida e é amplamente utilizada, como nos trabalhos de Williams et.al. (2007); Garcia et.al, (2013); Canesso et.al. (2014).

#### 4.7. Quantificação de citocinas e quimiocinas

Ao sétimo dia após a indução da GVHD, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e foram coletados o intestino e o fígado. Os níveis de citocinas e quimiocinas foram aferidos nos homogenatos destes órgãos através do ensaio de *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). 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 (Figura 9), sendo que a concentração do primeiro ponto foi determinada pelo fabricante da quimiocina/citocina. Foram avaliadas as quimiocinas CCL2, CCL3, CCL5, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , e IL-17.

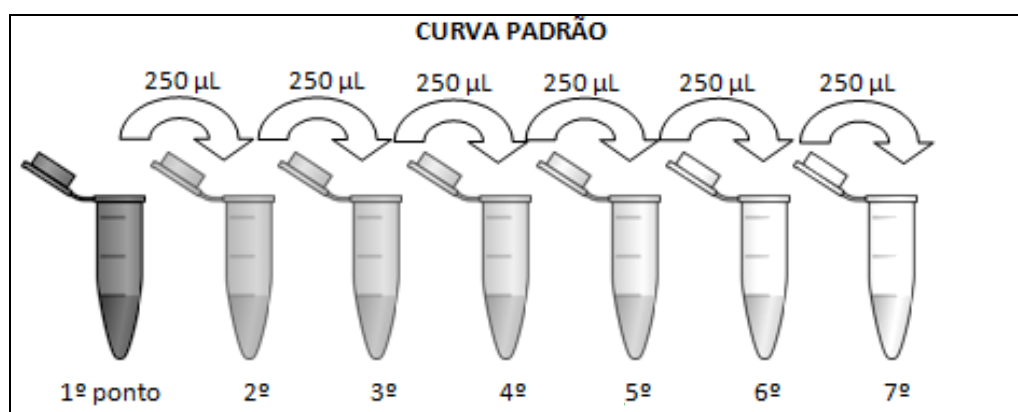


Figura 9. Curva Padrão para ELISA. Exemplo de diluição seriada utilizada para obtenção da curva padrão, sendo esta a base para a leitura no espectrofotômetro.

#### 4.8. Análise de recrutamento celular

A fim de averiguar a ação dos tratamentos utilizados sob o recrutamento celular, foi utilizado um animal C57BL/6j-GFP<sup>+</sup> como doador de células para os animais Balb-c receptores. Ao sétimo dia pós-indução da GVHD os animais foram anestesiados através de injeção i.p. de 80µl de quetamina-xilazina em salina (2:1). O tratamento com CBD (30mg/Kg) foi realizado somente 30 minutos antes do procedimento cirúrgico. O grupo veículo recebeu 5% Tween80 também com 30 minutos de antecedência ao procedimento (Figura 10). O animal anestesiado foi posicionado em uma placa aquecida à 37°C. 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 recoberto por papel filtro umedecido com PBS-1x. Foi utilizada a objetiva de 20x de um microscópio intravital confocal (Nikon, ECLIPSE 50i, 20x *objective lens*) para exame da microvasculatura mesentérica e intestinal. As imagens foram visualizadas através da câmera acoplada ao microscópio e registradas para análise posterior no programa Fiji-ImageJ com o *plugin* NIS Elements-Nikon. O número de células em rolamento ou aderentes em vênulas foi determinado após análise “cega” dos registros. 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 40-60µm de espessura (Figura 11). 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 100µm.

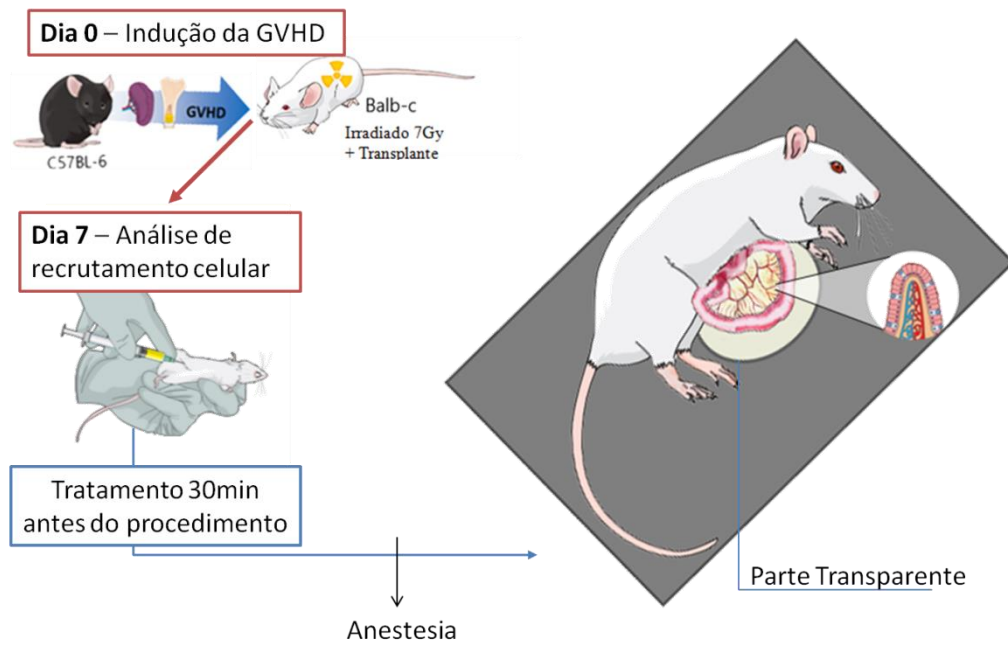


Figura 10. Procedimento para análise de recrutamento celular. Ao sétimo dia após a indução da GVHD, os animais foram tratados com Canabidiol ou veículo trinta minutos antes do procedimento. Imediatamente antes do procedimento o animal foi anestesiado e seu mesentério exposto para visualização das vênulas mesentéricas. Imagens modificadas de MindTheGraph®.

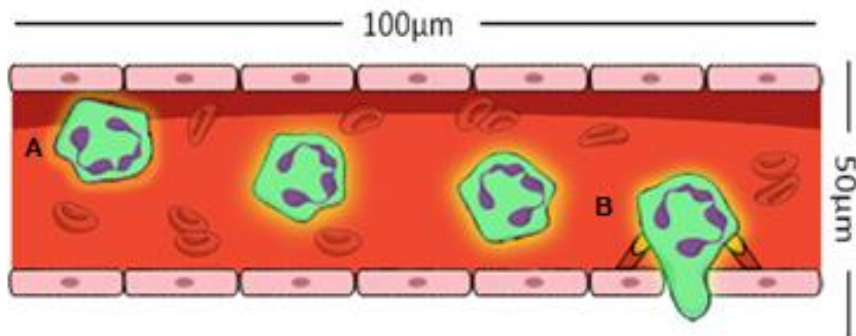


Figura 11. Vênula com células GFP+. A figura exemplifica o tipo de vaso utilizado na análise. (A) Célula em rolagem. (B) Célula aderida. Imagens modificadas de MindTheGraph®.

#### **4.9. Resposta do enxerto-contra-o-tumor (Graft-versus-lekemia - GVL)**

Para indução tumoral, utilizamos uma linhagem de mastocitoma murino P815 (H-2d, American Type Culture Collection, Rockville, MD), transduzida com vetor EF1aGFP, cedida por A.C.Leal e M. Bonamino (Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro). A GVHD foi induzida segundo o mesmo protocolo inicialmente descrito e as células P815-GFP<sup>+</sup> foram injetadas via intravenosa no mesmo dia do transplante, nos camundongos Balb-c, na concentração de  $5 \times 10^4$  células. Após sete dias os animais foram eutanasiados e a concentração de células P815-GFP<sup>+</sup> nos linfonodos mesentéricos e inguinais (que foram utilizados em conjunto para gerar um pool de células) e no baço foram avaliadas por citometria de fluxo (FACS-Scalibur). Esta concentração foi considerada como parâmetro de avaliação da potência do efeito do enxerto-contra-tumor.

#### 4.10. Citometria de Fluxo

Os animais foram eutanasiados sete dias após a indução da GVHD e foram coletados intestinos, baço, fígado e medula. 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 por 5 minutos à 4°C. As amostras foram então tratadas com ACK por cinco minutos, para remoção de hemácias. Em seguida as amostras foram ressuspensas em PBS-1x, recentrifugadas 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. Em se tratando do isolamento das células do intestino, a porção relativa ao jejuno-íleo foi retirada e lavada com PBS para remoção do conteúdo intestinal. O tecido foi então cortado em pequenos pedaços e colocado em um Falcon contendo uma solução de PBS+5mM EDTA+10mM Hepes sendo alocadas 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 recentrifugado e o sobrenadante descartado. O pellet foi então lavado duas vezes com RPMI 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<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD28<sup>+</sup>) com os anticorpos, foram adicionados 20µl de mix para cada 1x10<sup>6</sup> 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 (PhoenixLuferto®) 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 ressuspensas em uma solução de albumina 0,5% (junto à NaCl 67mM; KCl 6,7mM; HEPES 100mM; em H<sub>2</sub>O). Em seguida as células foram marcadas através do protocolo de marcação de superfície celular e intracelular já descrito. A medula somente foi utilizada para marcação de H2D<sup>b</sup> e H2D<sup>d</sup> para avaliação de quimerização, sendo estes haplotipos de MHC 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 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). Foram analisados os marcadores para linfócitos T CD3, com subpopulações CD4 e CD8; marcador de ativação celular CD28; e, finalmente, marcador de linfócitos T-reguladores FoxP3+.

#### 4.11. Análise estatística

Todos os dados foram primeiramente analisados pelo teste de Shapiro-Wilk para averiguar se os dados seguiam distribuição normal, de forma que este teste foi utilizado como indicativo para a posterior utilização de um teste paramétrico ou não-paramétrico. Caso a amostra se apresentasse com distribuição normal foi realizado o teste de Grubb's ( $\alpha = 0,05$ ) para remoção de possíveis *outliers*. Em seguida foi realizado o teste de múltiplas comparações por *one-way* Anova para verificar a existência de diferenças estatísticas entre os grupos, caso o valor de F fosse significativo ( $P < 0,05$ ), foi realizado Teste post-hoc LSD de Fisher, para o teste de múltiplas comparações. As amostras foram consideradas diferentes para  $P < 0,05$  entre os grupos.

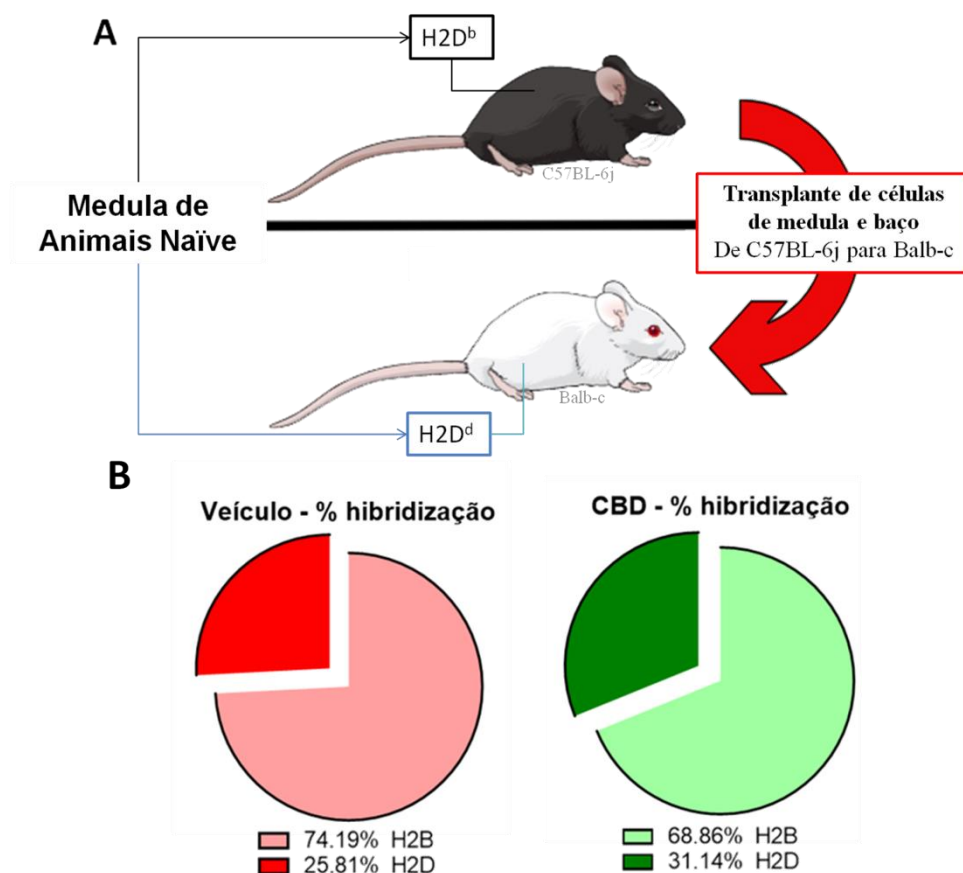
Caso o teste de normalidade apontasse para uma amostra com distribuição não-gaussiana para 33% ou mais grupos, foi realizado o teste de múltiplas comparações Kruskal-Wallis, não sendo corrigidas por pós-teste (análise de Dunn). As amostras foram consideradas diferentes para  $P < 0,05$ . Os resultados foram expressos em gráficos de dispersão contendo mediana. Todas as análises foram realizadas através do programa GraphPadPrism® versão 7.0.

## ***RESULTADOS***

## 5. Resultados

### 5.1. Efeito do CBD sobre a quimerização após o transplante.

Amostras de medula coletadas dos animais ao sétimo dia após a indução da GVHD revelaram a porcentagem de quimerização dos animais em relação ao MHC H2D<sup>b</sup> para animais C57BL/6j e H2D<sup>d</sup> para animais Balb-c (Figura 12 - A). Desta forma, a quimerização revelou-se como sendo de 75% para o grupo tratado com veículo e aproximadamente 69% para o grupo tratado com Canabidiol (30mg/kg) (Figura 12 - B e C), revelando não haver diferença entre os grupos (Figura 13). Desta forma, pode-se constatar que o Canabidiol não interfere no processo de quimerização do hospedeiro, permitindo que haja reconstituição da medula enxertada. Deve-se observar que a reconstituição não é completa, tornando os animais verdadeiras quimeras.



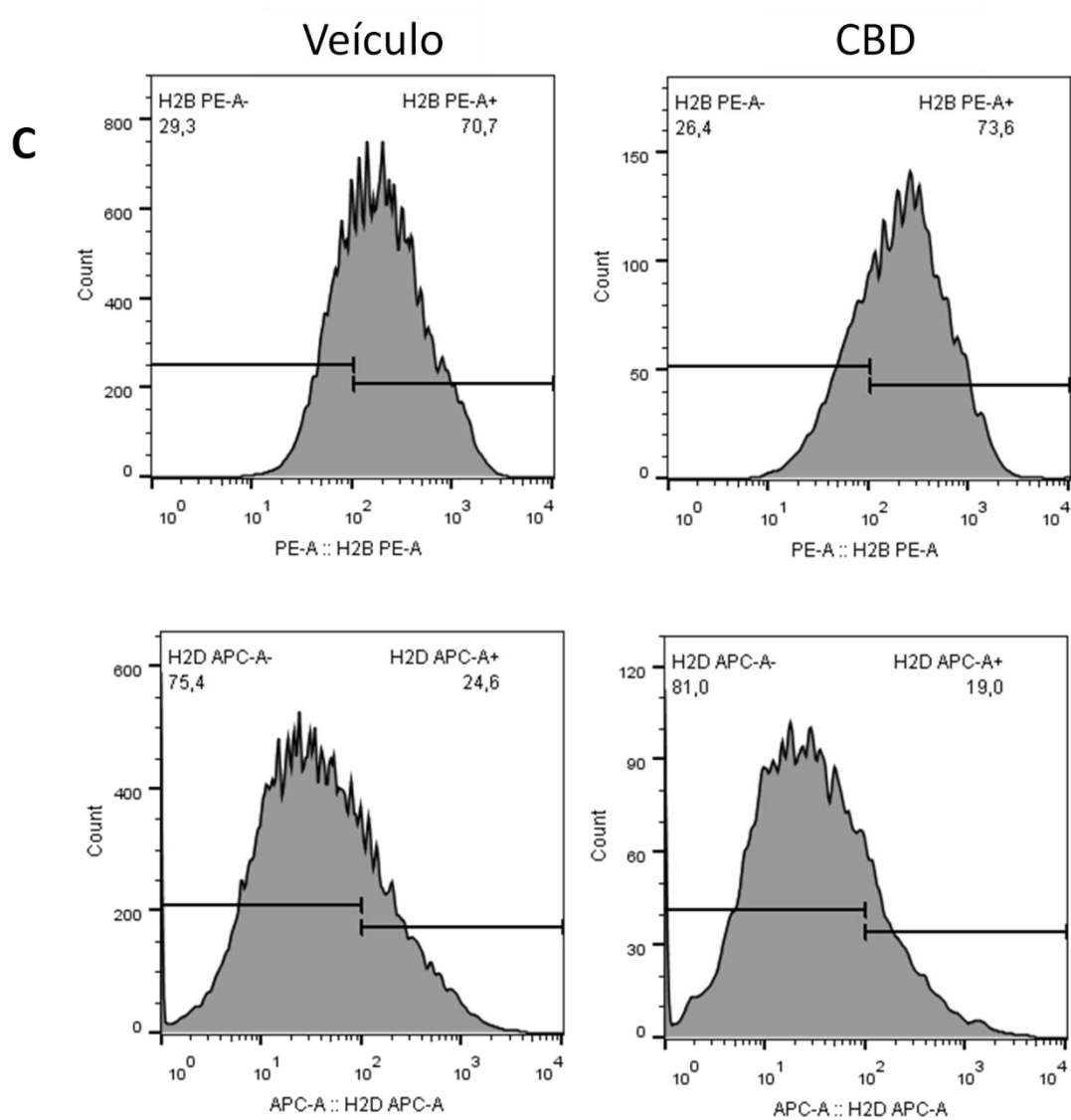


Figura 12. Porcentagem de quimerização de animais tratados com veículo e animais tratados com Canabidiol. (A) Modelo de indução, sinalizando que MHC H2D<sup>b</sup> pertence ao animal C57BL/6je que H2D<sup>d</sup> pertence ao animal Balb-c. Modificado de MindTheGraph®. (B) Gráfico demonstrando a porcentagem de hibridização. (C) Análise de citometria de fluxo, com as marcações de MHC.

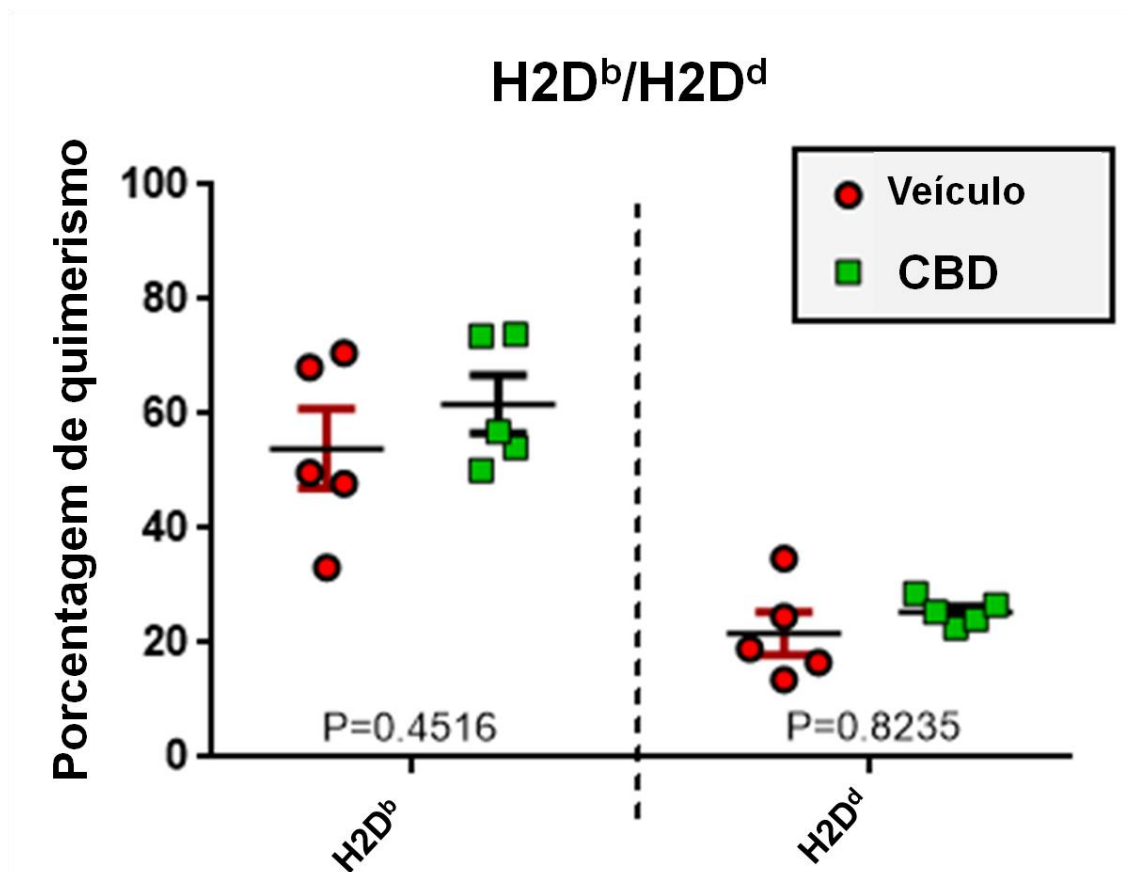


Figura 13. Detalhamento da análise estatística para quimerização. Esta análise revela não haver diferença significativa entre os grupos ( $P > 0,05$ ), os dados estão expressos em dispersão com mediana.

## 5.2. Efeito do CBD na sobrevida de camundongos com GVHD

Foram avaliadas as doses de 10mg/Kg e 30mg/Kg conforme previamente descrito. Com base no aumento de sobrevida optamos pela utilização da dose de 30mg/kg nos experimentos que seguem. Desta forma, CBD gerou um aumento de 80% na sobrevida enquanto o grupo veículo teve sua mortalidade completa ao 17º dia após a indução da GVHD (Figura 14).

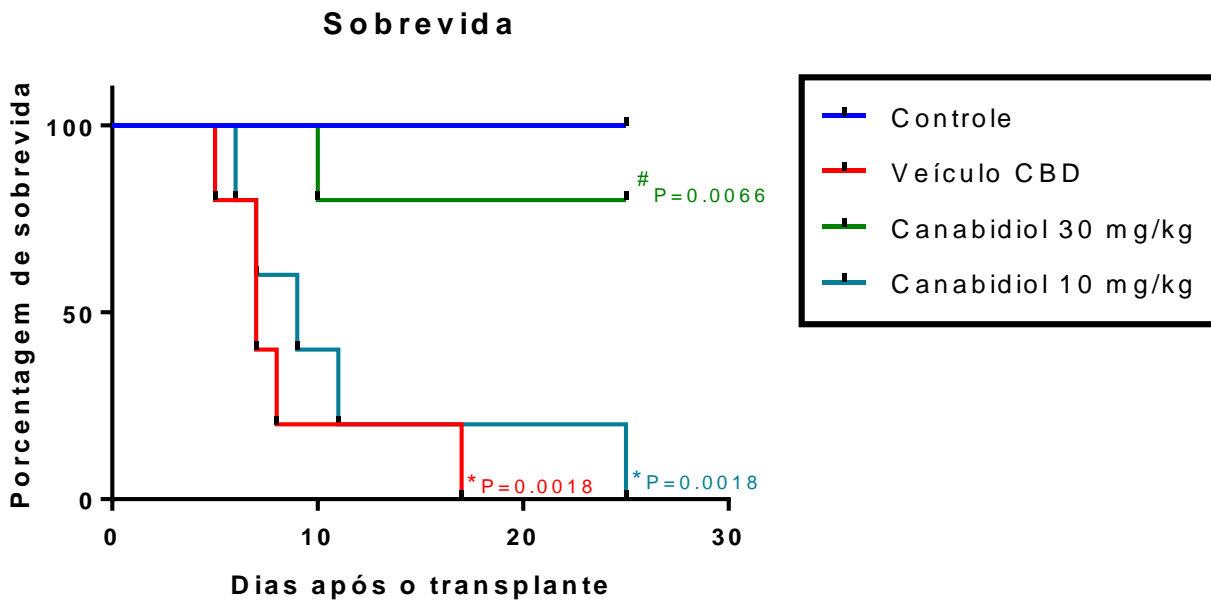


Figura 14. Curva de sobrevivida. Mortalidade dos grupos controle tratados com CBD diariamente nas doses de 10mg e 30mg/Kg (n=5). \*P<0.05 comparado com controle e #P<0.05 comparado com veículo

### 5.3. Efeito do CBD na evolução clínica de camundongos com GVHD

A escala clínica e a variação de peso são fatores que influenciam diretamente a sobrevivida dos animais e, portanto, foram avaliados para a dose de 30mg/kg de CBD. Apesar do aumento excepcional em relação à sobrevivida, CBD teve melhora sutil tanto na observação de parâmetros clínicos quanto na perda de peso causada pela GVHD (Figura 15).

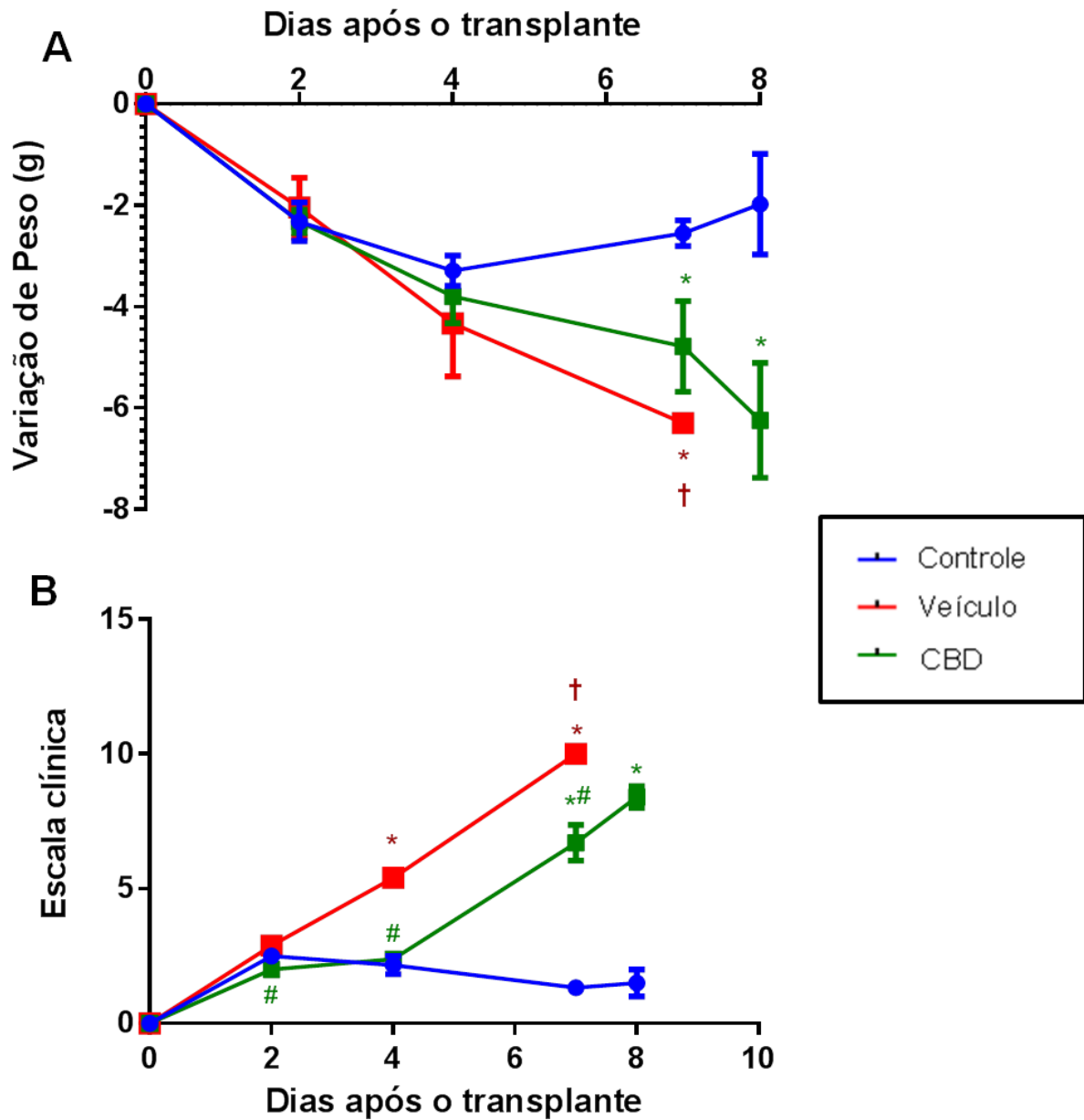


Figura 15. Avaliação dos parâmetros clínicos dos animais. (A) Escala clínica; (B) Variação de Peso. (n=5). \*P<0.05 comparado com controle e #P<0.05 comparado com veículo. † simboliza que o grupo alcançou mortalidade total neste dia, os dados estão expressos em média e erro padrão da média para cada grupo por dia avaliado.

A fim de compreender os mecanismos de pelos quais CBD levou à redução da mortalidade, os principais órgãos alvo da GVHD foram coletados ao sétimo dia após a indução da doença para as análises que se seguem.



#### **5.4. Efeito do CBD sobre a lesão intestinal e hepática em camundongos com GVHD**

As amostras do JI e fígado dos animais controles não apresentaram alterações histopatológicas (Fig. 16). Os animais veículo apresentaram destruição parcial do epitélio de revestimento e das criptas intestinais associados à hiperemia e edema da lâmina própria e infiltração de células mononucleares nas camadas mucosa, muscular e serosa. Além disso, foram observados focos de vacuolização citoplasmática dos hepatócitos e infiltração periportal e intralobular de células mononucleares. Os animais CBD apresentaram lesões intestinais e hepáticas menos intensas. A avaliação do escore histopatológico (Fig. 17) mostrou aumento significativo das lesões no JI e no fígado nos animais veículo, comparados com os animais controles. Em concordância com o aumento de sobrevivência, CBD reduziu os danos ao fígado e ao jejuno íleo dos animais tratados (Figuras 16 e 17), sendo significativamente diferente do grupo tratado com veículo, mas também diferente do grupo controle. Este resultado demonstra que, apesar de reduzir os danos teciduais causados pela doença, CBD não é capaz de extinguir o processo inflamatório por completo.

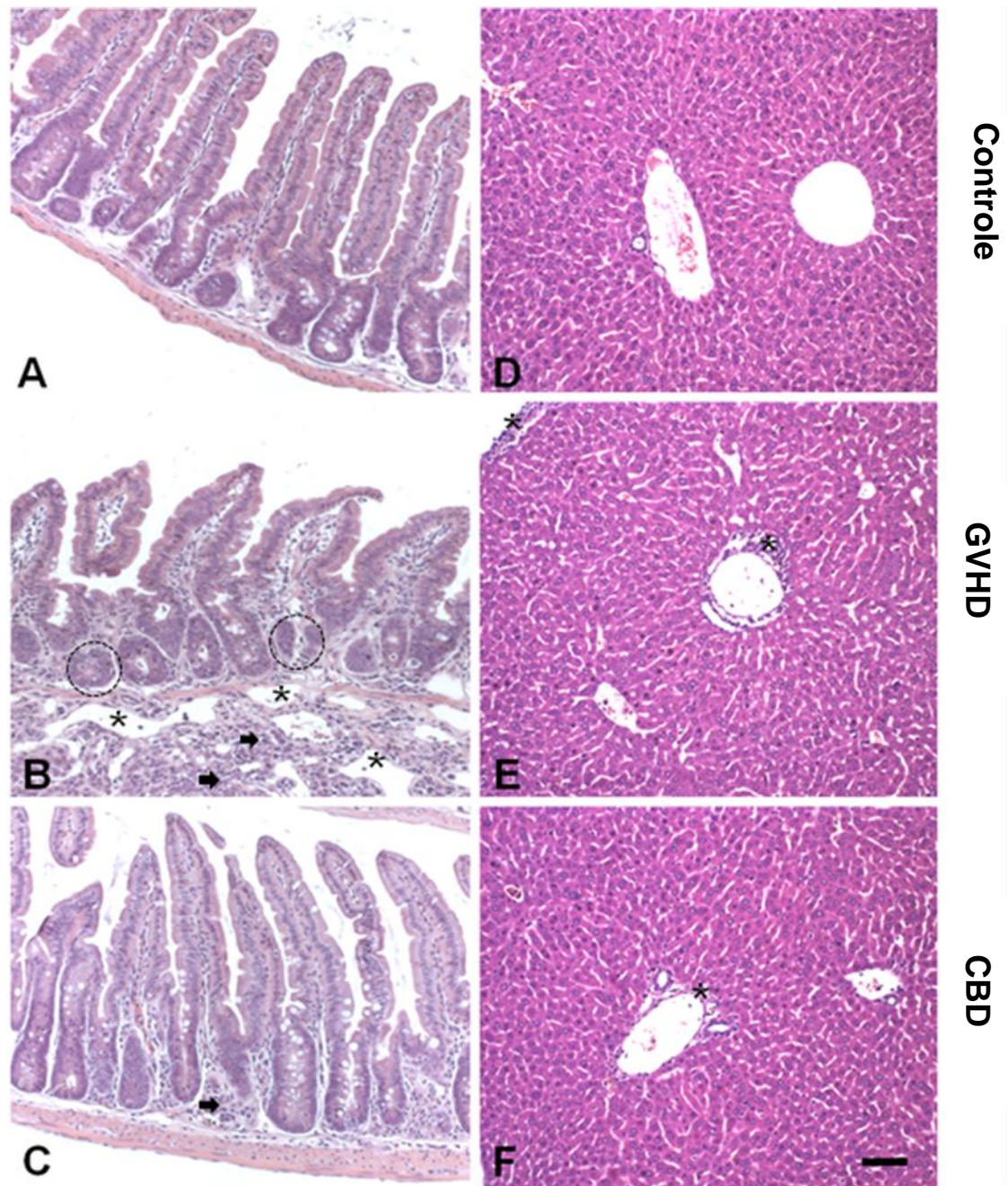


Figura 16. Fotomicroscopia do jejuno-ileo (A-C) e do fígado (D-F) de animais do grupo controle com aspecto histológico normal (A;D); do grupo tratado com veículo mostrando edema (asteriscos), aumento da celularidade caracterizada pela infiltração de células inflamatórias mononucleares (setas) e focos de destruição das criptas intestinais (círculos pontilhados) (B). Observa-se infiltrado inflamatório nas áreas periportal e intralobular (asteriscos) (E) e do grupo tratado com CBD com alterações histopatológicas menos intensas (F). Escala: 50  $\mu$ m para todas as fotos.

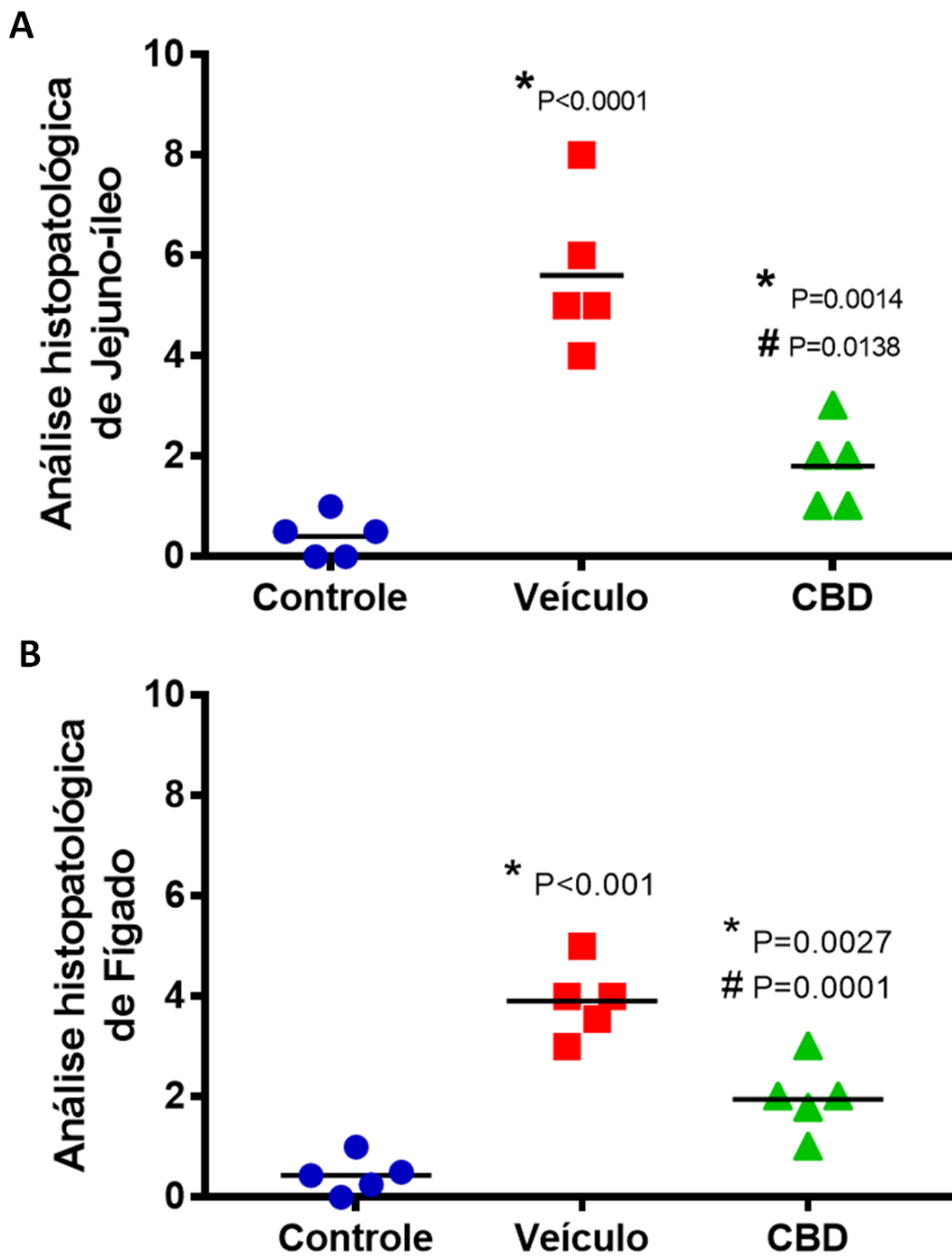


Figura 17. Análise estatística dos danos de histopatologia. (A) Análise estatística do score histológico de cortes de Jejunum-íleo. (B) Análise estatística do score histológico de cortes de Fígado. \*P<0.05 comparado com controle e #P<0.05 comparado com veículo, os dados estão expressos em dispersão com mediana.

### **5.5. Efeito do CBD sobre a concentração de citocinas e quimiocinas no intestino e no fígado de camundongos com GVHD**

Em consonância com os resultados obtidos na análise histopatológica, CBD reduziu o nível das citocinas ( $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$ ) e quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL5) (Figura 18) no jejuno-íleo, quando comparado com o grupo veículo. Este resultado não foi completamente reproduzido no fígado (Figura 19), no qual só houve redução dos níveis de CCL3 e  $\text{IFN}\gamma$ .

Não houve alteração em relação à citocina IL-17 em nenhum dos tecidos avaliados (Figura 18c e 19c).

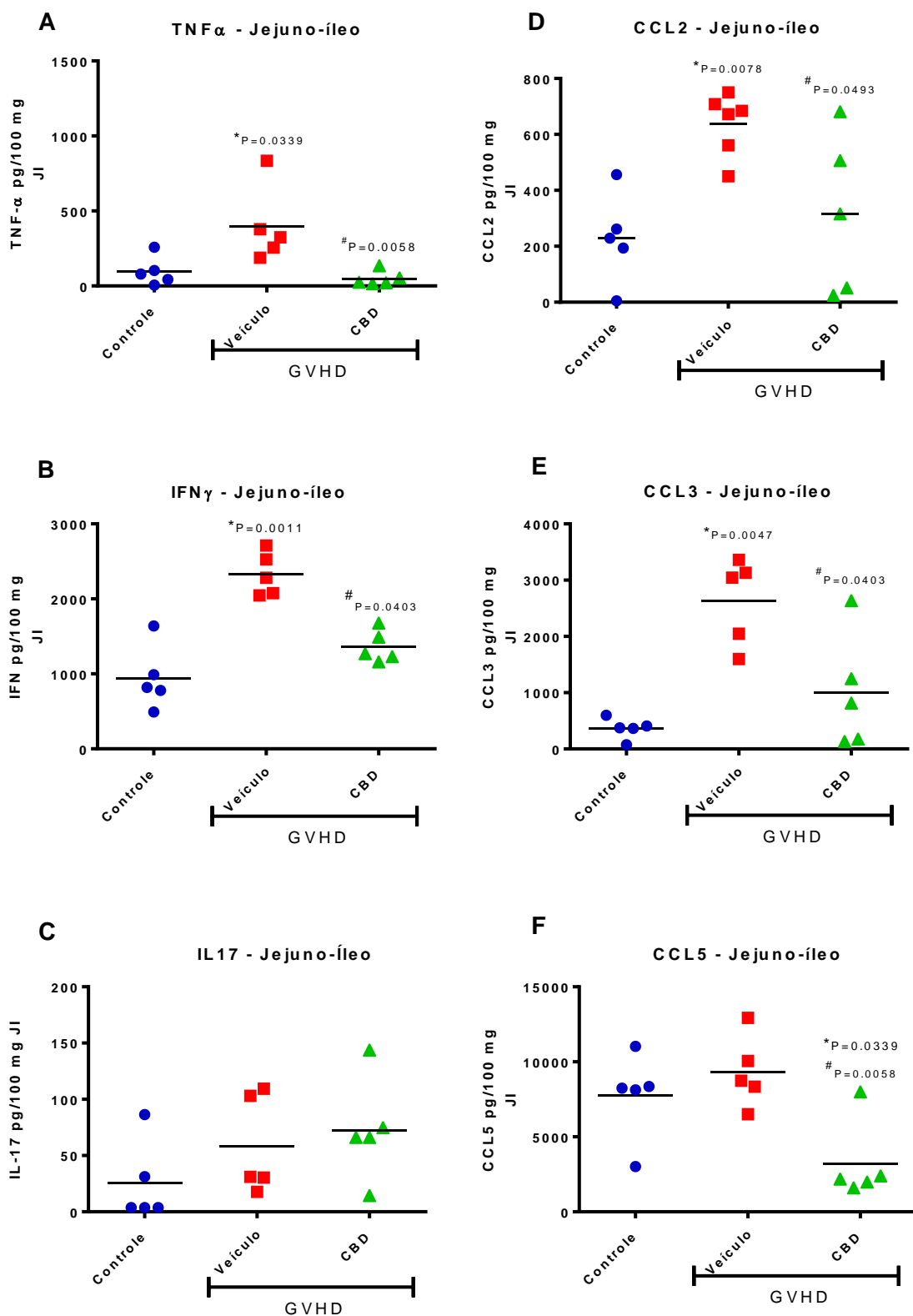


Figura 18. Análise de citocinas e quimiocinas através de ELISA em amostras de Jejunó-íleo. (A) TNF $\alpha$ ; (B) IFN $\gamma$ ; (C) IL-17; (D) CCL2; (E) CCL3; (F) CCL5. \*P<0.05 comparado com controle e #P<0.05 comparado com veículo, os dados estão expressos em dispersão com mediana.

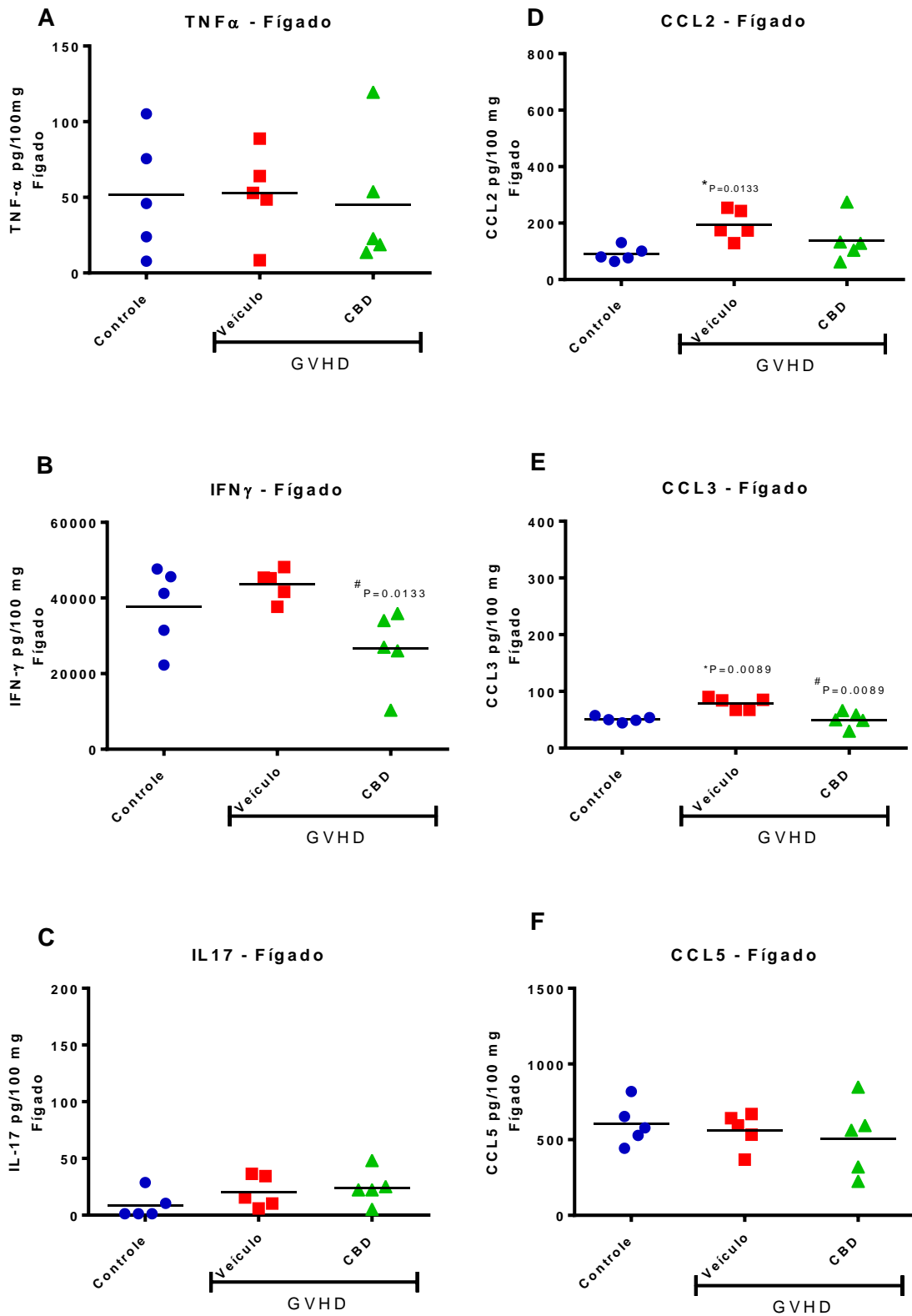


Figura 19. Análise de citocinas e quimiocinas através de ELISA em amostras de fígado. (A) TNF $\alpha$ ; (B) IFN $\gamma$ ; (C) IL-17; (D) CCL2; (E) CCL3; (F) CCL5. \*P<0.05 comparado com controle e #P<0.05 comparado com veículo, os dados estão expressos em dispersão com mediana.

## 5.6. Efeitos do CBD sobre o recrutamento de células inflamatórias para o intestino de camundongos com GVHD

Para verificar se CBD modificava a migração de células inflamatórias para o intestino, principal órgão alvo da GVHD, ao sétimo dia após a indução da doença os animais foram anestesiados, uma porção de seu intestino foi exposta e submetida à microscopia intravital. As células GFP<sup>+</sup> transplantadas foram visualizadas e contadas de acordo com a metodologia já descrita. Desta forma, foi possível observar, indiretamente, que CBD, na dose avaliada, não influencia os mecanismos de migração celular, ou seja, não encontramos diferenças entre o grupo CBD e o grupo veículo em relação a rolamento e adesão celular (Figura 20).

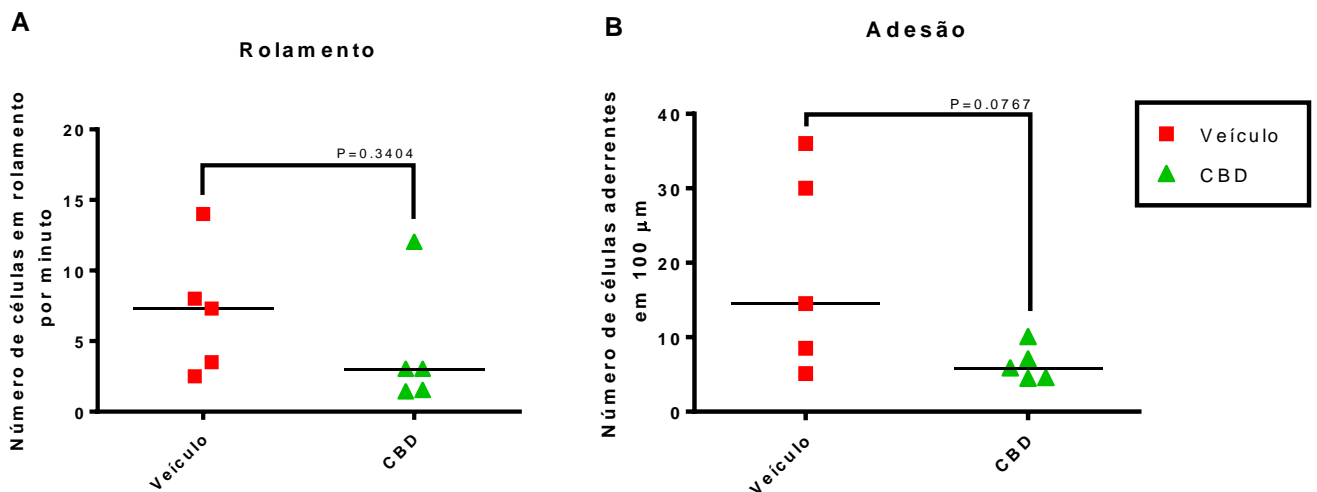


Figura 20. Análise de migração celular. (A) Análise de rolamento. (B) Análise de Adesão. . \*P<0.05 comparado com controle e #P<0.05 comparado com veículo, os dados estão expressos em dispersão com mediana.

## 5.7. Citometria de fluxo

A fim de verificar os mecanismos celulares envolvidos na redução dos mediadores inflamatórios, foi realizada citometria de fluxo ao sétimo dia após a indução. Foram avaliados os marcadores celulares para linfócitos CD3<sup>+</sup> T-CD4<sup>+</sup> e T-CD8<sup>+</sup>. Dentro destas populações a ativação celular foi averiguada através do marcador CD28<sup>+</sup>. A partir da população de T-CD4<sup>+</sup> buscamos averiguar se havia aumento da população de linfócitos FoxP3<sup>+</sup>, uma vez que esta população, conhecida como “linfócitos T-Regulatórios” tem importante papel na redução de moduladores pró-inflamatórios. Foi constatado que, apesar de CBD levar ao aumento e maior ativação das células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> ele também leva ao aumento de células T-reguladoras no intestino (Figuras 21 a 23). Porquanto as análises de fígado revelaram perfil similar ao observado no JI, com o mesmo aumento em relação a células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, de forma que apenas as células CD8<sup>+</sup> se mostraram mais ativas (CD28<sup>+</sup>) em relação ao grupo veículo e não houve diferença entre o grupo veículo e o grupo CBD em relação aos linfócitos T-reguladores (FoxP3<sup>+</sup>) (Figuras 24 a 27). Finalmente, as análises das células derivadas do baço não revelaram diferença significativa do grupo tratado com CBD em relação ao grupo veículo em nenhuma das marcações realizadas (Figuras 28 a 31).



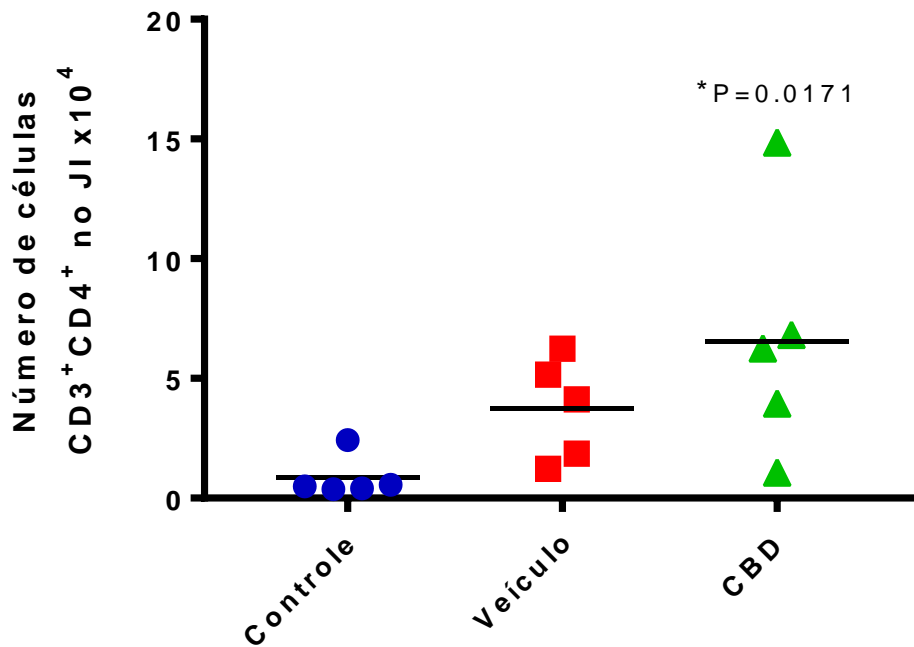
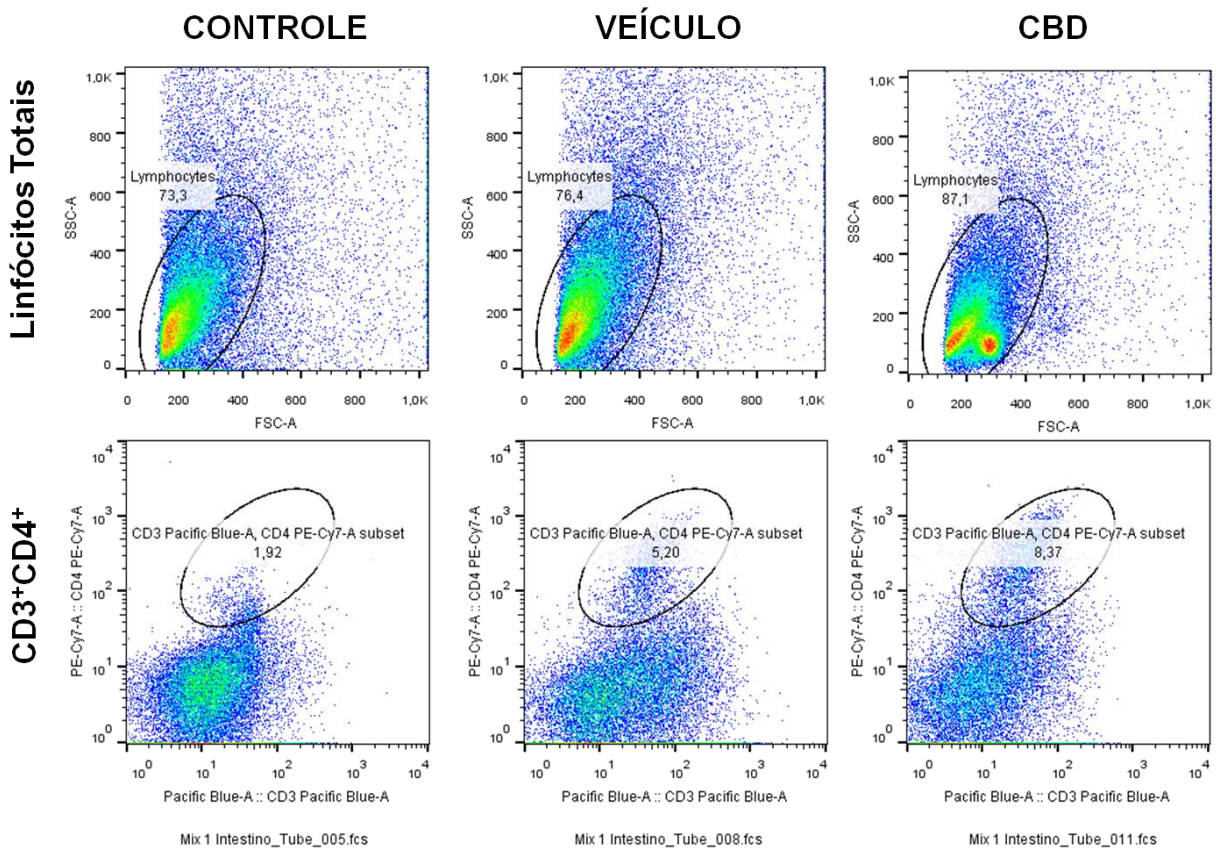


Figura 21. Quantificação de linfócitos CD4<sup>+</sup> no jejunó-íleo. Os linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> foram quantificados através de citometria de fluxo a partir de amostras de jejunó-íleo. Acima observa-se a análise realizada no FlowJo® e abaixo estão os detalhes da análise estatística. \*P<0.05 comparado com controle e #P<0.05 comparado com veículo, os dados estão expressos em dispersão com mediana.

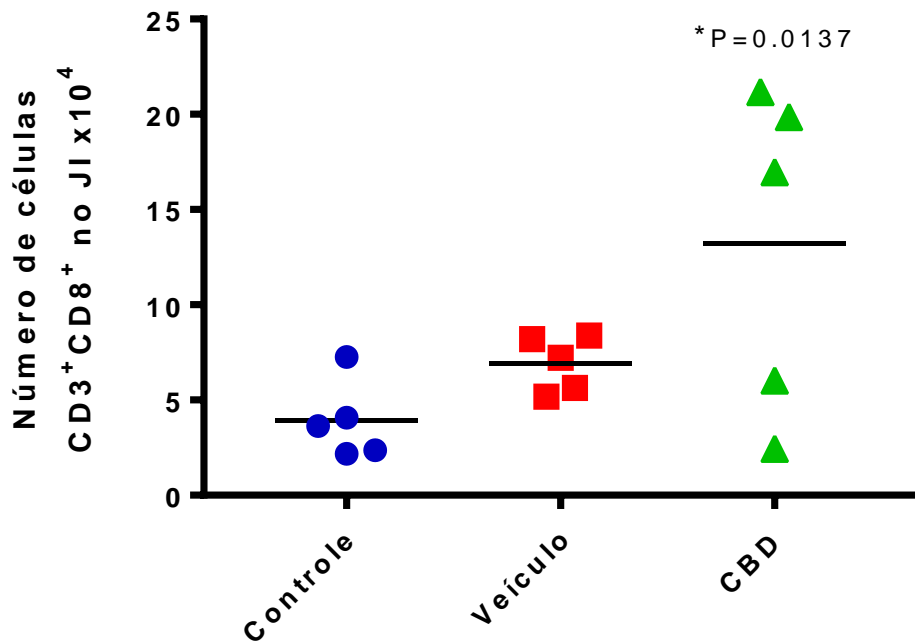
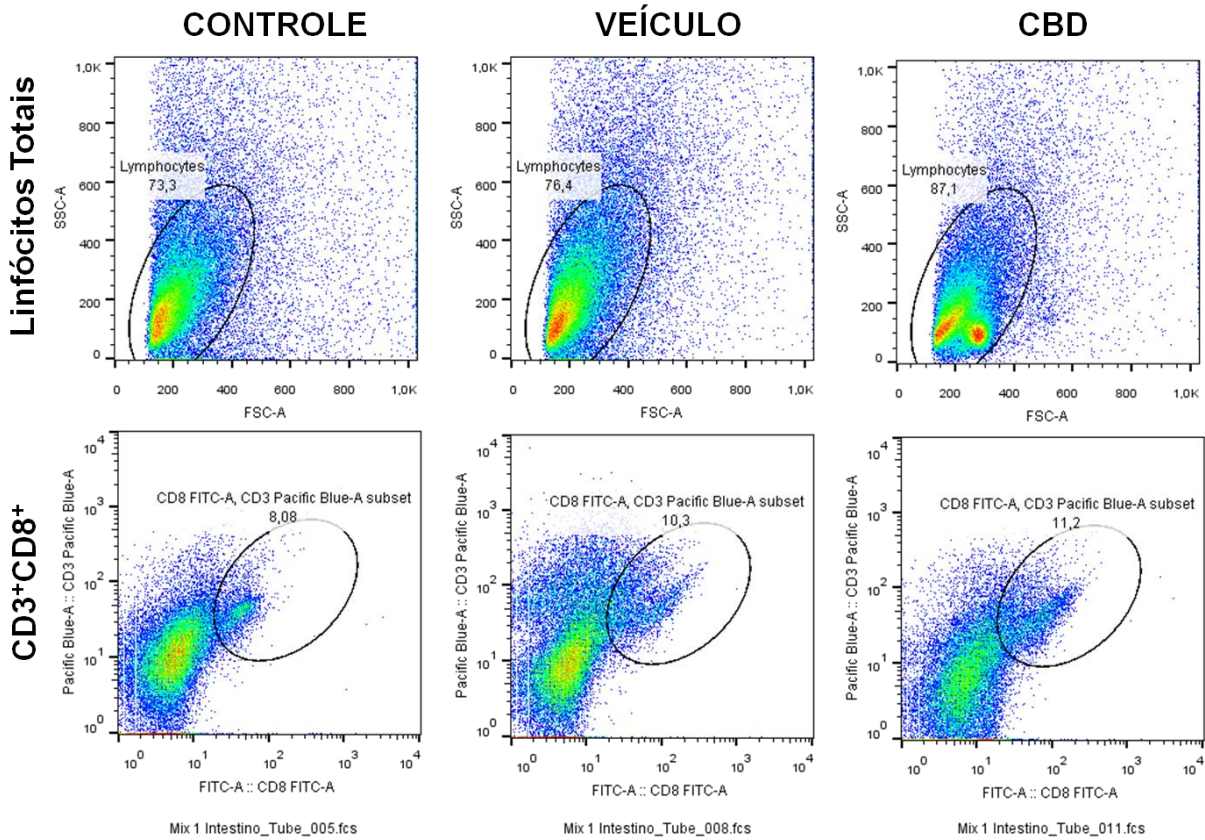
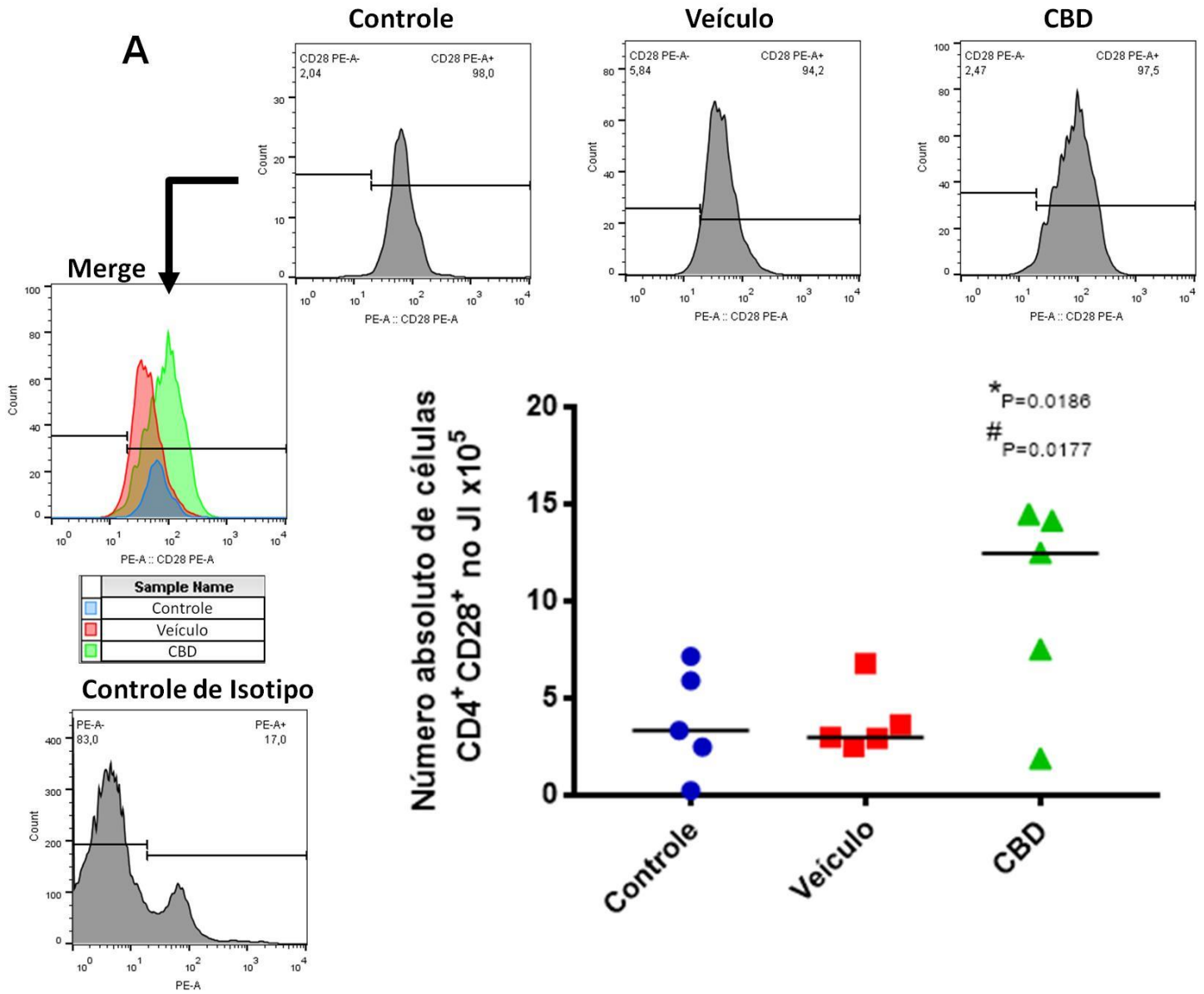


Figura 22. Quantificação de linfócitos CD8+ no jejunó-íleo. Os linfócitos CD3+CD8+ foram quantificados através de citometria de fluxo a partir de amostras de jejunó-íleo. Acima se observa a análise realizada no FlowJo® e abaixo estão os detalhes da análise estatística. \*P<0.05 comparado com controle e #P<0.05 comparado com veículo, os dados estão expressos em dispersão com mediana.



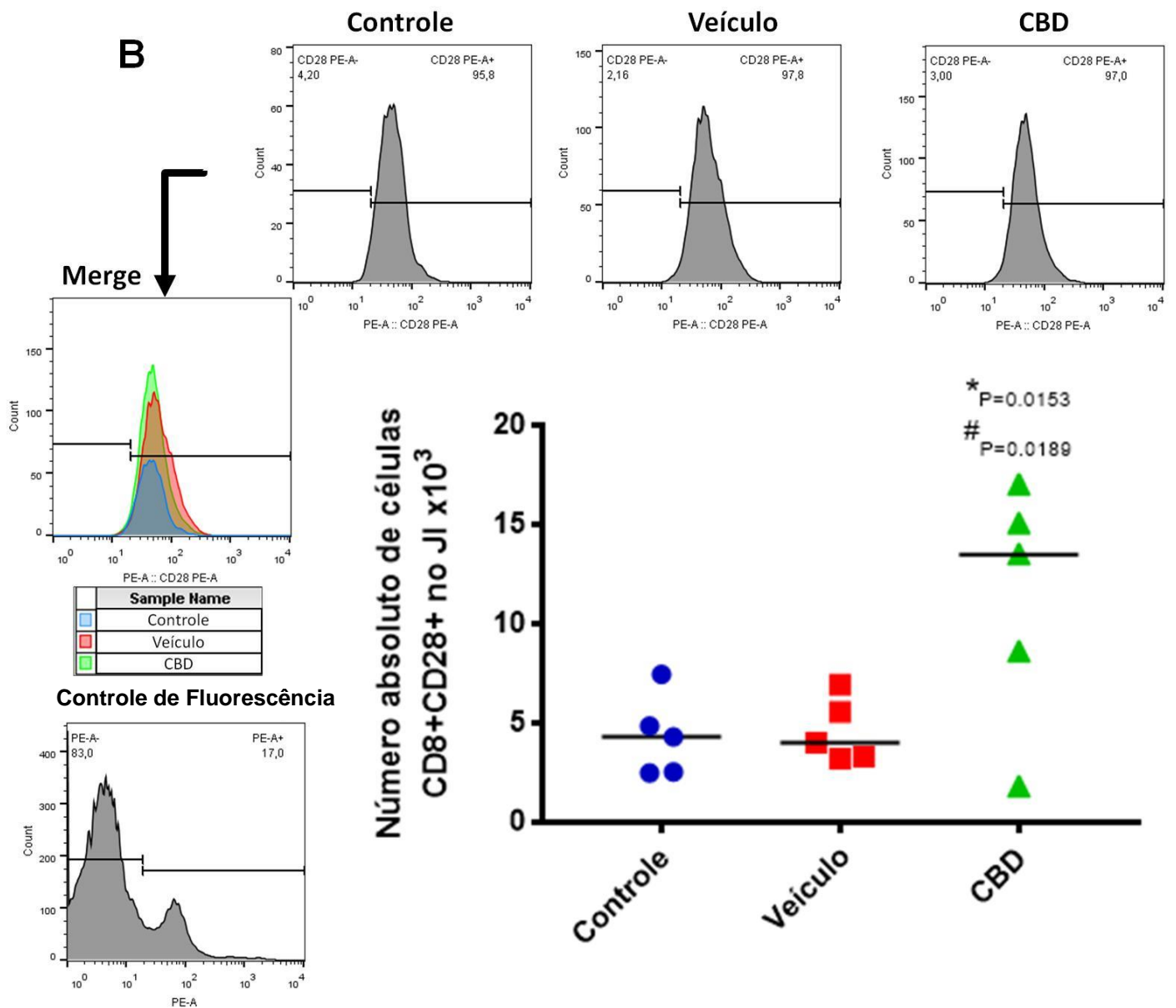


Figura 22. Quantificação de linfócitos CD28+ no jejunó-íleo. Os linfócitos (A) CD3+CD4+CD28+ e (B) CD3+CD8+CD28+ foram quantificados através de citometria de fluxo a partir de amostras de jejunó-íleo. Acima se observa a análise realizada no FlowJo® e abaixo estão os detalhes da análise estatística. \*P<0.05 comparado com controle e #P<0.05 comparado com veículo, os dados estão expressos em dispersão com mediana.



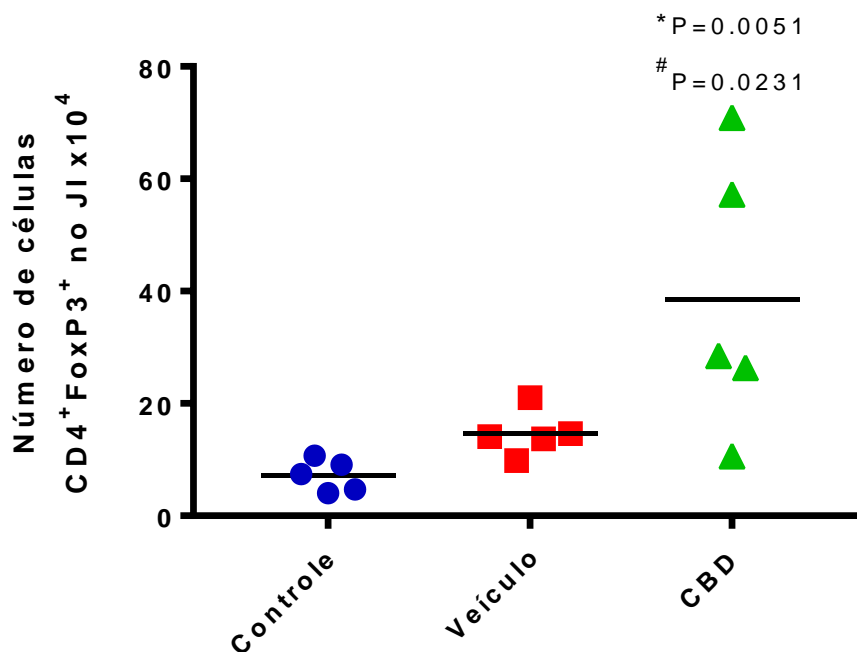
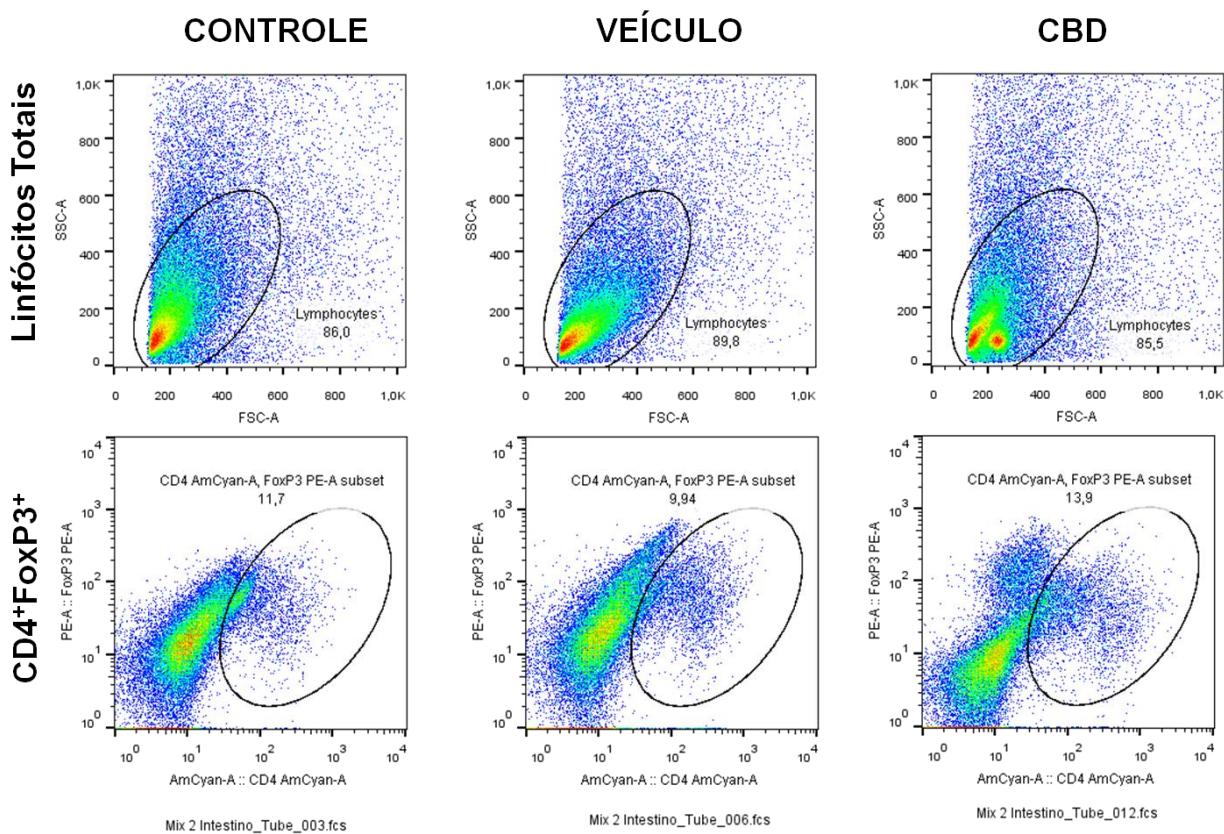


Figura 23. Quantificação de linfócitos FoxP3<sup>+</sup> no jejunó-íleo. Os linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> foram quantificados através de citometria de fluxo a partir de amostras de jejunó-íleo. Acima observa-se a análise realizada no FlowJo® e abaixo estão os detalhes da análise estatística. \*P<0.05 comparado com controle e #P<0.05 comparado com veículo, os dados estão expressos em dispersão com mediana.

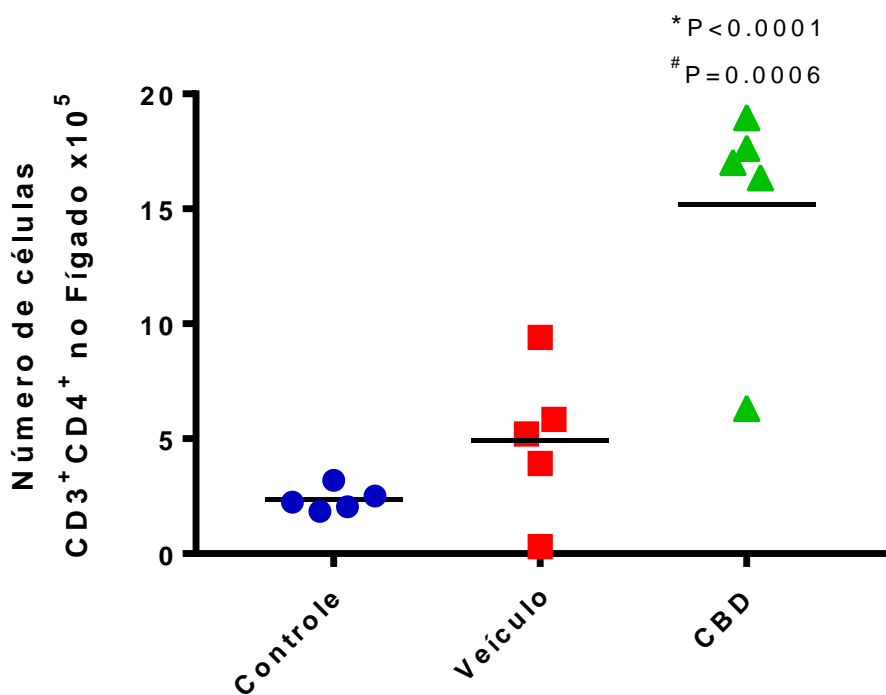
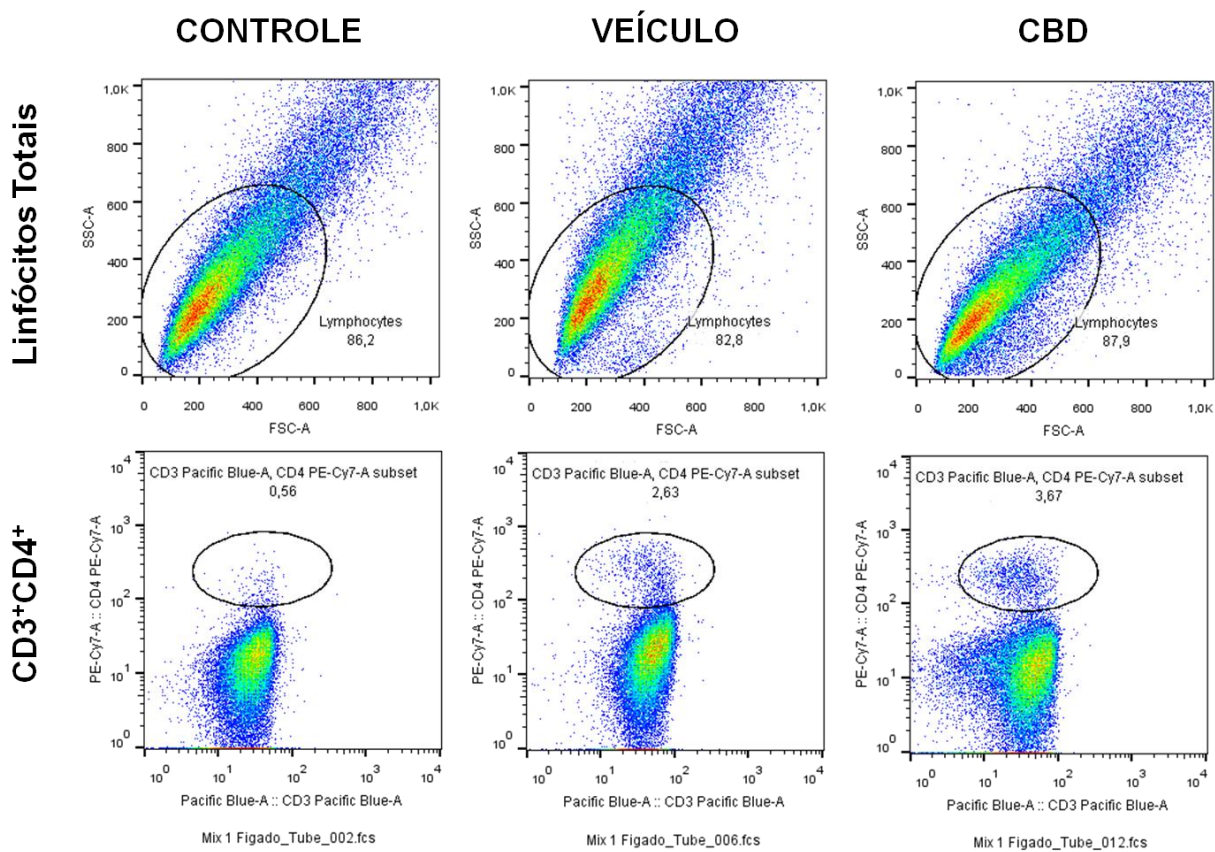


Figura 24. Quantificação de linfócitos CD4<sup>+</sup> no fígado. Os linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> foram quantificados através de citometria de fluxo a partir de amostras de fígado. Acima observa-se a análise realizada no FlowJo® e abaixo estão os detalhes da análise estatística. \*P<0.05 comparado com controle e #P<0.05 comparado com veículo, os dados estão expressos em dispersão com mediana.

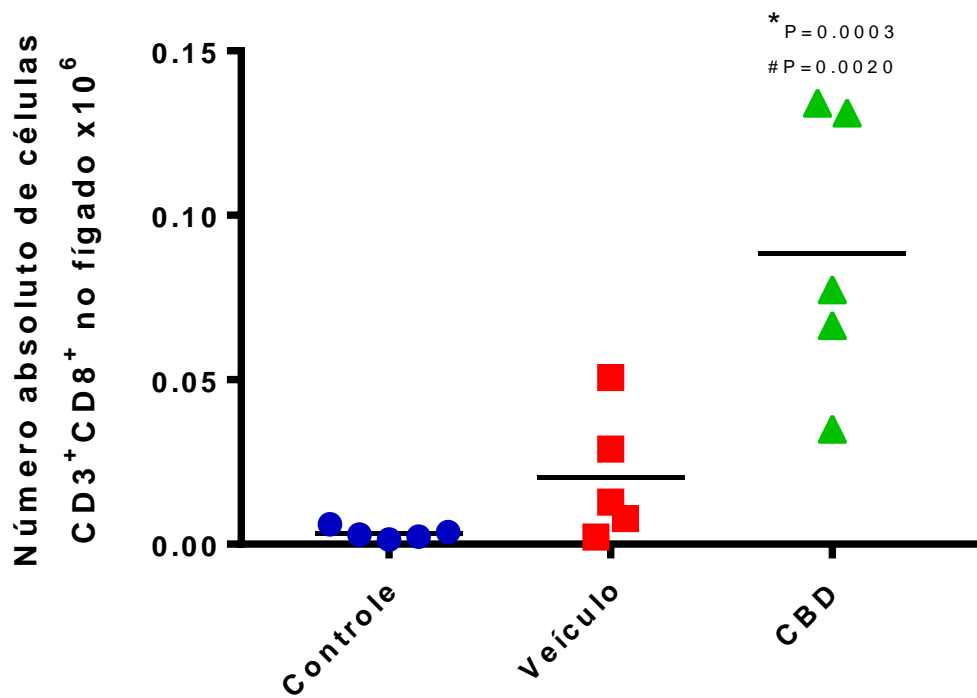
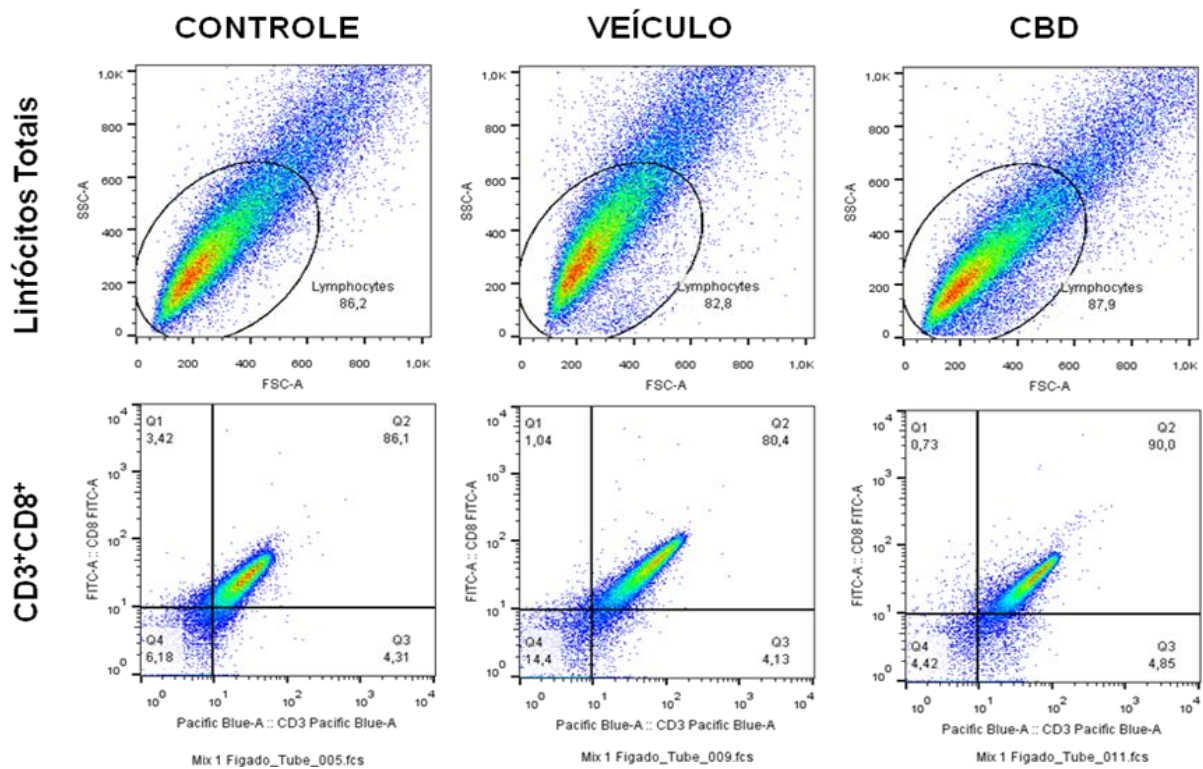
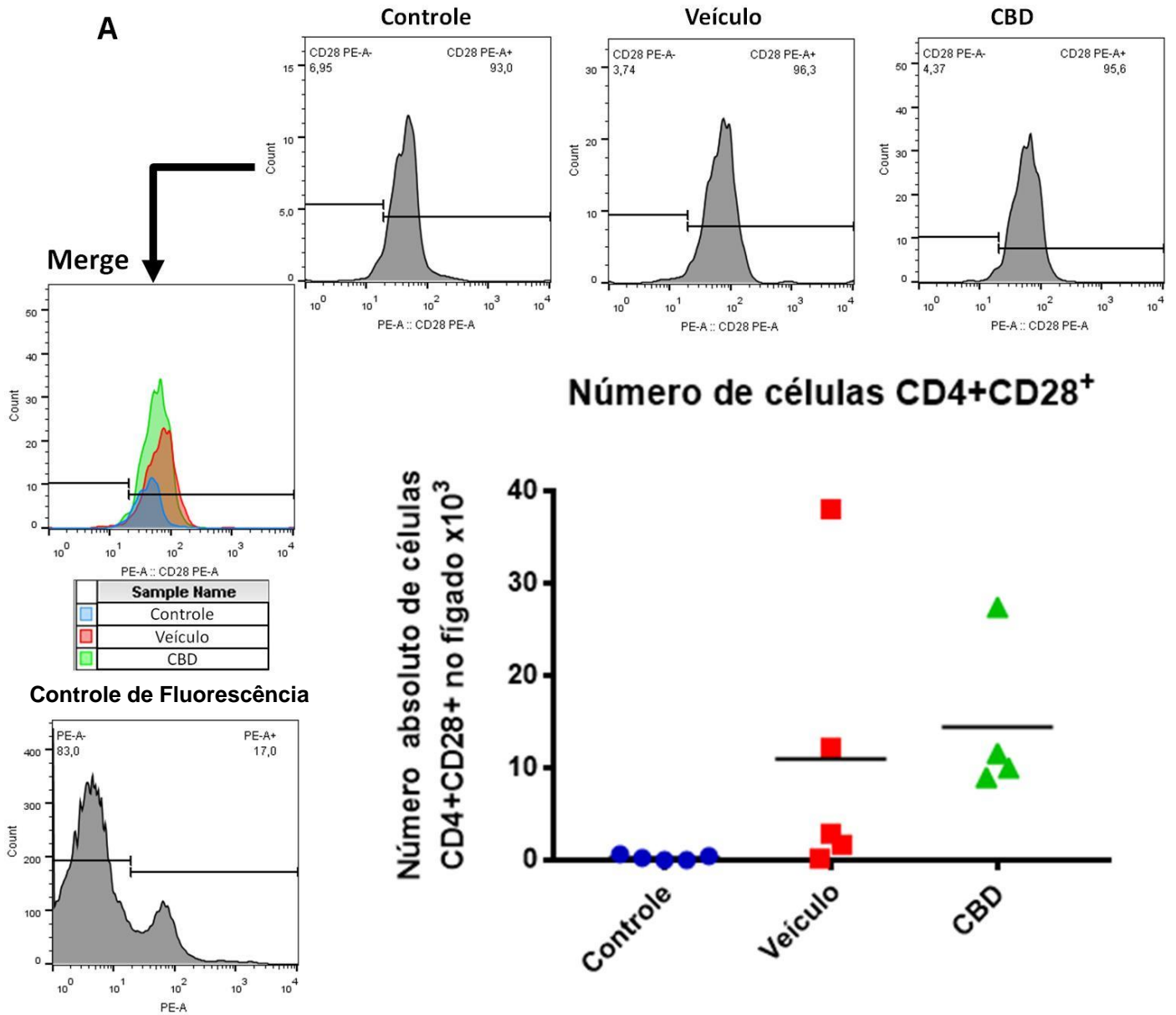


Figura 25. Quantificação de linfócitos CD8<sup>+</sup> no fígado. Os linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> foram quantificados através de citometria de fluxo a partir de amostras de fígado. Acima observa-se a análise realizada no FlowJo® e abaixo estão os detalhes da análise estatística. \*P<0.05 comparado com controle e #P<0.05 comparado com veículo, os dados estão expressos em dispersão com mediana.







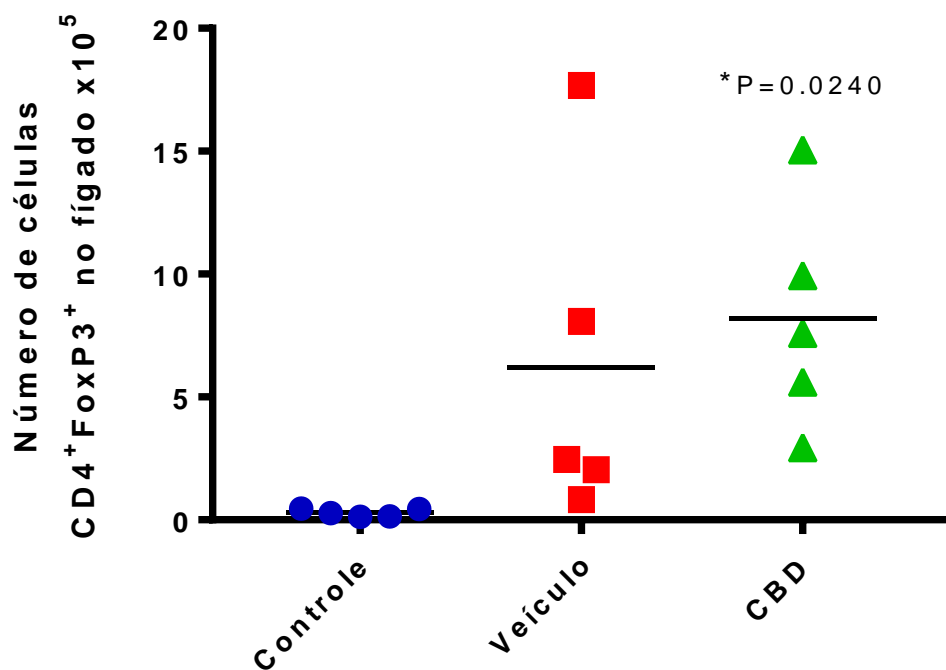
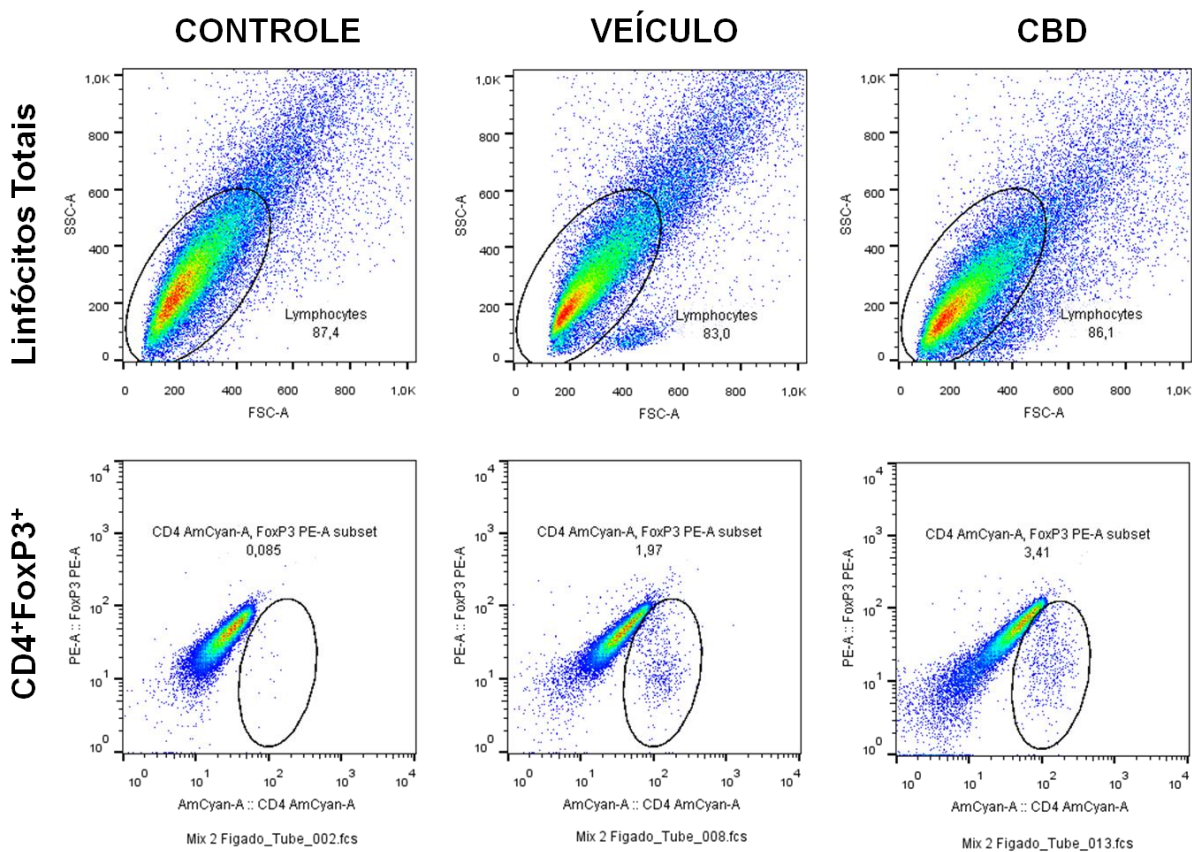


Figura 27. Quantificação de linfócitos FoxP3<sup>+</sup> no fígado. Os linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> foram quantificados através de citometria de fluxo a partir de amostras de fígado. Acima observa-se a análise realizada no FlowJo® e abaixo estão os detalhes da análise estatística. \*P<0.05 comparado com controle e #P<0.05 comparado com veículo, os dados estão expressos em dispersão com mediana.

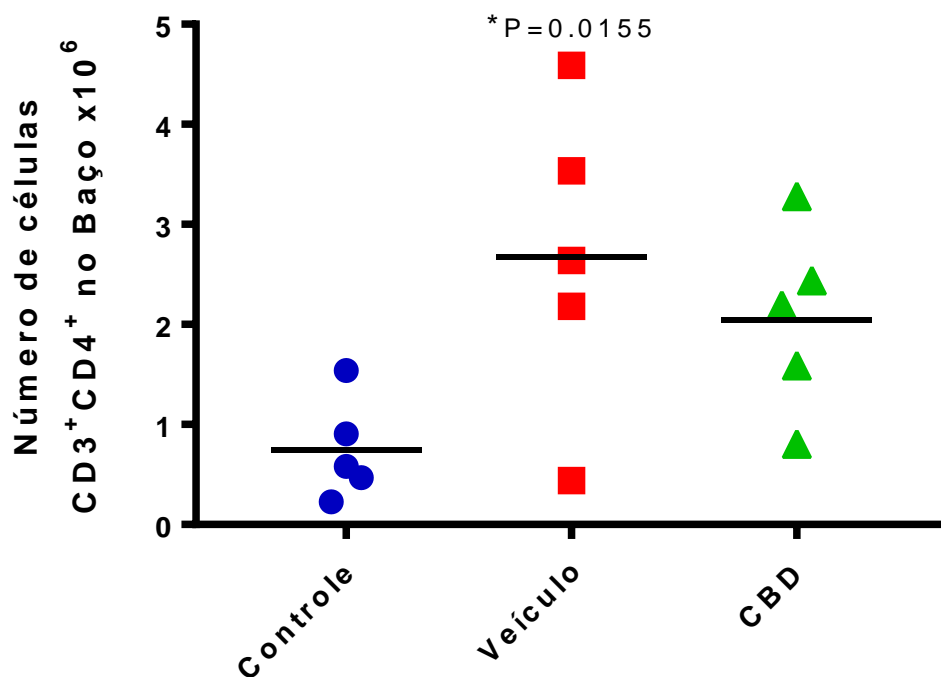
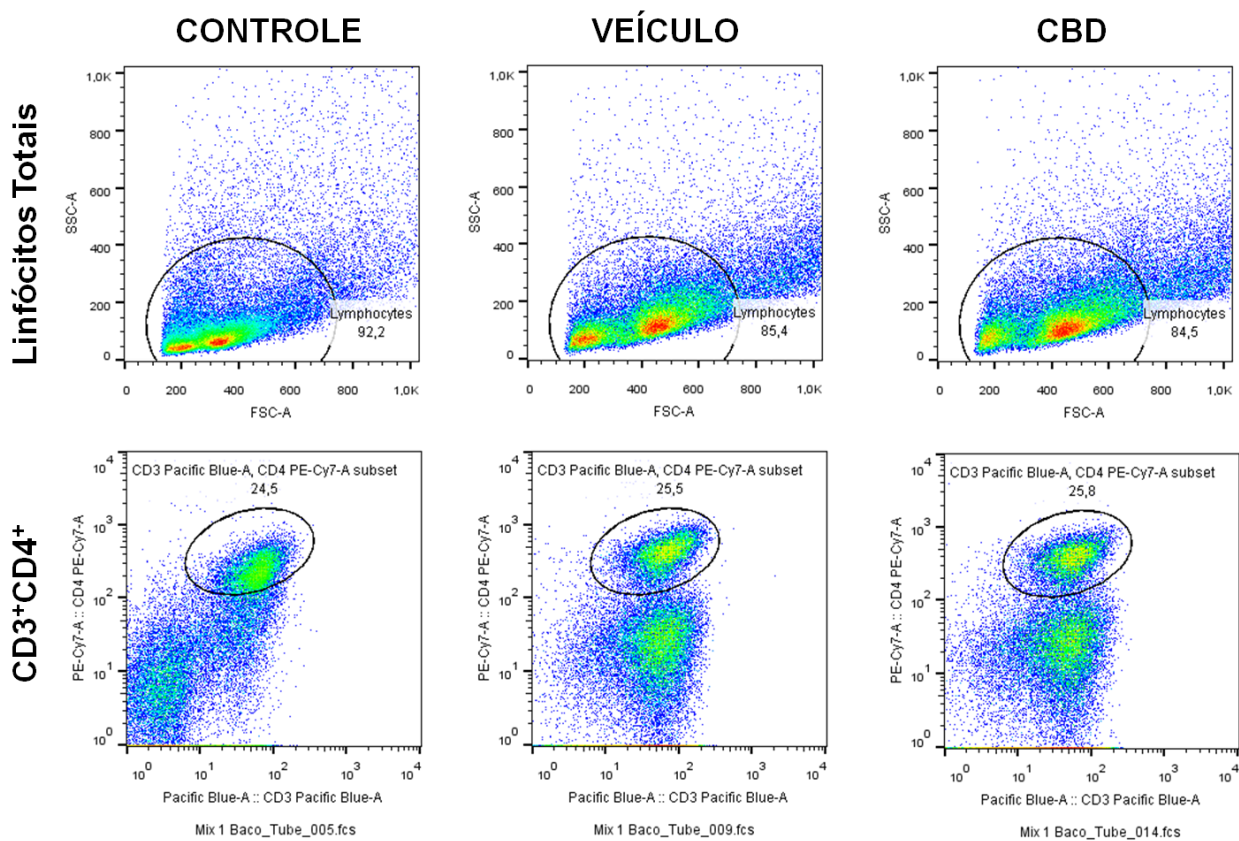


Figura 28. Quantificação de linfócitos CD4<sup>+</sup> no baço. Os linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> foram quantificados através de citometria de fluxo a partir de amostras de baço. Acima observa-se a análise realizada no FlowJo® e abaixo estão os detalhes da análise estatística. \*P<0.05 comparado com controle e #P<0.05 comparado com veículo, os dados estão expressos em dispersão com mediana.

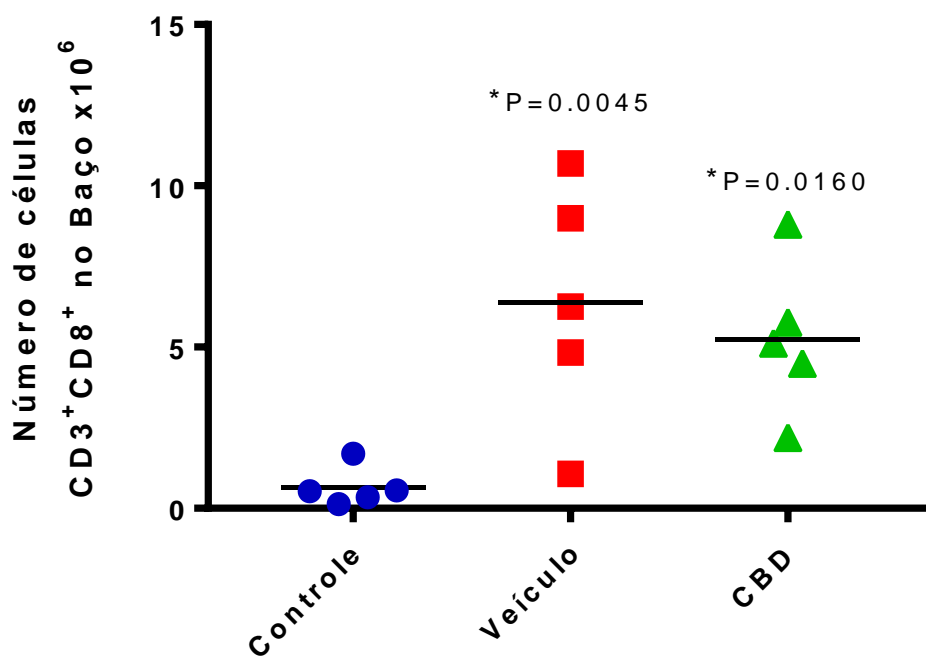
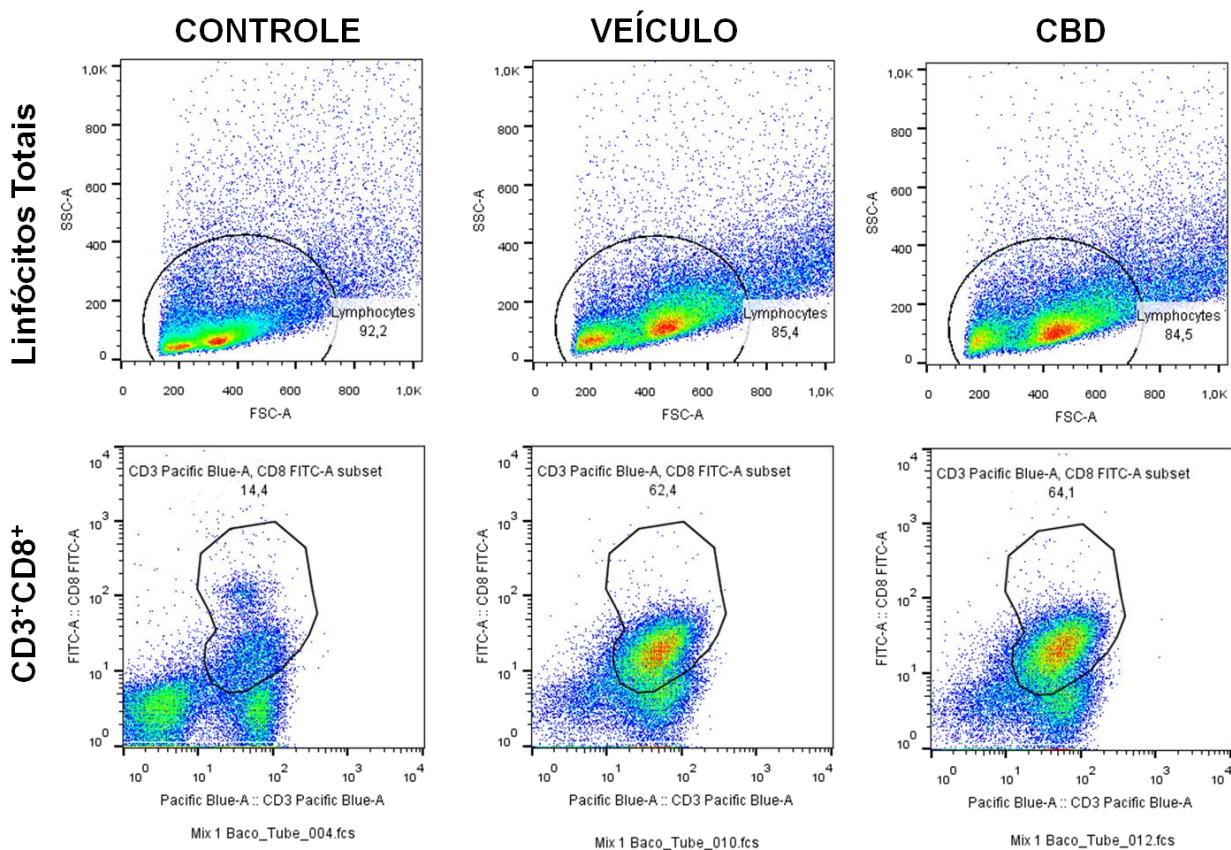
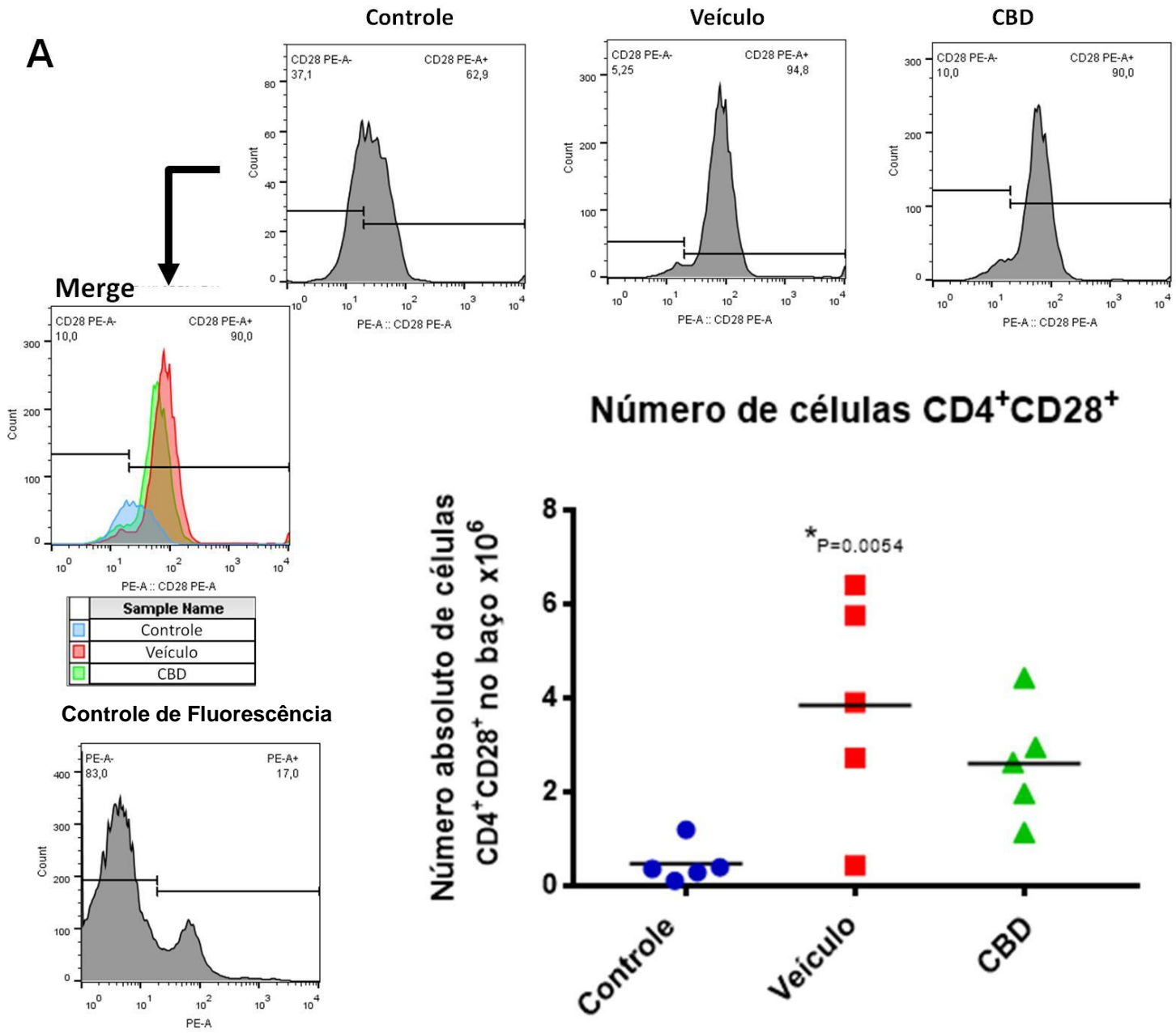


Figura 29. Quantificação de linfócitos CD8<sup>+</sup> no baço. Os linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> foram quantificados através de citometria de fluxo a partir de amostras de baço. Acima observa-se a análise realizada no FlowJo® e abaixo estão os detalhes da análise estatística. \*P<0.05 comparado com controle e #P<0.05 comparado com veículo, os dados estão expressos em dispersão com mediana.

**A**





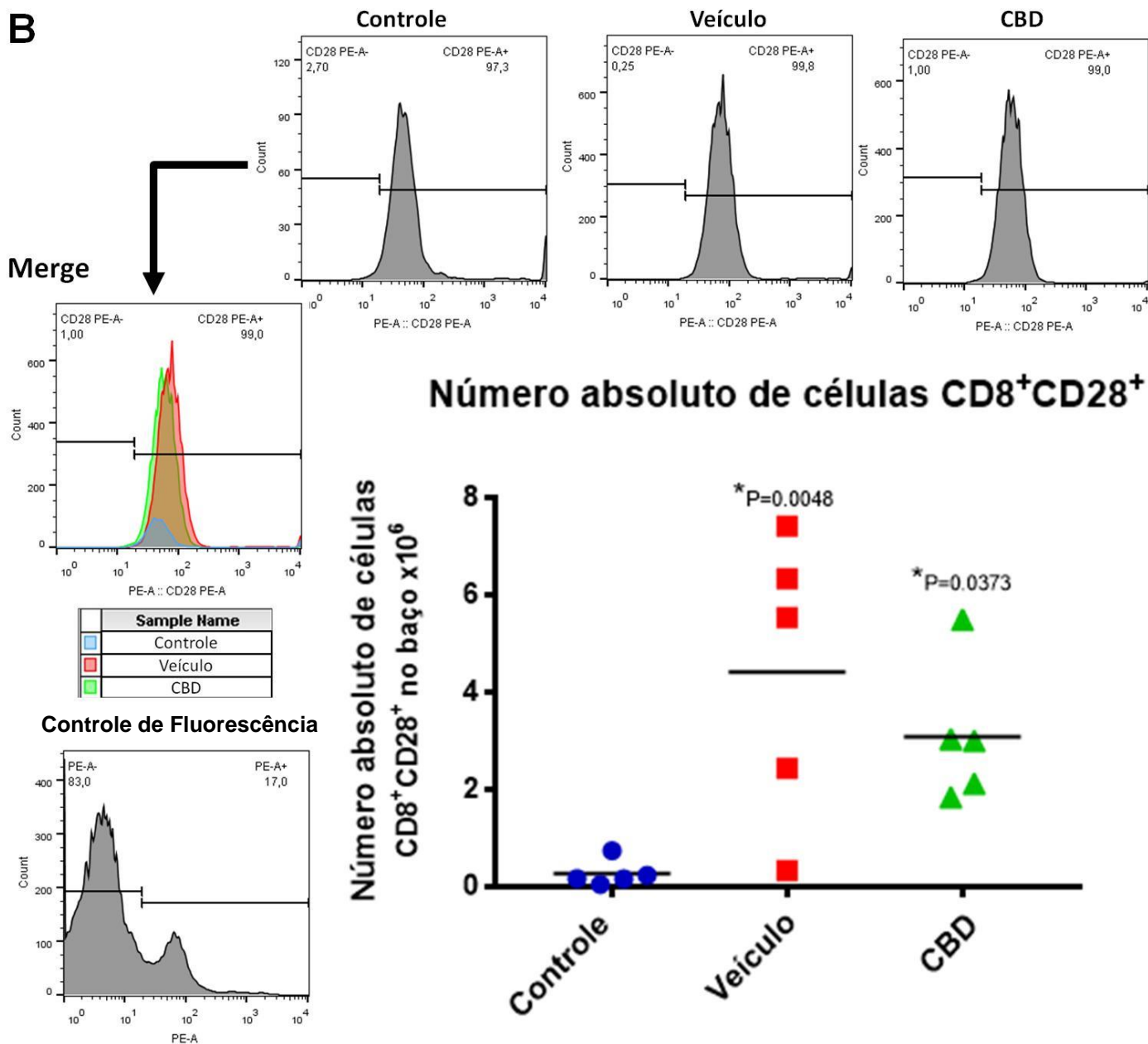


Figura 30. Quantificação de linfócitos CD28<sup>+</sup> no baço. Os linfócitos (A) CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> e (B) CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> foram quantificados através de citometria de fluxo a partir de amostras de baço. Acima se observa a análise realizada no FlowJo® e abaixo estão os detalhes da análise estatística. \*P<0.05 comparado com controle e #P<0.05 comparado com veículo, os dados estão expressos em dispersão com mediana.

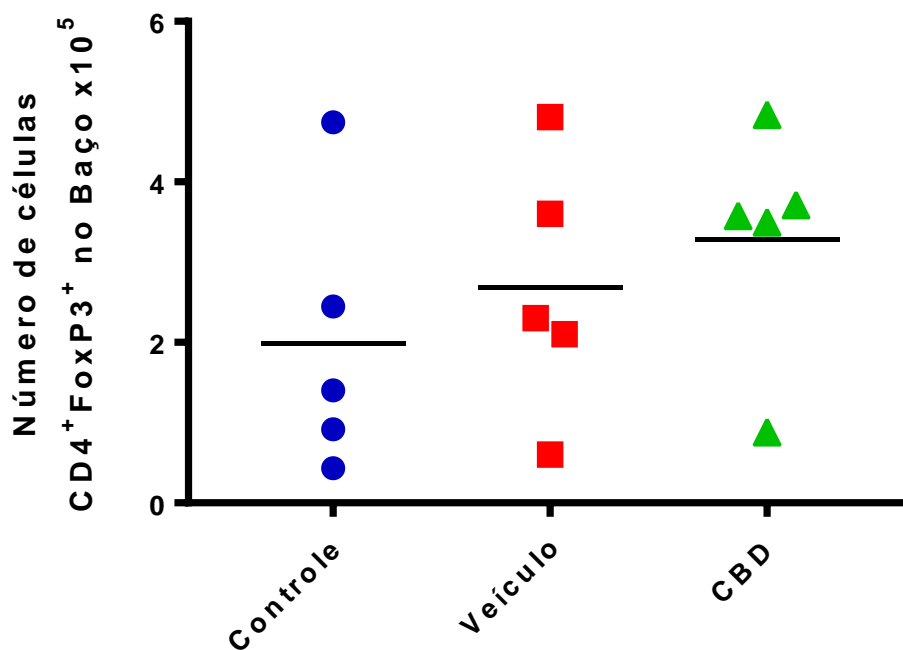
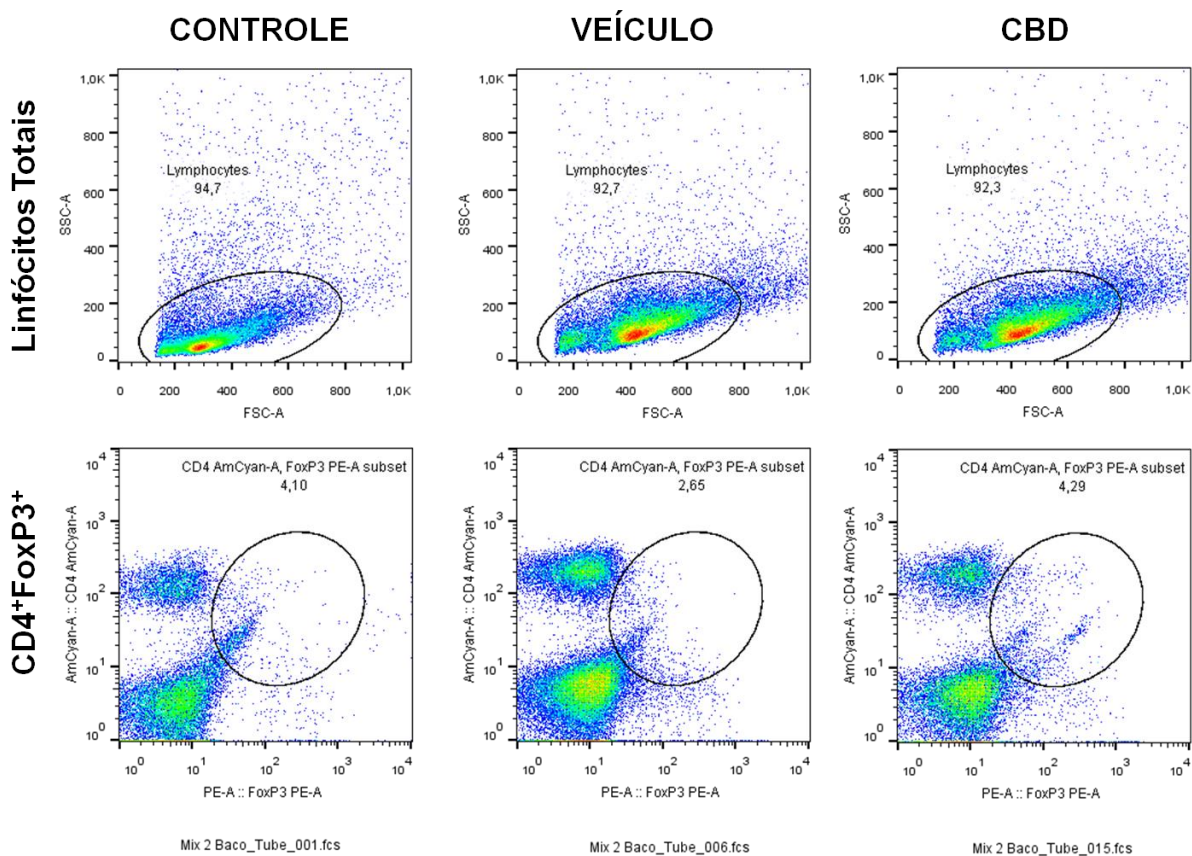


Figura 31. Quantificação de linfócitos FoxP3<sup>+</sup> no baço. Os linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> foram quantificados através de citometria de fluxo a partir de amostras baço. Acima observa-se a análise realizada no FlowJo® e abaixo estão os detalhes da análise estatística. \*P<0.05 comparado com controle e #P<0.05 comparado com veículo, os dados estão expressos em dispersão com mediana.

## **5.8. Graft-versus-leukemia (GVL)**

Uma das principais razões pelas quais o TMO é considerado uma boa opção terapêutica é o efeito do exerto-contra-tumor (GVL), gerado pela medula transplantada. Este efeito foi averiguado através de citometria de fluxo, em que avaliamos a marcação GFP<sup>+</sup> das células de mastocitoma murino (P815<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>) injetadas. O número de células tumorais, remanescentes após o transplante, foi verificado no baço (Figura 32) e nos linfonodos (Figura 33); o tratamento com Canabidiol não interferiu no GVL. As análises foram feitas à partir de um controle negativo de animais sem o tumor.



# Baço

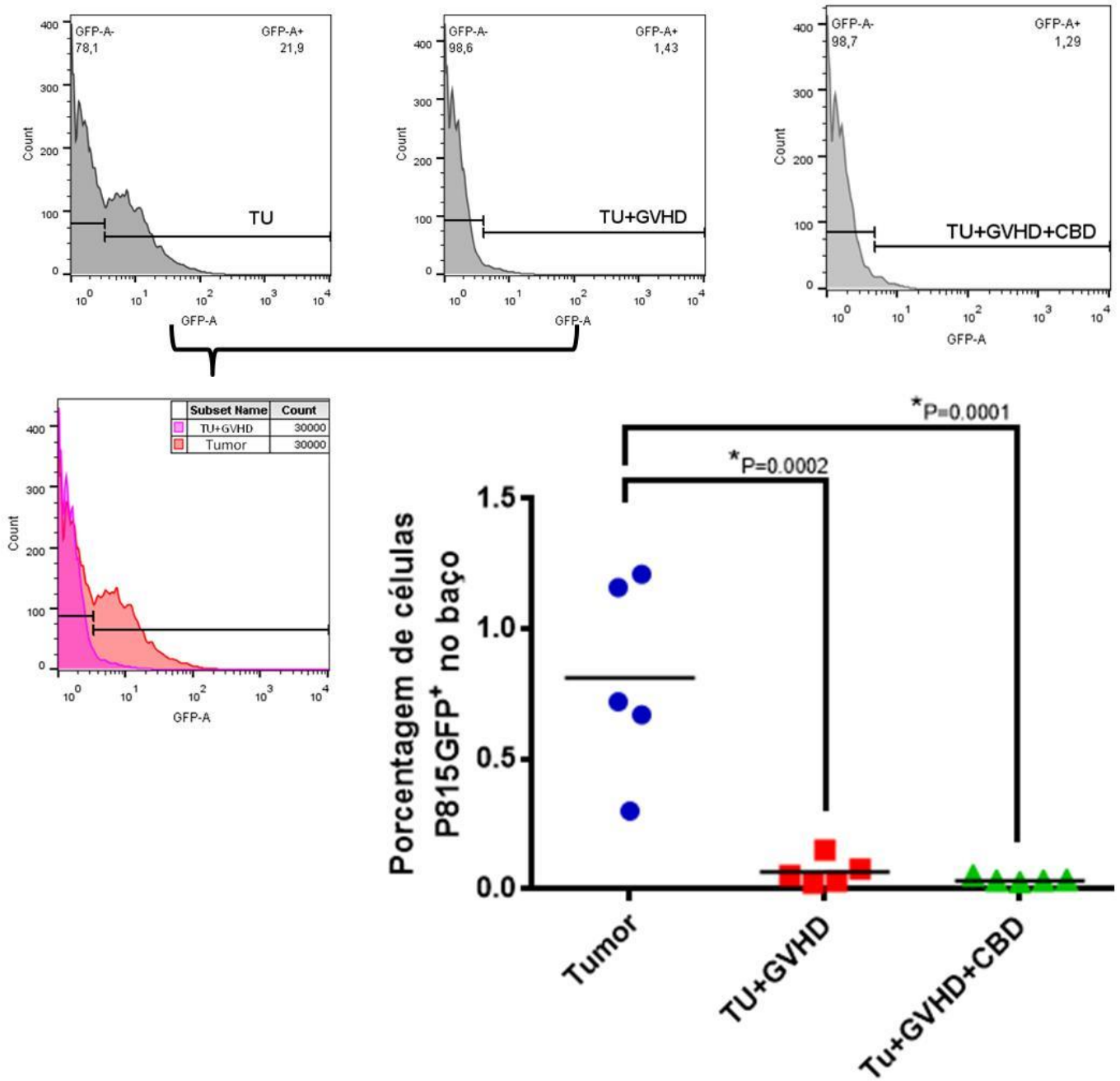


Figura 32. Efeito GVL em células P815+GFP+. Efeito anti-tumoral da GVHD em amostras de baço. Os gráficos estão expressos em dispersão e mediana, os grupos foram considerados diferentes para  $p < 0,05$ .

# Linfonodos

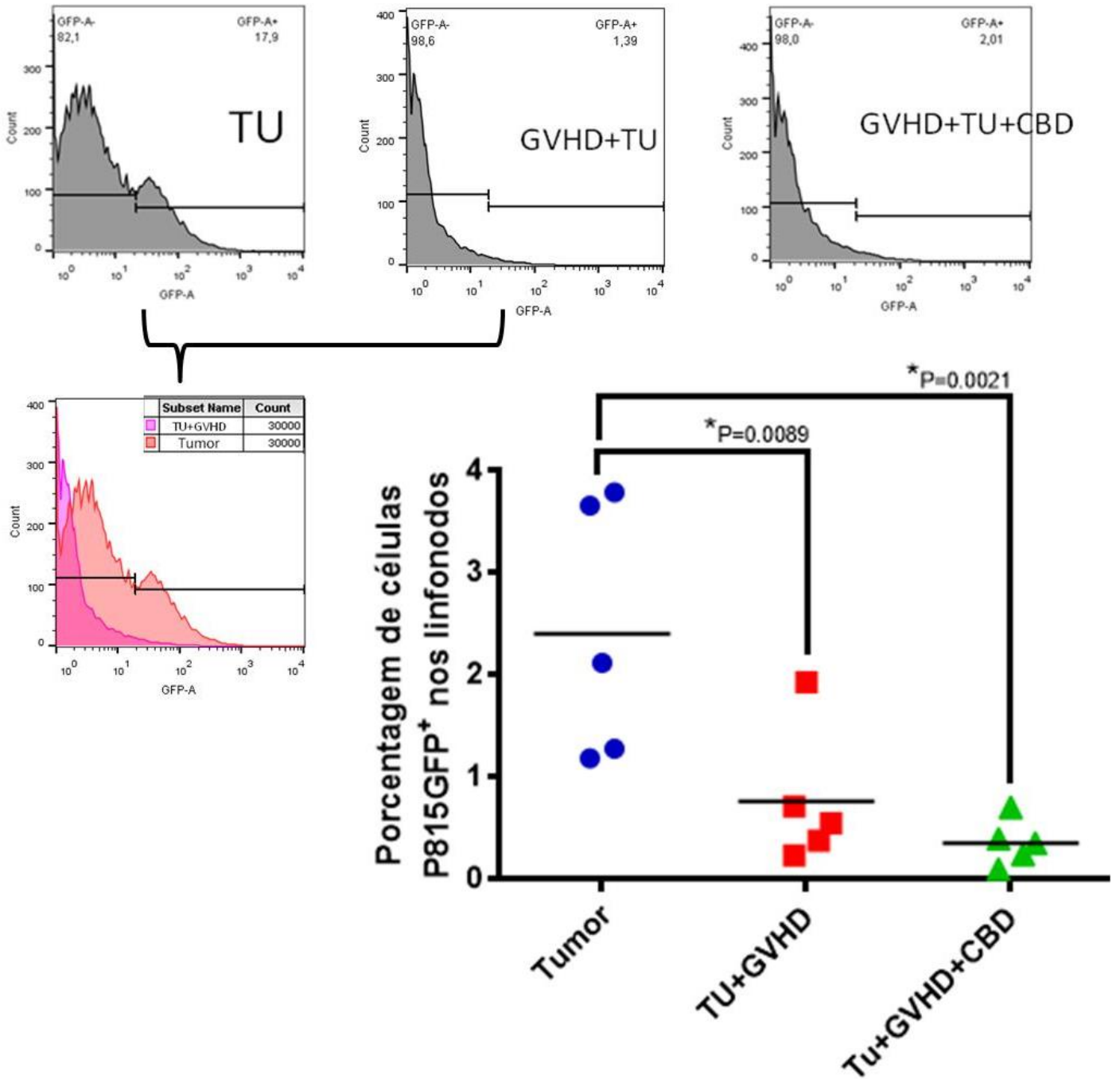


Figura 33. Efeito GVL em células P815<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>. Efeito anti-tumoral da GVHD em amostras derivadas de linfonodos mesentéricos e iguinais. Os gráficos estão expressos em dispersão e mediana, os grupos foram considerados diferentes para  $p < 0,05$ .

### 5.9. Participação dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> no efeito do tratamento com CBD na sobrevida de camundongos com GVHD

Os animais foram tratados com o fármaco AM251, um antagonista CB<sub>1</sub> (Figura 34) e com o fármaco AM630, um antagonista CB<sub>2</sub> (Figura 35). A mortalidade foi observada pelos dias subsequentes. Observou-se que antagonizando o receptor CB<sub>1</sub>, o Canabidiol continuou a exercer seus efeitos, apesar de haver ligeiro aumento na mortalidade, não houve diferença entre os grupos CBD e CBD+AM251. Por outro lado, o tratamento com antagonista do receptor CB<sub>2</sub> demonstrou redução do efeito protetor do CBD e aumento na taxa de mortalidade, sugerindo que o receptor CB<sub>2</sub> é importante para o efeito protetor de CBD.

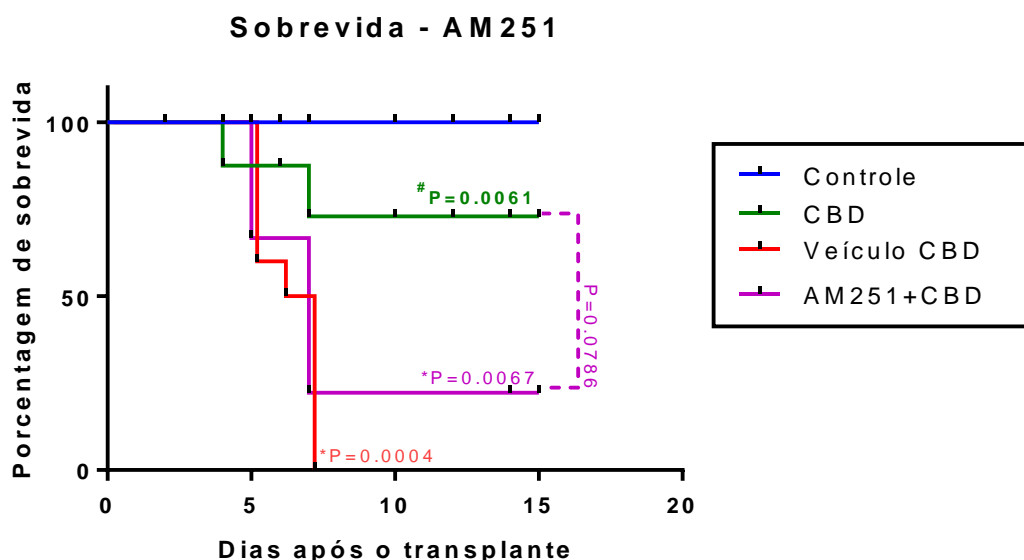


Figura 34. Tratamento com CBD e AM251 em conjunto com CBD. \*P<0.05 quando comparado ao controle, e #P<0.05 quando comparado ao veículo. (N=10)

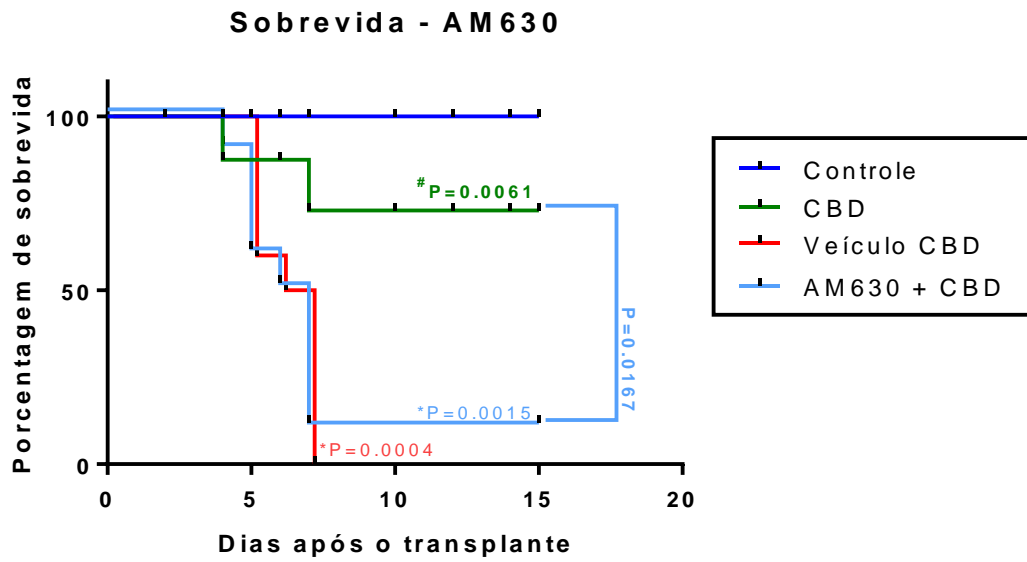


Figura 35. Tratamento com CBD e AM630 em conjunto com CBD. \*P<0.05 quando comparado ao controle, e #P<0.05 quando comparado ao veículo. (N=10)

## ***DISCUSSÃO***

## 6. Discussão

A aGVHD é uma doença complexa, sistêmica e de rápida progressão, caracterizada por episódios de imunossupressão e dano tecidual em vários órgãos (Shulman et al., 2015). O principal tratamento utilizado até hoje permanece sendo o uso de altas dosagens de corticoides, na tentativa de suprimir a inflamação sistêmica que se instala no paciente e aumentar sua sobrevida. O principal viés desta terapia é que, ao gerar um estado de imunossupressão no paciente, os corticoides abrem espaço para doenças oportunistas, como pneumonia (Stoma et.a., 2018) e infecções fúngicas (Miceli et al., 2017), ou mesmo que quaisquer células remanescentes da doença original no paciente (como tumores), uma vez não erradicadas, possam levar à recidiva desta doença. O uso, a longo prazo (mais de 60 dias), de corticoides leva, ainda, ao aparecimento de outros efeitos adversos em 90% dos pacientes, estes efeitos podem ser endócrinos, neuropsiquiátricos, gastrointestinais, músculo-esqueléticos, cardiovasculares e dermatológicos (Oray et al., 2016). Zaydfudim et.al. (2016) apontam que quando o TMO é realizado para tratamento de tumores, as chances de recidiva do tumor de origem aumentam proporcionalmente em relação ao tempo de uso dos corticoides, ao passo que as chances de sobrevida do paciente diminuem.

Existe também outro cenário que deve ser considerado, cerca de 50% dos pacientes com aGVHD não são responsivos ao tratamento com corticoides, desenvolvendo a chamada “GVHD refratária à corticoides” (Kordelas et al., 2014). Nestes casos, os pacientes tendem a ter sua expectativa, e qualidade de vida, reduzidas. Corticoides exercem sua proteção através de seu efeito linfocítico e pela supressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, especialmente  $TNF\alpha$ , e, portanto, é uma estratégia parcialmente efetiva na supressão da aGVHD, a despeito de seus efeitos negativos já citados, permanecendo como primeira estratégia terapêutica contra a GVHD (Ram&Rainer, 2013).

Por estas razões esforços em todo o mundo têm sido feitos no sentido de desenvolver novas terapias ou criar terapias complementares ao uso de corticoides. Como terapias emergentes podemos citar Inolimomab, um anticorpo monoclonal para CD25, que se mostrou promissor em estudos de

fase 2 como tratamento para casos de aGVHD refratária a esteroides mas que, entretanto, não se mostrou mais eficaz que o tratamento padrão para estes casos (globulina anti-timocítica), com mortalidade de 60% dos pacientes (Socié et al., 2017). E como novas terapias complementares ao uso de corticoides, o Itacinib, um inibidor seletivo de JAK1 que encontra-se atualmente em estudo de fase 3, se mostrou promissor e bem tolerado por humanos, aparentando não afetar o GVL (Chen et al., 2018). Há também o Natalizumab, um inibidor seletivo de moléculas de adesão, que foi testado em estudo de fase 2. Entretanto, dos pacientes que participaram do estudo, 50% foram a óbito devido à toxicidade do tratamento, efeitos adversos ou doenças oportunistas (Kekre, 2017).

É importante ressaltar que, terapias complementares, que visam aumentar a eficácia de tratamentos com corticoides, ainda estão suscetíveis aos dois vieses já descritos: aumento do risco de infecções secundárias e aumento da propensão à recidiva da doença de origem. Conforme descrito por Auletta et.al. (2015), um ponto importante que deve sempre ser considerado ao se tratar da busca de novos fármacos eficazes contra a GVHD é que o tratamento deve aumentar a sobrevivência do paciente, reduzir dano tecidual modulando a inflamação, mas, entretanto, sem causar perda do efeito GVL e sem reduzir a porção de quimerismo, ou seja, de enxertamento da nova medula. Afinal, uma das principais razões de se recorrer ao TMO alogênico é o efeito do enxerto-contratumor que irá reagir contra quaisquer células tumorais remanescentes no hospedeiro mesmo após intenso regime de condicionamento (Forman et al., 2015).

Desta forma, apresentamos um composto inicialmente isolado por Roger Adams em 1940, cujo potencial terapêutico e anti-inflamatório só vem sendo verdadeiramente explorado nos últimos anos. Este composto chamado de Canabidiol (CBD) é um canabinoide natural derivado da *Cannabis sativa*, planta com utilização descrita desde 2737 a.C., sendo prescrita pelo imperador Shen-Nung para tratamento de diversas patologias, dentre elas doenças autoimunes e inflamatórias (Bloomquist, 1968; Guy e cols., 2004).

Neste trabalho o CBD foi utilizado como tratamento profilático para GVHD. Primeiramente, fizemos um teste para saber se o CBD poderia interferir no processo de enxertamento e formação de quimera do animal transplantado.

Este teste é importante, uma vez que, na clínica, se não houver o adequado enxertamento da nova medula no hospedeiro, este, fatalmente morrerá por imunossupressão. O mesmo é observado nos camundongos submetidos ao TMO. Assim, camundongos tratados com CBD tiveram o mesmo percentual de enxertamento e formação de quimera com a nova medula em relação ao grupo veículo, o que faz desta uma potencial estratégia terapêutica para a GVHD.

O tratamento com CBD também foi capaz de aumentar a sobrevivência e reduzir significativamente a escala clínica e a progressão de perda de peso nos animais tratados em relação ao grupo veículo. É importante salientar que esta redução não foi suficiente para que o animal retornasse aos mesmos níveis do animal controle que recebeu transplante singênico, de forma que se tornou evidente que o CBD não aboliu por completo a resposta inflamatória. Estes dados podem ser confrontados com os dados de Yeshurum et.al. (2015) em que um estudo clínico de fase 2 com CBD demonstrou que este não interferia no quimerismo, redução da incidência e sintomas relacionados ao aGVHD e redução na perda de peso dos pacientes enquanto estes permaneceram sob o uso de CBD.

Procurando entender como o CBD poderia estar reduzindo as manifestações da doença e a mortalidade, realizamos uma análise histológica dos principais órgãos alvo da GVHD aguda, intestino e fígado. E também nesta análise o CBD repetiu o mesmo perfil, reduzindo a lesão em relação ao grupo veículo, mas ainda não o suficiente para igualar-se ao grupo controle. A análise histológica revelou também que o JI foi mais afetado que o fígado, possivelmente pela forma de progressão da doença, de forma que o período de sete dias de GVHD aguda não foi o suficiente para que a doença se instalasse, por completo, no fígado. Ou seja, na GVHD aguda, um dos primeiros órgãos a ser afetado é o intestino (Zeiser, et al., 2017). Nossos dados também estão em concordância com os dados obtidos por Panoskaltis-Mortari et.al. (2016), em que a autora acompanhou a migração de células GFP<sup>+</sup> durante sete dias após o TMO e observou que imediatamente após o transplante as células doadas migram para órgãos linfoides, mesmo em um modelo de transplante singênico. Entretanto, três dias após o transplante, apenas em animais que receberam TMO alogênico, as células



transplantadas começam a migrar para os órgãos alvo, especialmente intestino. E assim como observamos, ao sétimo dia após o transplante existe baixo povoamento de células doadas no fígado (Figura 33). Esta análise condiz também com a fase eferente da GVHD, descrita por Baker e cols. (2018), em que o infiltrado de células mononucleares se torna evidente, bem como o dano histológico (Figura 36). Esta fase ocorreria posteriormente à fase aferente, em que as células T maduras do doador reconheceriam disparidades antigênicas aos tecidos do receptor, resultando em alo-ativação e proliferação destas células, o que seria o início da GVHD. Este dado repete o descrito em modelo murino de colite, em que CBD também se mostrou promissor em reduzir inflamação do cólon e dano tecidual (Schicho & Storr, 2012). Assim como demonstrado no intestino, a redução de inflamação no fígado através do tratamento com CBD já havia sido evidenciada em um modelo murino de esteatose hepática induzida por álcool (Wang et al., 2017).

---

## Imagens de microscopia intravital 7 dias após o TMO

---

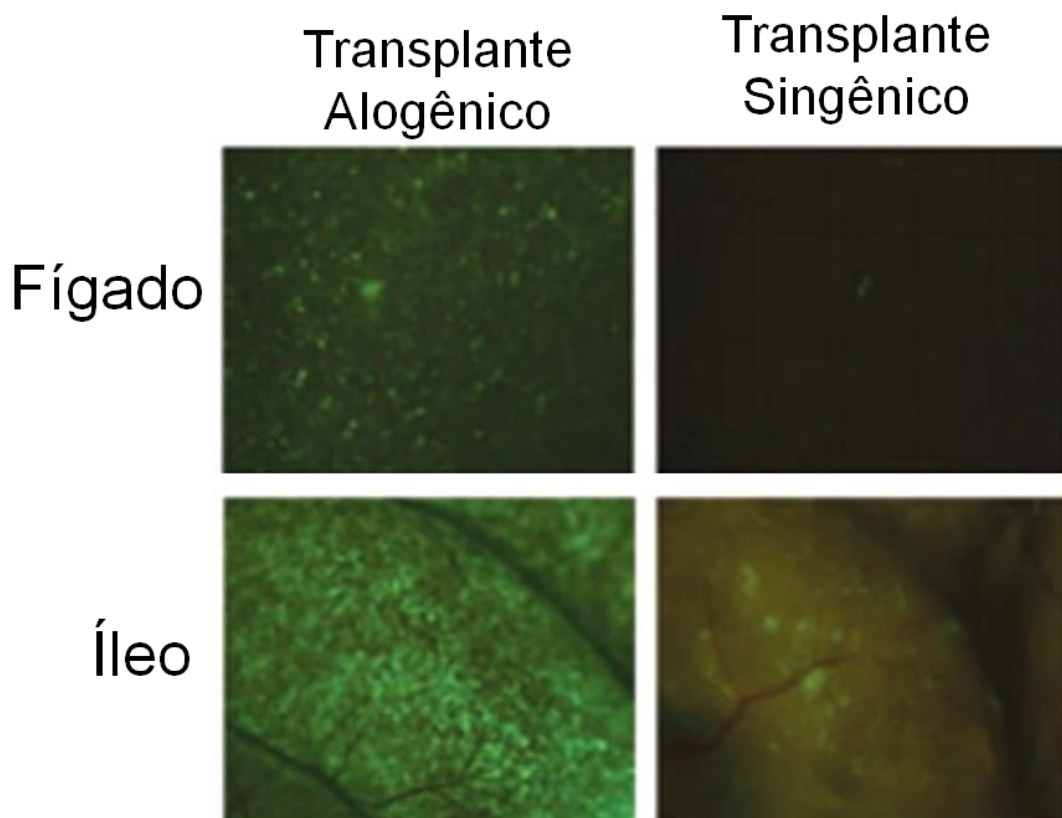


Figura 36. Figura adaptada de Panoskaltis-Mortari et.al. (2016). A imagem de microscopia

intravital apresenta as diferenças de migração de células GFP<sup>+</sup> (verde) tanto no fígado quanto no íleo de animais que receberam transplante alogênico e singênico.

As observações realizadas nos cortes histológicos foram reiteradas pela análise de ELISA, em que observamos a redução de várias citocinas e quimiocinas. Avaliamos CCL2, uma quimiocina quimioatraente de macrófagos, sendo um crítico e importante fator solúvel responsável por recrutar monócitos para *loci* específicos durante processos inflamatórios (Carson et al., 2017). Terwey et.al. (2005) demonstraram que CCL2 possui um importante papel na ativação e migração de células CD8<sup>+</sup>, tanto para o fígado quanto para o intestino, durante a GVHD.

CCL3, que também é responsável por atrair monócitos para desenvolver processos inflamatórios, possuindo importante papel em respostas inflamatórias intestinais (Schulthess et.al., 2012). CCL5, uma quimiocinas da mesma família da CCL3, que possui papel ativo no recrutamento de uma grande variedade de leucócitos, tais como: linfócitos, macrófagos e eosinófilos, sendo também importante na ativação de células natural killer. CCL5 é tipicamente produzida por células T CD8<sup>+</sup> (Aldinucci et al., 2014). Mecha et.al. (2013) encontraram a mesma redução de CCL2 e CCL5 que observamos, em um modelo murino de esclerose múltipla, em que os animais foram tratados diariamente com CBD encontrando também a redução do dano tecidual. É interessante que, Horváth et.al. (2012) observou, em um estudo *in vitro* com células transfectadas com receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, que a utilização do agonista seletivo para CB<sub>2</sub>, o HU-910, gerou redução similar dos níveis de CCL3 e CCL2. Serody et.al. (2000) observaram que CCL3, CCL5 e TNF $\alpha$ , produzidas por células T aumentam o recrutamento de macrófagos que, por sua vez, irão produzir mais TNF $\alpha$  e perpetuar a resposta inflamatória.

Sendo assim, avaliamos a citocina TNF $\alpha$ , de grande importância na regulação da resposta imune e homeostasia celular, seu desbalanço está relacionado a inúmeros processos inflamatórios e manutenção da sobrevivência de células imunes (Blaser et al., 2016). Em diferentes modelos inflamatórios, CBD se mostrou eficiente em gerar regulação, de forma que os autores propõem que parte deste mecanismo pode estar relacionado à redução de TNF $\alpha$ . Dentre estes trabalhos, podemos citar Oláh et.al. (2014) que investigou se o

tratamento com CBD apresentava ação lipostática em um modelo *in vitro* de células sebáceas estimuladas com ácido araquidônico ou uma combinação de ácido linoléico e testosterona. Em outro estudo, Campos et.al. (2015) avaliou os efeitos do tratamento diário com CBD em camundongos fêmea submetidos a um modelo de malária cerebral, em que a autora relata aumento de sobrevivência e melhora cognitiva. Nestes estudos, o papel regulatório de CBD parece estar relacionado com a redução dos níveis de TNF $\alpha$ .

Também foi avaliada IFN $\gamma$ , que apresenta potente ação sinérgica com as demais, ou seja, sua redução leva à redução do efeito inflamatório (Wysocki et al., 2005). Ellison et.al. (1998) estudaram o papel da IFN $\gamma$  em camundongos que receberam células de animais *knockout* para esta citocina, e observaram que estes receptores apresentavam uma forma mais branda de aGVHD, com um maior tempo de sobrevivência, indicando que a presença de IFN $\gamma$  pode estar relacionada ao desenvolvimento e letalidade da doença.

Em nosso modelo, observamos que o tratamento com CBD levou à redução de IFN $\gamma$  nos órgãos alvo. Entretanto, em diferentes modelos o efeito de CBD sob o IFN $\gamma$ , tende a variar, porquanto, autores como Lehmann et.al. (2016) não encontraram esta redução em um modelo murino de pancreatite inflamatória tratado com CBD, de fato, neste modelo houve aumento de IFN $\gamma$ ; ao passo que Hegde et.al. (2011) se depararam com redução desta citocina em um modelo murino de hepatite ao realizar tratamento com CBD. Esta ação aparentemente dual pode estar relacionada à interação de cannabidiol com diferentes receptores em diferentes modelos de doenças inflamatórias e em diferentes tecidos. Couch et.al. (2017) observaram ainda que o efeito redutor desta ação sinérgica de IFN $\gamma$  sob outras citocinas, gerado pelo tratamento com CBD, é dependente do receptor CB $_2$ , desaparecendo com a inibição deste receptor. Sido et.al. (2015) demonstrou efeitos similares ao tratar camundongos com GVHD com  $\Delta$ 9-THC diariamente, observando redução de TNF- $\alpha$  e IFN $\gamma$ , entretanto, o autor encontrou que, em seu modelo,  $\Delta$ 9-THC exerce seus efeitos majoritariamente através de sua interação com CB $_1$  e não CB $_2$ . Por fim, IL-17, uma citocina pró-inflamatória produzida por células T ativadas e que estimula diversos tipos celulares, dentre eles os macrófagos, a produzirem mediadores pró-inflamatórios que resultam na indução de processos inflamatórios (Iwakura & Ishigame, 2006). Das citocinas avaliadas,

IL-17 permanece como sendo a mais complexa, de forma que existem controvérsias a despeito de seu papel no desenvolvimento da patologia associada à GVHD. Porquanto alguns autores associaram esta citocina ao desenvolvimento da aGVHD (Yi et al., 2008), outros a associaram à processos regulatórios na GVHD (Cai et al., 2016) e ainda alguns encontraram evidências de que esta citocina não possui papel fundamental no desenvolvimento da doença ou de GVL, mas que poderia estar relacionada ao desenvolvimento de aGVHD mediada por células T CD4<sup>+</sup> (Kappel et al., 2009). Alguns autores como Hedge et.al. (2011), em um modelo de hepatite aguda causada pela administração de concanavalina A; e Kozela et.al. (2016), em um modelo de esclerose múltipla; observaram redução de IL-17. Em nosso modelo de GVHD a IL-17, que aparenta não ser tão relevante, não estando alterada em nenhum dos grupos.

Os dados encontrados pela análise de mediadores inflamatórios foram reiterado pelos achados de citometria de fluxo. Nesta técnica analisamos a presença de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, sendo CD3<sup>+</sup> um cluster presente em células T maduras, encontrado em praticamente todos os linfócitos T periféricos, sendo utilizada para separar este tipo celular dos demais, porquanto células CD4<sup>+</sup> são linfócitos T ativados que se diferenciaram em T-regulatórias ou T-indutoras, apresentando o cluster CD4 em sua superfície celular. Dhital & Kaplan (2017) observaram que o tratamento de células T com CBD e co-estimulação de anticorpo anti-CD28 gera aumento no número de células CD4 e FoxP3<sup>+</sup>, sendo, entretanto, dependente de estímulo. Desta forma, analisamos também o marcador FoxP3 para linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, de forma que este marcador é considerado o mais específico para linfócitos T-helper, sendo expresso constitutivamente e apresentando importante papel na regulação da aGVHD (Rezvani et.al.,2006). Diversos autores associam a redução de mecanismos regulatórios e conseqüentemente redução de células CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> com o desenvolvimento de um ambiente permissivo para o aparecimento da GVHD e que mecanismos que levem ao aumento deste tipo celular promovem regulação da GVHD (Miura et al., 2004; Rieger et al., 2006; Di Iani et al., 2011; Belle et al., 2016). Dhital et.al. (2016) observou que o tratamento com CBD leva à diferenciação e aumento do número de células CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, porquanto Hedge et.al. (2008) encontrou efeito semelhante ao

tratar camundongos com  $\Delta 9$ -THC, gerando também redução dos danos teciduais em um modelo de hepatite auto-imune.

Portanto, a regulação gerada pelo tratamento com CBD pode ser causada pelo aumento de linfócitos  $CD4^{+}FoxP3^{+}$ , conforme demonstrado em citometria de fluxo, ainda que houvesse aumento de células T  $CD8^{+}$  neste órgão. Sendo que, novamente, tanto a redução de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, quanto o aumento de células  $CD4^{+}$  ou de células  $FoxP3^{+}$  foi muito mais sutil no fígado, o que corrobora nossa hipótese de que o processo inflamatório no fígado ainda se encontra em processos iniciais, não sendo suficiente para gerar proliferação e diferenciação crítica de linfócitos. Neste mesmo sentido, Zhao et.al. (2016) encontraram evidências de que esta proliferação e diferenciação de linfócitos se concretizariam no fígado ao 15º dia após a indução da GVHD.

Linfócitos  $CD3^{+}CD8^{+}$  são linfócitos T-citotóxicos (Sandvig et al., 1987). Em nosso trabalho encontramos aumento destas células tanto no fígado quanto no intestino. É interessante observar que, em modelo de encefalomielite, Elliott et.al. (2018) e, em um modelo de miocardite autoimune, Lee et.al. (2016) observaram que o tratamento com CBD foi capaz de reduzir os níveis de células  $CD8^{+}$  e  $CD4^{+}$ , um resultado que contradiz o que encontramos em nosso modelo. Entretanto, DiMarzo et.al. (2017) relatam que em seu modelo de doença degenerativa músculo-esquelética, CBD não gerou alteração no número de células  $CD8^{+}$ , de forma que esta alteração pode ser dependente do modelo experimental.

Avaliamos também linfócitos T  $CD3^{+}CD4^{+}CD28^{+}$  e  $CD3^{+}CD8^{+}CD28^{+}$ , uma vez que  $CD28$  é considerado como uma importante molécula co-estimulatória, induzindo a ativação de linfócitos T e aumentando a sobrevida celular (Kinosada et al., 2017), de forma que utilizamos este marcador para averiguar a ativação dos linfócitos encontrados nos tecidos. Chen et.al. (2012) relatam que os efeitos de CBD, na redução de citocinas é amplificado pela estimulação com anti- $CD28$  e o autor relata também que o tratamento com CBD levou ao aumento de células  $CD8^{+}$ .

Ao avaliar o baço, órgão linfoide associado à maturação de linfócitos sendo vital para manutenção da imunidade humoral (Tanabe, et al., 2015), houve pouca alteração no número de linfócitos, de forma que, apenas a quantidade

de linfócitos CD8<sup>+</sup> foi alterada no grupo veículo, mas se mostrou mais ativa tanto para veículo quanto para CBD. Não houve alteração no número de células FoxP3<sup>+</sup>, indicando que o baço não estava sob ataque das células transplantadas, mas que estas já haviam se maturado e estavam em processo de migração ou já situadas nos órgãos alvo (Baker et.al, 2018). Sadeghi et.al. (2008) evidenciam que o número de células no baço aumenta imediatamente após o transplante, tanto no grupo singênico quanto alogênico, mas que neste primeiro grupo a contagem cai e se estabiliza, enquanto que, no grupo alogênico, o número de células no baço tende a cair, de forma que os autores observaram desaparecimento gradual dos linfócitos, sendo este um resultado similar ao que encontramos.

É importante ressaltar que o aumento de linfócitos T é algo relativamente benéfico para o hospedeiro, uma vez que a redução no número de células T está relacionada ao aumento de proliferação tumoral mesmo após transplante alogênico (Taylor et.al, 2018). As células T CD8<sup>+</sup>, por sua vez, tem potente papel na reação anti-tumoral já bem elucidada na literatura, de forma que mesmo este aumento, aparentemente patogênico compõe o complexo mecanismo do efeito GVL (Klebanoff et al., 2005; Lee e.al., 2009; Sommermeyer et al., 2016). Em contraste, Champlin et.al. (1990) haviam encontrado relação entre a presença de células CD8<sup>+</sup> e maior incidência de aGVHD, estabelecendo um método de manipulação do HSCT para remoção deste tipo celular. Por outro lado, a alta letalidade associada à GVHD pode ser reduzida pela ação de células T-reguladoras, de forma que a presença destas células induz tolerância do enxerto em relação do hospedeiro (Jofre et al., 2018; Taylor et al., 2018).

Em parte, nossos achados são similares ao encontrado por Rupal et.al. (2011), sendo que, neste caso o tratamento foi realizado com administração diária de  $\Delta$ 9-THC, um canabinoide natural como o CBD, mas que, entretanto, é responsável pelos efeitos psicômiméticos da *Cannabis sativa*. Neste estudo, os autores relatam que os animais tratados apresentaram redução da perda de peso, redução de citocinas pró-inflamatórias (TNF $\alpha$  e IL-2) e aumento de células CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, sem que o tratamento interferisse no processo de quimerização. Ao antagonizar os receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> os autores relatam que os efeitos de  $\Delta$ 9-THC foram revertidos, enquanto que o

mesmo ensaio neste trabalho revelou que os efeitos de CBD estão relacionados, em parte, ao receptor CB<sub>2</sub>, mas não a CB<sub>1</sub>. Outro ponto divergente é que o autor relata redução do número total de células, enquanto o tratamento com CBD gerou aumento deste número.

É interessante destacar que, enquanto o receptor CB<sub>1</sub> está majoritariamente expresso em tecidos neurais, o receptor CB<sub>2</sub> (ou receptor canabinoide periférico) é altamente expresso em células imunes (Adams et al., 2018). Buckley et.al. (2000) testaram o efeito de  $\Delta$ 9-THC em animais *knockouts* para o receptor CB<sub>2</sub> e descobriram que, apesar destes animais serem aparentemente saudáveis, a regulação de células T-regulatórias induzida por  $\Delta$ 9-THC foi interrompida na ausência deste receptor. Ehrhart e col. (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. Em adição a estes dados, sabe-se que apesar de apresentar baixa afinidade a CB<sub>1</sub>, CBD apresenta afinidade similar ao receptor CB<sub>2</sub> quando comparado com  $\Delta$ 9-THC. Porquanto a diferença de afinidade de CB<sub>2</sub> para CB<sub>1</sub> para  $\Delta$ 9-THC é 76,29% sendo, portanto, mais seletivo para CB<sub>2</sub> em relação a CB<sub>1</sub>, CBD é 74,47% mais seletivo para CB<sub>2</sub> (Rosenthaler et.al.,2014). Desta forma, a ativação do receptor CB<sub>2</sub> poderia ser um dos mecanismos de regulação do CBD em nosso modelo experimental. Em nosso modelo experimental, observamos que CBD parece não atuar diretamente nos receptores CB<sub>1</sub>, mas sim através de CB<sub>2</sub>, uma vez que o aumento de sobrevida, gerado por CBD, foi abolido na presença de AM630, um antagonista seletivo de CB<sub>2</sub>, ao mesmo passo que AM251, um antagonista seletivo de CB<sub>1</sub> não surtiu o mesmo efeito na sobrevida.

Com base em nossos dados e os dados encontrados na literatura, CBD se apresenta como um potencial tratamento para a GVHD, sendo eficaz na melhoria de sinais clínicos, aumentando a sobrevida e promovendo regulação de processos inflamatórios nos órgãos alvo. Entretanto, reconhecemos que ainda são necessários mais estudos a fim de melhor esclarecer os mecanismos farmacológicos de ação deste fármaco, uma vez que, apesar de CBD se apresentar parcialmente dependente de CB<sub>2</sub>, ainda restam lacunas a serem preenchidas.

## ***CONCLUSÃO***



#### 4. Conclusão

O tratamento com Canabidiol levou à modulação dos processos inflamatórios relacionados à GVHD através da redução de diversos fatores pró-inflamatórios e aumento do número de células T-regulatórias (FoxP3<sup>+</sup>). A redução dos principais mediadores inflamatórios, como IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , CCL2, CCL3, CCL5, especialmente no intestino, pode estar relacionada à ativação de do receptor CB2, uma vez que este demonstrou ser necessário para o aumento da sobrevivência dos animais (Figura 37). O aumento de linfócitos T CD4 FoxP3<sup>+</sup> pode também estar relacionado à redução dos mediadores inflamatórios, como IFN $\gamma$ . Desta forma, Canabidiol representa uma interessante molécula a ser explorada para o tratamento da GVHD.

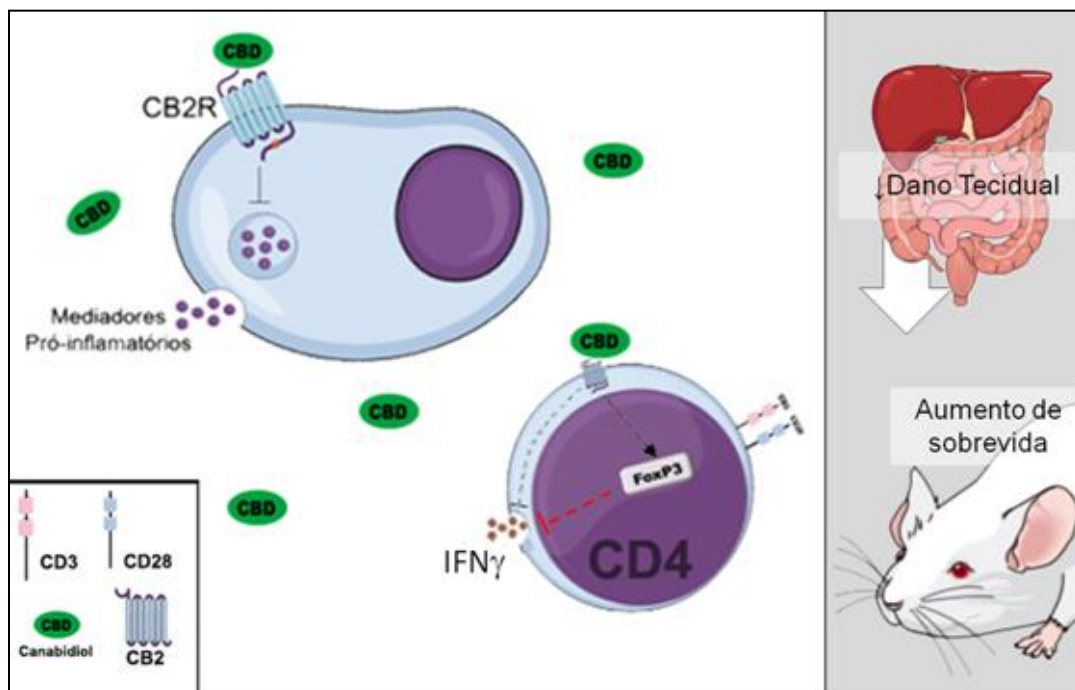


Figura 37. Ativação do receptor CB2 é parte do mecanismo regulatório de CBD. Através desta ativação ocorre a inibição da liberação de mediadores inflamatórios. A ativação deste receptor pode também estar relacionado ao aumento de linfócitos CD4 FoxP3<sup>+</sup> que, por sua vez, pode também levar à redução dos mediadores inflamatórios. Estes mecanismos cumulam na redução do dano tecidual que será refletido no aumento de sobrevivência dos camundongos com GVHD.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

## 5. Referências Bibliográficas

ADAMS, J. et al. APD371: a potent, highly selective, full agonist of the human CB<sub>2</sub> receptor with sustained analgesic effects in rodents. *The Journal of Pain*, v. 19, n. 3, p. S2, 2018. ADAMS, J. et al. APD371: a potent, highly selective, full agonist of the human CB<sub>2</sub> receptor with sustained analgesic effects in rodents. *The Journal of Pain*, v. 19, n. 3, p. S2, 2018.

ADAN, A. et al. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology*, v. 37, n. 2, p. 163-176, 2017.

ALDINUCCI, D.; COLOMBATTI, A.. The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression. *Mediators of inflammation*, v. 2014, 2014.

ALYEA, E. P. et al. Impact of conditioning regimen intensity on outcome of allogeneic hematopoietic cell transplantation for advanced acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, v. 12, n. 10, p. 1047-1055, 2006.

APPIAH, Kingsley K. et al. Identification of Small Molecules That Selectively Inhibit Diacylglycerol Lipase- $\alpha$  Activity. *Journal of biomolecular screening*, v. 19, n. 4, p. 595-605, 2014.

AULETTA, J. J. et al. Human mesenchymal stromal cells attenuate graft-versus-host disease and maintain graft-versus-leukemia activity following experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Stem Cells*, v. 33, n. 2, p. 601-614, 2015.

BAGGELAAR, Marc P. et al. Highly selective, reversible inhibitor identified by comparative chemoproteomics modulates diacylglycerol lipase activity in neurons. *Journal of the American Chemical Society*, v. 137, n. 27, p. 8851-8857, 2015.

BAKER, M. B. et al. The role of cell-mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic bone marrow transplantation in mice. *Journal of Experimental Medicine*, v. 183, n. 6, p. 2645-2656, 1996.

BARBESTI, S. et al. A simplified flow cytometry method of CD4 and CD8 cell counting based on thermoresistant reagents: Implications for large scale monitoring of HIV-infected patients in resource-limited settings. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*,

v. 68, n. 1, p. 43-51, 2005.

BARTON-BURKE, R. N. M. et al. Graft-versus-host disease: a complex long-term side effect of hematopoietic stem cell transplant. *Oncology*, v. 22, n. 11, p. 31, 2008.

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

BELLE, L. et al. Blockade of interleukin 27 signaling reduces GVHD in mice by augmenting Treg reconstitution and stabilizing FOXP3 expression. *Blood*, p. blood-2016-02-698241, 2016.

BERNARDES, P.T., B.M. Rezende, C.B. Resende, T.P. De Paula, A.C. Reis, W.A. Gonçalves, E.G. Vieira, M.V. Pinheiro, D.G. Souza, M.G. Castor, et al. 2015. Nanocomposite treatment reduces disease and lethality in a murine model of acute graft-versus-host disease and preserves antitumor effects. *PLoS One*. 10:e0123004. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0123004>

BIH, Clementino Ibeas et al. Molecular targets of cannabidiol in neurological disorders. *Neurotherapeutics*, v. 12, n. 4, p. 699-730, 2015.

BISHOP, D. K.; LI, WENHUA. Cyclosporin A and FK506 mediate differential effects on T cell activation in vivo. *The Journal of Immunology*, v. 148, n. 4, p. 1049-1054, 1992.

BISOGNO, Tiziana et al. A novel fluorophosphonate inhibitor of the biosynthesis of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol with potential anti-obesity effects. *British journal of pharmacology*, v. 169, n. 4, p. 784-793, 2013.

BLASER, H. et al. TNF and ROS crosstalk in inflammation. *Trends in cell biology*, v. 26, n. 4, p. 249-261, 2016.

BLOOMQUIST, E. R. *Marijuana*. Beverly Hills, California: Glencoe Press, 1968. 216p.

BORRELLI, F. et al. Cannabidiol, a safe and non-psychotropic ingredient of the marijuana plant *Cannabis sativa*, is protective in a murine model of colitis. *Journal of molecular medicine*, v. 87, n. 11, p. 1111, 2009.

BUCKLEY, N. E. et al. Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB2 receptor. *European journal of pharmacology*, v. 396, n. 2-3, p. 141-149, 2000.

BURSTEIN, S.. *Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on*

inflammation. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 23, n. 7, p. 1377-1385, 2015.

CAI, Y. et al. Adoptively transferred donor IL-17-producing CD4<sup>+</sup> T cells augment, but IL-17 alleviates, acute graft-versus-host disease. *Cellular & molecular immunology*, 2016.

CALLEJAS, G. H. et al. Maternal administration of cannabidiol promotes an anti-inflammatory effect on the intestinal wall in a gastroschisis rat model. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 51, n. 5, 2018.

CAMPOS, A. C. et al. Cannabidiol increases survival and promotes rescue of cognitive function in a murine model of cerebral malaria. *Neuroscience*, v. 289, p. 166-180, 2015.

CANESSO, M. C. C. et al. Skin wound healing is accelerated and scarless in the absence of commensal microbiota. *The Journal of Immunology*, p. 1400625, 2014.

CARRIER, E. J.; AUCHAMPACH, John A.; HILLARD, Cecilia J. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 20, p. 7895-7900, 2006.

CARSON IV, W. F. et al. Enhancement of macrophage inflammatory responses by CCL2 is correlated with increased miR-9 expression and downregulation of the ERK1/2 phosphatase Dusp6. *Cellular immunology*, v. 314, p. 63-72, 2017.

CASTOR, M. G. M. et al. PI3K $\gamma$  controls leukocyte recruitment, tissue injury, and lethality in a model of graft-versus-host disease in mice. *Journal of leukocyte biology*, v. 89, n. 6, p. 955-964, 2011.

CASTOR, M. G. M. et al. 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. *The Journal of Immunology*, p. ji\_0902614, 2010.

CHAMPLIN, R. et al. Selective depletion of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes for prevention of graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, v. 76, n. 2, p. 418-423, 1990.

CHAUDHURY, S. et al. Abatacept for GVHD Prophylaxis after Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HCT) for Pediatric Sickle Cell Disease (SCD): A Sickle Transplant Alliance for Research (STAR) Trial. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, v. 24, n. 3, p. S91, 2018.

CHEN, Y. et al. Trial in Progress: Gravitas-301, a Randomized, Double-Blind Phase 3 Study of Itacitinib or Placebo with Corticosteroids (CS) for the First-Line Treatment of Patients with Acute Gvhd (aGVHD). *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, v. 24, n. 3, p. S208-S209, 2018.

COHEN, J. John; FISCHBACH, Michael; CLAMAN, Henry N. Hydrocortisone resistance of graft vs host activity in mouse thymus, spleen and bone marrow. *The Journal of Immunology*, v. 105, n. 5, p. 1146-1150, 1970.

COLSON, Y. L. et al. Absence of clinical GVHD and the in vivo induction of regulatory T cells after transplantation of facilitating cells. *Blood*, v. 104, n. 12, p. 3829-3835, 2004.

COOKE, K. R. et al. Tumor necrosis factor-alpha production to lipopolysaccharide stimulation by donor cells predicts the severity of experimental acute graft-versus-host disease. *The Journal of clinical investigation*, v. 102, n. 10, p. 1882-1891, 1998.

COSTA, V. V. et al. A model of DENV-3 infection that recapitulates severe disease and highlights the importance of IFN- $\gamma$  in host resistance to infection. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 6, n. 5, p. e1663, 2012.

COUCH, D. G. et al. Cannabidiol and palmitoylethanolamide are anti-inflammatory in the acutely inflamed human colon. *Clinical Science*, v. 131, n. 21, p. 2611-2626, 2017.

CRAVATT, Benjamin F. et al. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, v. 384, n. 6604, p. 83, 1996.

CRIPPA, J. A. S. et al. Uso terapêutico dos canabinoides em psiquiatria. *Revista brasileira de psiquiatria*, v. 32, n. suppl 1, p. 556-566, 2010.

CURTIS, R. E. et al. Solid cancers after bone marrow transplantation. *New England Journal of Medicine*, v. 336, n. 13, p. 897-904, 1997.

CUTLER, C. et al. Rituximab for steroid-refractory chronic graft-versus-host disease. *Blood*, v. 108, n. 2, p. 756-762, 2006.

CUTLER, C.; ANTIN, Joseph H. Manifestations and Treatment of Acute Graft-Versus-Host Disease. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation: Stem Cell Transplantation*, p. 1287-1303, 2009.

DEVERGIE, A.; JANIN, A. Graft versus host disease. *The*, p. 219-234, 2008.

DHITAL, S. et al. Cannabidiol (CBD) induces functional CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Tregs. 2016.

DHITAL, S.; KAPLAN, B. L.F.. Effect of cannabidiol (CBD) on CD4+ cells under differential immunological activation state. 2017.

DI IANNI, M. et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood*, p. blood-2010-10-311894, 2011.

DI MARZO, Vincenzo. New approaches and challenges to targeting the endocannabinoid system. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2018.

DICKE, K. A.; VAN NOORD, M. J.; VAN BEKKUM, D. W. Attempts at morphological identification of the hemopoietic stem cell in rodents and primates. *Exp Hematol*, v. 1, n. 1, p. 36-45, 1973.

EDINGER, Matthias et al. CD4+ CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nature medicine*, v. 9, n. 9, p. 1144, 2003.

EHRHART, J. et al. Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB 2) suppresses microglial activation. *Journal of neuroinflammation*, v. 2, n. 1, p. 29, 2005.

ELLISON, C. A. et al. Murine graft-versus-host disease in an F1-hybrid model using IFN- $\gamma$  gene knockout donors. *The Journal of Immunology*, v. 161, n. 2, p. 631-640, 1998.

ESPOSITO, G. et al. Cannabidiol in inflammatory bowel diseases: a brief overview. *Phytotherapy Research*, v. 27, n. 5, p. 633-636, 2013.

FERRARA, J. L. M. et al. Graft-versus-host disease. *The Lancet*, v. 373, n. 9674, p. 1550-1561, 2009.

FERRARA, J. L.; YANIK, G. Acute graft versus host disease: pathophysiology, risk factors, and prevention strategies. *Clinical advances in hematology & oncology: H&O*, v. 3, n. 5, p. 415-9, 428, 2005.

FILIPOVICH, A. H. et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biology of blood and marrow transplantation*, v. 11, n. 12, p. 945-956, 2005.

FINE, Perry G.; ROSENFELD, Mark J. The endocannabinoid system, cannabinoids, and pain. *Rambam Maimonides medical journal*, v. 4, n. 4, 2013.

FORMAN, S. J. et al. (Ed.). *Thomas' hematopoietic cell transplantation: stem cell transplantation*. John Wiley & Sons, 2015.

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

GANETSKY, Alex et al. Higher tacrolimus concentrations early after transplant reduce the risk of acute GvHD in reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation*, v. 51, n. 4, p. 568, 2016.

GARCIA, C. C. et al. Complement C5 activation during influenza A infection in mice contributes to neutrophil recruitment and lung injury. *PloS one*, v. 8, n. 5, p. e64443, 2013.

GLADSTONE, D. E. et al. Long-term systemic lupus erythematosus disease control after allogeneic bone marrow transplantation. *Lupus*, v. 26, n. 7, p. 773-776, 2017.

GONZALEZ, M. et al. The balance between donor T cell anergy and suppression versus lethal graft-versus-host disease is determined by host conditioning. *The Journal of Immunology*, v. 169, n. 10, p. 5581-5589, 2002.

GOYAL, S. D. et al. Allogeneic hematopoietic cell transplant for AML: no impact of pre-transplant extramedullary disease on outcome. *Bone marrow transplantation*, v. 50, n. 8, p. 1057, 2015.

GRATWOHL, A. et al. Hematopoietic stem cell transplantation: a global perspective. *Jama*, v. 303, n. 16, p. 1617-1624, 2010.

GRATWOHL, A.. Global Perspectives on Hematopoietic Stem Cell Transplants (HSCTs). In: *Establishing a Hematopoietic Stem Cell Transplantation Unit*. Springer, Cham, 2018. p. 1-11.

GREIG, Iain R. et al. Development of indole sulfonamides as cannabinoid receptor negative allosteric modulators. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 26, n. 18, p. 4403-4407, 2016.

Guy, G. W. et.al. *The Medicinal Uses of Cannabis and Cannabinoids*. London: Pharmaceutical Press, 2004. 448p.

GUZMAN, M.. Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nature reviews cancer*, v. 3, n. 10, p. 745, 2003.

HAMBLIN, M. et al. Campath-1G in vivo confers a low incidence of graft-versus-host disease associated with a high incidence of mixed chimaerism after bone marrow transplantation for severe aplastic anaemia using HLA-identical sibling donors. *Bone marrow transplantation*, v. 17, n. 5, p. 819-824, 1996.

HARTMANN, O. et al. 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*, v. 126, n. 8, p. 600-607,



1997.

HEGDE, V. L. et al. Attenuation of experimental autoimmune hepatitis by exogenous and endogenous cannabinoids: involvement of regulatory T cells. *Molecular pharmacology*, 2008.

HEGDE, V. L. et al. Role of myeloid-derived suppressor cells in amelioration of experimental autoimmune hepatitis following activation of TRPV1 receptors by cannabidiol. *PloS one*, v. 6, n. 4, p. e18281, 2011.

HOLLER, E.; KOLB, H. J.; WILMANN, W. Treatment of GVHD--TNF-antibodies and related antagonists. *Bone marrow transplantation*, v. 12, p. S29-31, 1993.

HORVÁTH, B. et al. A new cannabinoid CB2 receptor agonist HU-910 attenuates oxidative stress, inflammation and cell death associated with hepatic ischaemia/reperfusion injury. *British journal of pharmacology*, v. 165, n. 8, p. 2462-2478, 2012.

HOWS, J. M. et al. Nephrotoxicity in bone marrow transplant recipients treated with cyclosporin A. *British journal of haematology*, v. 54, n. 1, p. 69-78, 1983.

HSU, Ku-Lung et al. Optimization and characterization of a triazole urea inhibitor for diacylglycerol lipase beta (DAGL- $\beta$ ). In: *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]*. National Center for Biotechnology Information (US), 2013.

IRVING, A. et al. Cannabinoid receptor-related orphan G protein-coupled receptors. In: *Advances in Pharmacology*. Academic Press, 2017. p. 223-247.

ITO, Ryoji et al. Highly sensitive model for xenogenic GVHD using severe immunodeficient NOG mice. *Transplantation*, v. 87, n. 11, p. 1654-1658, 2009.

IWAKURA, Y.; ISHIGAME, H.. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *The Journal of clinical investigation*, v. 116, n. 5, p. 1218-1222, 2006.

JAMIL, Muhammad Omer; MINEISHI, Shin. State-of-the-art acute and chronic GVHD treatment. *International journal of hematology*, v. 101, n. 5, p. 452-466, 2015.

JANSSEN, Freek J.; VAN DER STELT, Mario. Inhibitors of diacylglycerol lipases in neurodegenerative and metabolic disorders. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 26, n. 16, p. 3831-3837, 2016.

JOFFRE, O. et al. Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T lymphocytes. *Blood*, v. 103, n. 11, p. 4216-4221,

2004.

JOHNSON, Robert WG. Sirolimus (Rapamune) in renal transplantation. *Current opinion in nephrology and hypertension*, v. 11, n. 6, p. 603-607, 2002.

ABOUELNASR, Ahmed et al. Defining the role of sirolimus in the management of graft-versus-host disease: from prophylaxis to treatment. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, v. 19, n. 1, p. 12-21, 2013.

JONES, N. A. et al. Cannabidiol exerts anti-convulsant effects in animal models of temporal lobe and partial seizures. *Seizure*, v. 21, n. 5, p. 344-352, 2012.

KAPPEL, L. W. et al. IL-17 contributes to CD4-mediated graft-versus-host disease. *Blood*, v. 113, n. 4, p. 945-952, 2009.

KEKRE, N. et al. Phase II Trial of Natalizumab (Tysabri®) with Corticosteroids As Initial Treatment of Gastrointestinal Acute Graft Versus Host Disease. 2017.

KILLESTEIN, J. et al. Immunomodulatory effects of orally administered cannabinoids in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, v. 137, n. 1-2, p. 140-143, 2003.

KINOSADA, H. et al. HTLV-1 bZIP factor enhances T-cell proliferation by impeding the suppressive signaling of co-inhibitory receptors. *PLoS pathogens*, v. 13, n. 1, p. e1006120, 2017.

KLEBANOFF, C. A. et al. Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, n. 27, p. 9571-9576, 2005.

KLEIN, Thomas W. Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nature Reviews Immunology*, v. 5, n. 5, p. 400, 2005.

KOLB, H.. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*, v. 112, n. 12, p. 4371-4383, 2008.

KORDELAS, L. et al. MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia*, v. 28, n. 4, p. 970, 2014.

KOZAK, Kevin R.; PRUSAKIEWICZ, Jeffery J.; MARNETT, Lawrence J. Oxidative metabolism of endocannabinoids by COX-2. *Current pharmaceutical design*, v. 10, n. 6, p. 659-667, 2004.

KOZELA, E. et al. Cannabidiol inhibits pathogenic T cells, decreases spinal microglial activation and ameliorates multiple sclerosis-like disease in C57BL/6 mice. *British journal of pharmacology*, v. 163, n. 7, p. 1507-1519, 2011.

KOZELA, E. et al. Pathways and gene networks mediating the regulatory effects of cannabidiol, a nonpsychoactive cannabinoid, in autoimmune T cells. *Journal of neuroinflammation*, v. 13, n. 1, p. 136, 2016.

KRENGER, W. et al. Polarized type 2 alloreactive CD4+ and CD8+ donor T cells fail to induce experimental acute graft-versus-host disease. *The Journal of Immunology*, v. 155, n. 2, p. 585-593, 1995.

LABAR, Geoffray et al. Crystal structure of the human monoacylglycerol lipase, a key actor in endocannabinoid signaling. *Chembiochem*, v. 11, n. 2, p. 218-227, 2010.

LEE, S. J. et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood*, v. 110, n. 13, p. 4576-4583, 2007.

LEE, W. et al. Cannabidiol limits T cell-mediated chronic autoimmune myocarditis: Implications to autoimmune disorders and organ transplantation. *Molecular Medicine*, v. 22, p. 136, 2016.

LEE, Y. et al. Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8+ T cells: changing strategies for cancer treatment. *Blood*, v. 114, n. 3, p. 589-595, 2009.

LEHMANN, C. et al. Experimental cannabidiol treatment reduces early pancreatic inflammation in type 1 diabetes. *Clinical hemorheology and microcirculation*, v. 64, n. 4, p. 655-662, 2016.

LJUNGMAN, P. et al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. *Bone marrow transplantation*, v. 37, n. 5, p. 439, 2006.

LOCASCIULLI, A. et al. 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*, v. 92, n. 1, p. 11-18, 2007.

LUCARELLI, G. et al. Bone marrow transplantation in patients with thalassemia. *New England Journal of Medicine*, v. 322, n. 7, p. 417-421, 1990.

LUFT, T. et al. Steroid-refractory GVHD: T-cell attack within a vulnerable endothelial system. *Blood*, p. blood-2011-02-334821, 2011.

MACDONALD, K. P. A. et al. Chronic graft-versus-host disease: biological insights from preclinical and clinical studies. *Blood*, v. 129, n. 1, p. 13-21, 2017.

MAJOR-MONFRIED, H. et al. MAGIC biomarkers predict long term outcomes for steroid-resistant acute GVHD. *Blood*, p. blood-2018-01-822957, 2018.

MALFAIT, A. M. et al. The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 17, p. 9561-9566, 2000.

MAPARA, M. Y. et al. Expression of chemokines in GVHD target organs is influenced by conditioning and genetic factors and amplified by GVHR. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, v. 12, n. 6, p. 623-634, 2006.

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

MECHA, M. et al. Cannabidiol provides long-lasting protection against the deleterious effects of inflammation in a viral model of multiple sclerosis: a role for A2A receptors. *Neurobiology of disease*, v. 59, p. 141-150, 2013.

MECHOULAM, Raphael; PARKER, Linda A.; GALLILY, Ruth. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. *The Journal of Clinical Pharmacology*, v. 42, n. S1, p. 11S-19S, 2002.

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

MIURA, Y. et al. Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood*, v. 104, n. 7, p. 2187-2193, 2004.

OLÁH, A. et al. Cannabidiol exerts sebostatic and antiinflammatory effects on human sebocytes. *The Journal of clinical investigation*, v. 124, n. 9, p. 3713-3724, 2014.

PAGANO, E. et al. An orally active Cannabis extract with high content in cannabidiol attenuates chemically-induced intestinal inflammation and hypermotility in the mouse. *Frontiers in pharmacology*, v. 7, p. 341, 2016.

PAGOTTO, U. et al. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocrine reviews*, v. 27, n. 1, p. 73-100, 2005.

PANDEY, R. et al. 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*, v. 338, n. 3, p. 819-828, 2011.

PANOSKALTSIS-MORTARI, A. et al. In vivo imaging of graft-versus-host-disease in mice. *Blood*, v. 103, n. 9, p. 3590-3598, 2004.

PASSWEG, J. R. et al. Use of haploidentical stem cell transplantation continues to increase: the 2015 European Society for Blood and Marrow Transplant activity survey report. *Bone marrow transplantation*, v. 52, n. 6, p. 811, 2017.

PEPPA, Melpomeni; KRANIA, Maria; RAPTIS, Sotirios A. Hypertension and other morbidities with Cushing's syndrome associated with corticosteroids: a review. *Integrated blood pressure control*, v. 4, p. 7, 2011.

PERNONCINI, K. V., & OLIVEIRA, R. M. M. W. Usos terapêuticos potenciais do Canabidiol obtido da Cannabis sativa. *REVISTA UNINGÁ REVIEW*, 20(3). 2018.

POETKER, David M.; REH, Douglas D. A comprehensive review of the adverse effects of systemic corticosteroids. *Otolaryngologic clinics of North America*, v. 43, n. 4, p. 753-768, 2010.

RAHIMI, A. et al. Interaction between the protective effects of cannabidiol and palmitoylethanolamide in experimental model of multiple sclerosis in C57BL/6 mice. *Neuroscience*, v. 290, p. 279-287, 2015.

RAM, R. & STORB, R. Pharmacologic prophylaxis regimens for acute graft-versus-host disease: past, present and future. 2013.

RAM, Ron; STORB, Rainer. Pharmacologic prophylaxis regimens for acute graft-versus-host disease: past, present and future. 2013.

REZENDE, B. M. et. al. Inhibition of 5-lipoxygenase alleviates graft-versus-host disease. *Journal of Experimental Medicine*, jem-20170261. 2017.

REZENDE, B.M. et. al. Lithothamnion muelleri controls inflammatory responses, target organ injury and lethality associated with graft-versus-host disease in mice. *Mar. Drugs*. 11:2595–2615. 2013.

REZVANI, K. et al. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood*, v. 108, n. 4, p. 1291-1297, 2006.

RIEGER, K. et al. Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood*, v. 107, n. 4, p. 1717-1723, 2006.

ROSENTHALER, S. et al. Differences in receptor binding affinity of several phytocannabinoids do not explain their effects on neural cell

cultures. *Neurotoxicology and teratology*, v. 46, p. 49-56, 2014.

SADEGHI, B. et al. GVHD after chemotherapy conditioning in allogeneic transplanted mice. *Bone marrow transplantation*, v. 42, n. 12, p. 807, 2008.

SAKELLARI, I. et al. Long-term outcomes of total body irradiation plus cyclophosphamide versus busulfan plus cyclophosphamide as conditioning regimen for acute lymphoblastic leukemia: a comparative study. *Annals of hematology*, v. 97, n. 10, p. 1987-1994, 2018.

SALAGA, M. et al. Experimental colitis in mice is attenuated by changes in the levels of endocannabinoid metabolites induced by selective inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Journal of Crohn's and Colitis*, v. 8, n. 9, p. 998-1009, 2014.

SANDMAIER, Brenda M. et al. Sirolimus Combined with Mycophenolate Mofetil (MMF) and Cyclosporine (CSP) Significantly Improves Prevention of Acute Graft-Versus-Host-Disease (GVHD) after Unrelated Hematopoietic Cell Transplantation (HCT): Results from a Phase III Randomized Multi-Center Trial. 2016.

SANDVIG, S. et al. Gamma-interferon is produced by CD3+ and CD3- lymphocytes. *Immunological reviews*, v. 97, n. 1, p. 51-65, 1987.

SCHICHO, R. & STORR, M. Topical and systemic cannabidiol improves trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *Pharmacology*, v. 89, n. 3-4, p. 149-155, 2012.

SCHROEDER, Mark A.; DIPERSIO, John F. Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Disease models & mechanisms*, v. 4, n. 3, p. 318-333, 2011.

SCHWARTE, Sebastian et al. Radiation protocols determine acute graft-versus-host disease incidence after allogeneic bone marrow transplantation in murine models. *International journal of radiation biology*, v. 83, n. 9, p. 625-636, 2007.

SERODY, J. S. et al. T-lymphocyte production of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  is critical to the recruitment of CD8+ T cells to the liver, lung, and spleen during graft-versus-host disease. *Blood*, v. 96, n. 9, p. 2973-2980, 2000.

SHLOMCHIK, W. D. Graft-versus-host disease. *Nature Reviews Immunology*, v. 7, n. 5, p. 340, 2007.

SHULMAN, H. M. et al. 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*, v. 21, n. 4, p. 589-

603, 2015.

SINGH, A. K.; MCGUIRK, Joseph P. Allogeneic stem cell transplantation: a historical and scientific overview. *Cancer research*, 2016.

SNIDER, Natasha T.; WALKER, Vyvyca J.; HOLLENBERG, Paul F. Oxidation of the endogenous cannabinoid arachidonoyl ethanolamide by the cytochrome P450 monooxygenases: physiological and pharmacological implications. *Pharmacological reviews*, v. 62, n. 1, p. 136-154, 2010.

SOCIÉ, G. et al. A phase 3 randomized trial comparing inolimomab vs usual care in steroid-resistant acute GVHD. *Blood*, v. 129, n. 5, p. 643-649, 2017.

SOMMERMEYER, D. et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. *Leukemia*, v. 30, n. 2, p. 492, 2016.

STANGHELLINI, M. T. L. et al. Direct Costs in 4-Years Post Allogeneic Transplant Follow-up: A Comparative Analysis of 15 Matched Patients with and without GvHD. 2017.

STOMA, I. et al. Acute Graft-Versus-Host Disease in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: Risk Factors and Spectrum of Infectious Complications. *Transplantation*, v. 102, p. S674, 2018.

TANABE, K. et al. Migration of splenic lymphocytes promotes liver fibrosis through modification of T helper cytokine balance in mice. *Journal of gastroenterology*, v. 50, n. 10, p. 1054-1068, 2015.

TAYLOR, P. A. et al. L-Selectinhi but not the L-selectinlo CD4<sup>+</sup> 25<sup>+</sup> T-regulatory cells are potent inhibitors of GVHD and BM graft rejection. *Blood*, v. 104, n. 12, p. 3804-3812, 2004.

TEIXEIRA, Gustavo Machado et al. Assessing the influence of different comorbidities indexes on the outcomes of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in a developing country. *PloS one*, v. 10, n. 9, p. e0137390, 2015.

THOMAS, P. A.; et. al. Hepatic dysfunction during isoniazid chemoprophylaxis in renal allograft recipients. *Archives of Surgery*, v. 114, n. 5, p. 597-599, 1979.

TOMIDA, I.; PERTWEE, Roger Guy; AZUARA-BLANCO, Augusto. Cannabinoids and glaucoma. *British journal of ophthalmology*, v. 88, n. 5, p. 708-713, 2004.

UEDA, Natsuo et al. Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of arachidonylethanolamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochimica et*

Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism, v. 1254, n. 2, p. 127-134, 1995.

UJVÁRY, István; HANUŠ, Lumír. Human metabolites of cannabidiol: a review on their formation, biological activity, and relevance in therapy. *Cannabis and Cannabinoid Research*, v. 1, n. 1, p. 90-101, 2016.

VAN BESIEN, K. Allogeneic transplantation for AML and MDS: GVL versus GVHD and disease recurrence. *ASH Education Program Book*, v. 2013, n. 1, p. 56-62, 2013.

VAN RIJN, Rozemarijn S. et al. A new xenograft model for graft-versus-host disease by intravenous transfer of human peripheral blood mononuclear cells in RAG2-/- $\gamma$ c-/-double-mutant mice. *Blood*, v. 102, n. 7, p. 2522-2531, 2003.

VICENT, M. G. et al. Analysis of clinical outcome and survival in pediatric patients undergoing extracorporeal photopheresis for the treatment of steroid-refractory GVHD. *Journal of pediatric hematology/oncology*, v. 32, n. 8, p. 589-593, 2010.

VIGORITO, A. C. et al. Evaluation of NIH consensus criteria for classification of late acute and chronic GVHD. *Blood*, v. 114, n. 3, p. 702-708, 2009.

VILELA, L. R. et al. Cannabidiol rescues acute hepatic toxicity and seizure induced by cocaine. *Mediators of inflammation*, v. 2015, 2015.

VRIESENDORP, H. M. & HEIDT, P. J. History of graft-versus-host disease. *Experimental hematology*, v. 44, n. 8, p. 674-688, 2016.

WAGNER, J. E. et al. Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. *Blood*, v. 88, n. 3, p. 795-802, 1996.

WALTERS, M. C. et al. Bone marrow transplantation for sickle cell disease. *New England Journal of Medicine*, v. 335, n. 6, p. 369-376, 1996.

WANG, Y. et al. Cannabidiol attenuates alcohol-induced liver steatosis, metabolic dysregulation, inflammation and neutrophil-mediated injury. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 12064, 2017.

WEBER, M. et al. Donor and host B cell-derived IL-10 contributes to suppression of graft-versus-host disease. *European journal of immunology*, v. 44, n. 6, p. 1857-1865, 2014.

WEISS, L. et al. Cannabidiol lowers incidence of diabetes in non-obese diabetic mice. *Autoimmunity*, v. 39, n. 2, p. 143-151, 2006.



WILKERSON, J. L. et al. Diacylglycerol lipase  $\beta$  inhibition reverses nociceptive behaviour in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. *British journal of pharmacology*, v. 173, n. 10, p. 1678-1692, 2016.

WILLIAMS, A. S. et al. Interferon- $\gamma$  protects against the development of structural damage in experimental arthritis by regulating polymorphonuclear neutrophil influx into diseased joints. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, v. 56, n. 7, p. 2244-2254, 2007.

WYSOCKI, C. A. et al. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood*, v. 105, n. 11, p. 4191-4199, 2005.

YANG, F. et al. Risk Factors for Graft-Versus-Host Disease After Transplantation of Hematopoietic Stem Cells from Unrelated Donors in the China Marrow Donor Program. *Annals of transplantation*, v. 22, p. 384-401, 2017.

YESHURUN, M. et al. Cannabidiol for the prevention of graft-versus-host-disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation: results of a phase II study. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, v. 21, n. 10, p. 1770-1775, 2015.

YI, T. et al. Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease. *Blood*, v. 112, n. 5, p. 2101-2110, 2008.

ZAYDFUDIM, V. M. & PELLETIER, S. J. Towards steroid-free immunosuppression after liver transplantation. *Gut and liver*, v. 10, n. 4, p. 495, 2016.

ZEISER, R. & BLAZAR, B. R. Acute graft-versus-host disease—biologic process, prevention, and therapy. *New England Journal of Medicine*, v. 377, n. 22, p. 2167-2179, 2017.

ZENG, Defu. Newly found arsons ignite the fire of gut GVHD. *Journal of Clinical Investigation*, v. 128, n. 3, p. 897-899, 2018.

ZHAO, K. et al. IL-22 promoted CD3<sup>+</sup> T cell infiltration by IL-22R induced STAT3 phosphorylation in murine acute graft versus host disease target organs after allogeneic bone marrow transplantation. *International immunopharmacology*, v. 39, p. 383-388, 2016.