

JEANE ELIETE LAGUILA VISENTAINER

***TESTES PROGNÓSTICOS DE REJEIÇÃO E DOENÇA
DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO EM
TRANSPLANTES DE CÉLULAS PROGENITORAS
HEMATOPOIÉTICAS COM DOADORES HLA
IDÊNTICOS***

CAMPINAS

2003

JEANE ELIETE LAGUILA VISENTAINER

**TESTES PROGNÓSTICOS DE REJEIÇÃO E DOENÇA
DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO EM
TRANSPLANTES DE CÉLULAS PROGENITORAS
HEMATOPOIÉTICAS COM DOADORES HLA
IDÊNTICOS**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica
Médica, área de
Ciências Básicas.*

ORIENTADOR: PROF. DR. CÁRMINO ANTÔNIO DE SOUZA

UNIDADE	BP
Nº CHAMADA	UNICAMP
	V823t
V	EX
TOMBO BC/	56288
PROC.	16-124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	9/2/03
Nº CPD	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM00192008-1

Bib id 304370

V823t

Visentainer, Jeane Eliete Laguila

Testes prognósticos de rejeição e doença do enxerto contra o hospedeiro em transplantes de células progenitoras hematopoiéticas com doadores HLA idênticos. / Jeane Eliete Laguila Visentainer. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientador : Cármino Antônio de Souza
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Citocinas. 2. Transplante celular. 3. Testes. I. Cármino Antônio de Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

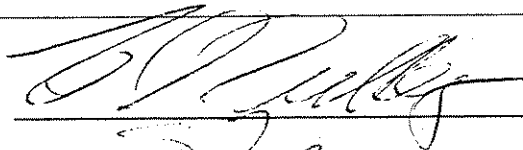
Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

Orientador(a): Prof. Dr. Cármino Antonio de Souza



Membros:

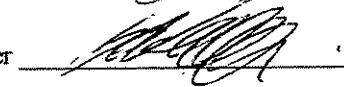
1. Prof. Dr Frederico Dulley



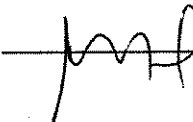
2. Profa. Dra. Silvia Daher



3. Profa. Dra. Sofia Rocha Lieber



4. Prof. Dr. José Francisco Comenalli Marques Júnior



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 20/02/2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Marcílio Laguila e Conceição Giroto Laguila** (**in memorian**), pela orientação e dedicação;*

*Ao meu esposo, **Jesuí**, pelo amor e apoio nos momentos de dificuldades;*

*À minha filha, **Lorena**, pela oportunidade de poder vivenciar a maternidade.*

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Cármino Antônio de Souza**, orientador, incentivador, responsável direto pela realização deste trabalho;

À **Profa. Dra. Sofia Rocha Lieber**, pela amizade, orientação no planejamento dos experimentos laboratoriais, correção e adequação deste trabalho, indispensáveis para a realização deste estudo;

À **Prof. Dra. Lígia Beatriz Lopes Persoli**, pelo incentivo na realização dos experimentos no Laboratório de Histocompatibilidade;

À **Sílvia Barbosa Dutra Marques**, pela grande amizade, dedicação e orientação na realização de técnicas de Biologia Molecular;

Aos funcionários do Laboratório de Histocompatibilidade, **Edilaine Guilherme Corradine, Edilaine Gildo Guariento, Márcia Regina Tabossi, Simone Corte Batista, Sílvio Quitério dos Santos e Regina Fukay**, pela amizade e realização dos exames de rotina de histocompatibilidade;

À **Dra. Neiva Sellan Lopes Gonçales**, por tornar disponível o suporte técnico do Laboratório de Sorologia, para realização dos ensaios imunoenzimáticos;

À **Máira Cittadino Favarelli**, pelo auxílio na realização dos ensaios imunoenzimáticos;

À **Giu, Cris, Helen e Dani** pela amizade;

À **Eliana Cristina Miranda**, pela organização dos dados clínicos e pelo auxílio na elaboração e execução da análise estatística;

Ao **Roberto Zulli**, pela realização de parte das análises estatísticas;

*Às secretárias **Arlete e Nicete**, pela presteza;*

À Sandra pela finalização estética deste trabalho;

Às enfermeiras da Unidade de Transplante de Medula Óssea e da Divisão de Hemoterapia desta instituição, pela coleta de material biológico necessário para a realização dos exames laboratoriais;

Aos médicos da Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hemocentro de Campinas, Dr. Afonso Celso Vigorito, Dr. Francisco José Penteado Aranha, Dra. Kátia Eid e Dra. Gislaine Oliveira pela ajuda na compilação dos dados clínicos dos pacientes;

À Coordenação do Laboratório de Histocompatibilidade do Hemocentro da UNICAMP, por disponibilizar espaço físico e equipamentos;

À Coordenadoria do Hemocentro da UNICAMP, por tornar viável a realização deste estudo;

À Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela oportunidade e apoio;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Universidade Estadual de Maringá (UEM), pelo apoio e incentivo;

E, especialmente, aos pacientes e doadores de medula óssea, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

*“A Ciência é engrandecida de duas maneiras: pela
adição de novos fatos e pela simplificação do que já
existe”*

(C. Bernard)

	PÁG.
RESUMO	<i>xxxv</i>
.....	
ABSTRACT	<i>xxxix</i>
.....	
1.	43
INTRODUÇÃO	
.....	
1.1. Transplante de Células Progenitoras	45
Hematopoiéticas.....	
1.2.	46
Histocompatibilidade.....	
1.3. Doença do Enxerto contra o Hospedeiro	49
(GVHD).....	
1.4. Seleção de Doadores de Medula	50
Óssea.....	
1.5. Mecanismos Imunológicos Envolvidos na Patogênese da	53
GVHD.....	
1.6.	55
Citocinas.....	
2.	59
OBJETIVOS	
.....	
2.1.	Objetivo 61
geral.....	
2.2.	Objetivos 61

específicos.....	
3.	63
METODOLOGIA.....	
.....	
3.1.	65
Casuística.....	
3.1.1.	65
Elegibilidade.....	
3.2.	67
Métodos.....	
3.2.1. Tipagem dos Antígenos HLA por	67
Sorologia.....	
3.2.2. Tipagem dos Alelos HLA-DRB1 e DQB1 por Técnicas de	
Biologia	68
Molecular.....	
.....	
3.2.3. Cultura Mista de Linfócitos Clássica	69
(CML).....	
3.2.4. Cultura Mista de Linfócitos Potencializada com Citocinas	
Exógenas	71
(CMLp).....	
.....	

3.2.4.1. Pré-Tratamento de Células Estimuladoras.....	71
3.2.4.2. Suplementação do Meio de Cultura com Citocinas Exógenas.....	72
.....	
3.2.5. Tipagem dos Alelos de Genes Reguladores de Citocinas.....	72
3.2.6. Determinação do Nível de Citocinas Séricas em Pacientes Transplantados.....	73
.....	
3.2.7. Procedimentos de Transplantação.....	74
3.2.8. Suporte Clínico.....	75
3.2.9. Análise Estatística.....	75
4. RESULTADOS.....	77
.....	
4.1. Seguimento Clínico dos Pacientes.....	79
4.2. Padronização da Cultura Mista de Linfócitos Potencializada com Citocinas Exógenas.....	79
4.2.1. Titulação de IL-4 e IFN- γ Empregadas no Pré-tratamento das Células Estimuladoras.....	79
4.2.2. Titulação de IL-4 e IL-2 Utilizadas para Suplementação do	

Meio	de	81
Cultura.....		
.....		
4.2.3. Resposta de Linfócitos do Doador Frente às Células do Receptor em Cultura Mista de Linfócitos Potencializada pela Suplementação do Meio de Cultura com IL-4 e IL-2.....		83
4.2.4. Resposta de Linfócitos do Receptor Frente às Células do Doador em Cultura Mista de Linfócitos Potencializada pela Suplementação do Meio de Cultura com IL-4 e IL-2.....		84
4.3. Polimorfismo dos Genes Reguladores de Citocinas.....		85

4.3.1. Compatibilidade Receptor-Doador em Relação ao Fenótipo Produtor de Citocinas e o Desenvolvimento de Complicações Pós-Transplante.....	87
..	
4.3.2. Perfil da Produção de Citocinas e o desenvolvimento de Complicações Pós-Transplante.....	88
4.4. Níveis de Citocinas nos Soros de Pacientes Selecionados para o Transplante.....	91
.....	
4.4.1. Níveis de Citocinas nos Períodos Pré e Pós-Condicionamento.....	91
4.4.2. Níveis de Citocinas no Período Pós-Transplante.....	92
4.4.3. Cinética dos Níveis Séricos de Citocinas no Período Pós-Transplante.....	93
.....	
4.4.3.1. Cinética dos Níveis Séricos de sIL-2R.....	95
4.4.3.2. Cinética dos Níveis Séricos de TNF- α	97
4.4.3.3. Cinética dos Níveis Séricos de IFN- γ	97
4.4.3.4. Cinética dos Níveis Séricos de IL-6.....	98
4.4.3.5. Cinética dos Níveis Séricos de IL-	98

10.....	
4.4.3.6. Cinética dos Níveis Séricos de TGF- β 1.....	99
4.5. Níveis de Citocinas em Pacientes com Infecções Bacterianas e Virais Seguindo o Transplante Alogênico.....	99
5.	101
DISCUSSÃO.....	
.....	
5.1. Avaliação da Técnica de Cultura Mista de Linfócitos Potencializada pelo Uso de Citocinas Exógenas.....	103
5.2. Correlação dos Polimorfismos de Genes Reguladores de Citocinas com o Desenvolvimento de Reações de Rejeição e GVHD.....	105
5.3. Correlação dos Níveis Séricos de Citocinas com o Desenvolvimento de GVHD aguda em Pacientes Transplantados.....	110

6.		115
CONCLUSÕES		
.....		
7.	REFERÊNCIAS	119
BIBLIOGRÁFICAS		
8.		135
ANEXOS		
.....		

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Anemia Aplástica grave
ADC	Anemia Diseritropoiética Congênita
BU	Busulfan
CML	Cultura Mista de Linfócitos Clássica
CMLp	Cultura Mista de Linfócitos Potencializada
Cort	Corticosteróides
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
cpm	Contagem por minuto
CPP	Células Progenitoras do Sangue Periférico
CREG	Grupo de Antígenos de Reação Cruzada (do inglês: <i>Cross Reaction Group</i>)
CsA	Ciclosporina
CY	Ciclofosfamida
DNA	Ácido Desoxirribonucléico (do inglês: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DRR	Resposta relativa do doador (unidade de expressão da resposta do doador em cultura mista de linfócitos)
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (do inglês: <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>)
G-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos (do inglês: <i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>)
GVHD	Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (do inglês: <i>Graft-versus-Host Disease</i>)
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos (do inglês: <i>Human Leucocyte Antigens</i>)

HPN Hemoglobinúria Paroxística Noturna

IC Intervalo de confiança

IFN- γ Interferon- γ

IL-1	Interleucina-1
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crônica
LPS	Lipopolissacarídeos
mHag	Antígenos de Histocompatibilidade secundários (do inglês: <i>minor Histocompatibility antigens</i>)
MM	Mieloma Múltiplo
MO	Medula Óssea
MTX	Metotrexato
NIH	Instituto Nacional de Saúde (do inglês: <i>National Institute of Health</i>)
NK	Célula Matadora Natural (do inglês: <i>Natural Killer</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês: <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RRR	Resposta relativa do receptor (unidade de expressão da resposta do receptor em cultura mista de linfócitos)
RR	Risco relativo (unidade para expressão do risco de um evento)
SAS	Sistema analítico de estatística (do inglês: <i>Statistical Analytical System</i>)
SBF	Soro Bovino Fetal
sIL-2R	Receptor Solúvel de IL-2 (do inglês: <i>soluble Interleukin-2 Receptor</i>)
SMD	Síndrome Mielodisplástica
SN	Soro normal

SPSS	Pacote estatístico para cientistas (do inglês: <i>Statistical Package for Social Scientists</i>)
SSOP	Seqüência Específica de Sondas de Oligonucleotídeos (do inglês: <i>Sequence-Specific Oligonucleotide Probes</i>)
SSP	Seqüência Específica de Iniciadores (do inglês: <i>Sequence-Specific Primers</i>)
Ta	Linfócito T auxiliador
TBI	Irradiação Corporal Total (do inglês: <i>Total Body Irradiation</i>)
Tc	Linfócito T citotóxico
TGF-β1	Fator de Crescimento de Células T (do inglês: <i>Transforming Growth Factor-β1</i>)
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral (do inglês: <i>Tumor Necrosis Factor-α</i>)
VP	Etoposide

LISTA DE TABELAS

		PÁG.
Tabela 1:	Características dos pacientes e doadores.....	66
Tabela 2:	Polimorfismos dos genes reguladores de citocinas associados com a produção de citocinas.....	73
Tabela 3:	Distribuição dos polimorfismos de genes reguladores de citocinas em receptores e doadores de medula óssea.....	86
Tabela 4:	Distribuição do perfil produtor de citocinas em receptores e doadores de medula óssea de acordo com o desenvolvimento de GVHD aguda, GVHD crônica e falha do enxerto mais rejeição.....	89
Tabela 5:	Nível sérico médio de citocinas no período compreendido entre a 1ª e a 15ª semana pós-transplante de células progenitoras hematopoiéticas, em pacientes com e sem desenvolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro aguda.....	92

		PÁG.
Figura 1:	Complexo Principal de Histocompatibilidade Humano – CPH.....	46
Figura 2:	Patogênese da doença do enxerto contra o hospedeiro aguda em transplantes de células progenitoras hematopoiéticas.....	54
Figura 3:	Dose-efeito da pré-incubação de células estimuladoras com IL-4 (a) ou IFN- γ (b) em ensaios de Cultura Mista de Linfócitos (CML) realizados com seis pares de indivíduos não-aparentados.....	80
Figura 4:	Dose-efeito da adição de IL-4 (a) ou IL-2 (b) no início dos ensaios de Cultura Mista de Linfócitos (CML) realizados com seis pares de indivíduos não-aparentados.....	82
Figura 5:	Efeito da adição de citocinas em ensaios de Cultura Mista de Linfócitos (CML) realizados com dezessete pares receptor-doadores HLA-idênticos, selecionados para o transplante de medula óssea nas respostas de culturas de doador versus doador, doador versus receptor, doador versus não-aparentado e não-aparentado versus receptor.....	84
Figura 6:	Efeito da adição de citocinas em ensaios de Cultura Mista de Linfócitos (CML) realizados com dezessete pares receptor-doadores HLA-idênticos, selecionados para o transplante de medula óssea nas respostas de culturas de receptor versus	

receptor, receptor versus doador e receptor versus não- 85
aparentado.....

Figura Incidência da doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD) 85
7: crônica seguindo o transplante de células progenitoras
hematopoiéticas em função do fenótipo de produção de IL-6
do receptor (a) e do doador 90
(b).....

Figura 8: Cinética dos níveis de sIL-2R (a), TNF- α (b), IFN- γ (c), IL-6 (d), IL-10 (e) e TGF- β 1 (f) no soro de pacientes com GVHD aguda de graus II a IV (círculos fechados) e sem GVHD aguda (círculos abertos), nos períodos pré-condicionamento (pré-C), pós-condicionamento (pós-C) e pós-transplante..... 94

Figura 9: Níveis de sIL-2R no soro de 13 pacientes recebendo transplante de células progenitoras hematopoiéticas, medidos em 4 períodos de tempo..... 96

.....



RESUMO

O transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas é o tratamento de escolha para muitas doenças hematológicas e imunodeficiências primárias. A seleção de doadores é baseada na definição de moléculas HLA-A e B por sorologia, de alelos HLA-DRB1 e DQB1 por técnicas de biologia molecular e na cultura mista de linfócitos. Apesar disto, a doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD) é ainda uma grave complicação, que ocorre em aproximadamente 35% dos receptores de medula HLA-idênticos. O presente estudo teve por objetivo avaliar o poder prognóstico da ocorrência de rejeição e GVHD dos seguintes testes laboratoriais: (1) cultura mista de linfócitos clássica (CML) e potencializada com citocinas exógenas (CMLp); (2) tipagem de genes de citocinas, pela técnica de PCR-SSP e (3) seguimento do nível sérico de citocinas dos pacientes transplantados, empregando-se métodos imunoenzimáticos quantitativos. No estudo, foram avaliados 118 transplantes, com doadores HLA-idênticos, realizados no Centro de Hematologia e Hemoterapia e Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, de agosto de 1994 a fevereiro de 2002. Na CMLp, a resposta dos linfócitos do doador contra as células do receptor (DxR) foi aumentada 1,9 e 4,1 vezes, com a adição de IL-4 (100 ng/mL) e IL-2 (10 ng/mL), respectivamente. Todavia, a resposta do doador contra suas próprias células (DxD) também sofreu um incremento de 2,0 e 6,4 vezes, respectivamente. Como o tratamento avaliado também induziu aumento das respostas autólogas, o emprego da CMLp não trouxe vantagens adicionais ao método tradicional (CML), que mostrou correlação com a incidência de GVHD crônica. A análise do polimorfismo dos genes reguladores de citocinas mostrou que, os genótipos de TNF- α ⁻³⁰⁸, IFN- γ ⁺⁸⁷⁴, IL-6⁻¹⁷⁴, IL-10^{-1082, -819, -592} e TGF- β ^{1+869, +915} não foram associados ao risco aumentado de GVHD aguda e rejeição, enquanto o fenótipo de baixo produtor de IL-6 mostrou associação com GVHD crônica. O acompanhamento da variação dos níveis séricos de sIL-2R, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e TGF- β 1 dos receptores até 15 semanas pós-transplante revelou que, os níveis médios de sIL-2R e IL-10 foram maiores no grupo que desenvolveu GVHD aguda ($776,4 \pm 65,5$ pg/mL e $10,9 \pm 3,3$ pg/mL) em relação ao grupo que não desenvolveu esta doença ($541,1 \pm 17,3$ pg/mL e $2,5 \pm 2,2$ pg/mL). Os níveis de sIL-2R no período de “pega” do enxerto ($1.165,0 \pm 179,2$

$\mu\text{g/ml}$ vs. $578,0 \pm 47,2 \mu\text{g/ml}$) e ao tempo da GVHD aguda ($926,4 \pm 142,5 \mu\text{g/ml}$ vs. $496,5 \pm 48,7 \mu\text{g/ml}$) também diferiram entre os grupos. A cinética destas citocinas também revelou que os níveis de TNF- α e TGF- β 1 foram correlacionados com GVHD aguda. Nas primeiras semanas após o transplante, os níveis de TNF- α foram associados a GVHD aguda ($72,7 \pm 2,6 \mu\text{g/mL}$ vs. $38,1 \pm 1,7 \mu\text{g/mL}$). Nas últimas semanas, os níveis de TGF- β 1 foram menores no grupo que desenvolveu a GVHD aguda ($7,5 \pm 1,4 \text{ ng/ml}$), comparado ao grupo sem a doença ($17,0 \pm 1,6 \text{ ng/ml}$). Assim sendo, o monitoramento dos níveis séricos de sIL-2R, IL-10, TNF- α e TGF- β 1 poderia fornecer ao clínico um indicativo do risco de GVHD aguda, enquanto a genotipagem de IL-6⁻¹⁷⁴ poderia oferecer um novo método para identificar pacientes ao risco de GVHD crônica.



ABSTRACT

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is the chosen treatment for many hematological diseases and primary immunodeficiency's. The donor's selection has been based on the serological definition of HLA-A and B, in the definition of HLA-DRB1 and DQB1 by DNA-based molecular method and in the standard mixed lymphocyte culture. Regardless, the graft-versus-host disease (GVHD) is still one of the several complications that occur in approximately 35% of HLA-identical bone marrow recipients. The objective of this study was to evaluate the prognostic power of rejection and GVHD development of laboratorial assays: (1) standard mixed lymphocyte culture (MLC) and potencialized (MLCp) with exogenous cytokines; (2) typing of cytokine genes, by PCR-SSP, and (3) following-up of serum level cytokines from transplanted patients, using quantitative enzyme-linked immunoassays. From August 1994 to February 2002, it was analyzed 118 transplants, with HLA-identical donors, who had been performed in the Hematological and Hemotherapy Center and Clinic's Hospital at Campinas State University. In the MLCp, the donor lymphocyte response versus receptor cells (DxR) was augmented 1.9 and 4.1 times with IL-4 (100 η g/mL) and IL-2 (10 η g/mL) supplementation, respectively. However, the donor response *versus* their selves-cells (DxD) also augmented, 2.0 and 6.4 times, respectively. Since this treatment also stimulated an increase of autologous responses, MLCp did not have advantages on relation to standard method (MLC) that showed a correlation with the incidence of chronic GVHD. Cytokine gene polymorphism analysis showed that TNF- α ⁻³⁰⁸, IFN- γ ⁺⁸⁷⁴, IL-6⁻¹⁷⁴, IL-10^{-1082, -819, -592}, and TGF- β 1^{+869, +915} genotypes were not associated to increased risk of acute GVHD and rejection, whereas the IL-6 low producer phenotype showed significant statistical association to chronic GVHD. The following-up of sIL-2R, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , and TGF- β 1 recipient serum levels during 15 weeks post-transplant showed that sIL-2R and IL-10 average levels were higher in the group with acute GVHD (776.4 \pm 65.5 μ g/mL and 10.9 \pm 3.3 μ g/mL), than in the group without the disease (541.1 \pm 17.3 μ g/mL and 2.5 \pm 2.2 μ g/mL). Soluble IL-2 receptor levels at the engraftment and at onset of acute GVHD were also different between the groups with and without

acute GVHD ($1.165.0 \pm 179.2$ $\mu\text{g/ml}$ vs. 578.0 ± 47.2 $\mu\text{g/ml}$ and 926.4 ± 142.5 $\mu\text{g/ml}$ vs. 496.5 ± 48.7 $\mu\text{g/ml}$), respectively. The cytokine kinetics also showed that TNF- α and TGF- β 1 levels were associated with acute GVHD. In the first weeks after the transplant, high TNF- α levels were associated with acute GVHD (72.7 ± 2.6 $\mu\text{g/mL}$ vs. 38.1 ± 1.7 $\mu\text{g/mL}$). In the last weeks, TGF- β 1 levels were lower in the group with acute GVHD (7.5 ± 1.4 ng/ml) than those in the group without the disease (17.0 ± 1.6 ng/ml). Therefore, the monitoring of sIL-2R, IL-10, TNF- α , and TGF- β 1 serum levels after the transplant can provide to physician an indication of acute GVHD risk, while IL-6⁻¹⁷⁴ genotype may offer a new method for identifying patients at increased risk of chronic GVHD.



1. INTRODUÇÃO

1.1. TRANSPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS

A história do transplante de medula óssea começou em 1949 com os estudos de JACOBSON *et al.* (1949), utilizando modelos animais. Os primeiros estudos clínicos apropriados usando medula óssea para restaurar a linfohematopoiese em humanos começaram em 1957, nos Estados Unidos, com os trabalhos de THOMAS *et al.* (1957). Durante as três últimas décadas, a transplantação de células progenitoras hematopoiéticas após altas doses de quimio-radioterapia ablativa de medula tem emergido, como um tratamento de escolha para várias doenças hematológicas, neoplásicas e congênicas. Entre as doenças hematológicas, podemos citar as leucemias aguda e crônica, a anemia aplástica grave, os linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin, a síndrome mielodisplástica, o mieloma múltiplo e outras. Mais recentemente, a lista de doenças tratadas por este tipo de terapia tem sido expandida para incluir muitas síndromes metabólicas congênicas, anemias congênicas e adquiridas e doenças não hematológicas.

A transplantação de células progenitoras hematopoiéticas consiste na transferência destas células-tronco pluripotentes do doador para o receptor, as quais têm a capacidade de renovação contínua e de gerar progenitoras para as células maduras que constituem o sangue e sistema imune. A fonte de células progenitoras pode ser a medula óssea, sangue periférico ou sangue de cordão umbilical.

Os primeiros transplantes entre irmãos HLA-compatíveis foram realizados em 1968, para o tratamento de imunodeficiência congênica e, em 1969, para o tratamento de leucemia (GATTI *et al.*, 1968; THOMAS *et al.*, 1975). Atualmente, mais de 10.000 transplantes por ano são realizados em todo mundo (POLLACK, 1997). Contudo, o acesso a esta forma de terapia tem sido limitado à disponibilidade de doadores HLA (do inglês, *Human Leukocyte Antigen*) compatíveis. Além da compatibilidade entre doador e receptor, o sucesso do

transplante também depende do controle da doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD do inglês, *Graft-versus-Host Disease*).

1.2. HISTOCOMPATIBILIDADE

As técnicas para definir antígenos de histocompatibilidade em humanos foram cruciais para o desenvolvimento do transplante. Estes antígenos provocam reações imunes quando tecidos são transplantados de um indivíduo para um receptor geneticamente não-idêntico, o que resulta num processo denominado rejeição. Os principais alvos moleculares nos casos de rejeição de transplantes são as formas alélicas não próprias das moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH).

O CPH é uma região cromossômica que compreende um conjunto de genes, altamente polimórficos, os quais codificam aloantígenos de superfície celular. Em humanos, os genes do CPH encontram-se localizados no braço curto do cromossomo 6 e subdividem-se em três classes (Figura 1). O sistema HLA constitui um subconjunto de genes do CPH humano, estes genes são denominados HLA de classe I e classe II (SACHS, 1984).

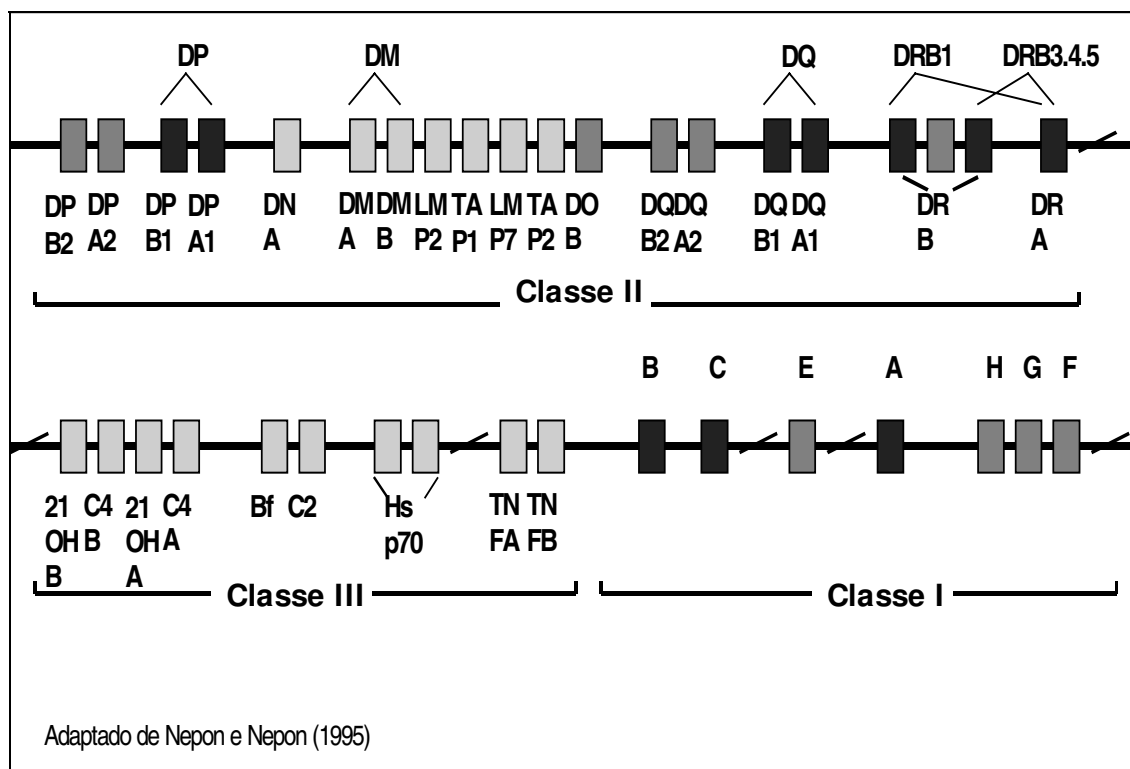


Figura 1. Complexo Principal de Histocompatibilidade Humano - CPH

Os *loci* clássicos do CPH classe I (HLA-A, -B, -C) codificam glicoproteínas de membrana de alto polimorfismo, envolvidas em importantes mecanismos de contato imune intercelular (ZINKERNAGEL e DOHERTY, 1979). As moléculas HLA de classe I são formadas por uma cadeia polipeptídica α , codificada pelo CPH. Na superfície celular, as moléculas classe I estão associadas, de maneira não covalente, com a beta-2-microglobulina, uma molécula menor, codificada por um gene não polimórfico, localizado no cromossomo 15, fora do CPH. As moléculas classe I estão presentes na superfície de todas as células nucleadas e participam na apresentação de derivados peptídicos intracelulares às células T citotóxicas CD8⁺ (Tc). Uma vez que o reconhecimento é feito, o linfócito Tc destrói a célula-alvo que apresenta o antígeno. Nas condições não-fisiológicas de transplantes, são as moléculas HLA de classe I estranhas (ligadas a peptídeos endógenos) que são reconhecidas pelos linfócitos Tc do hospedeiro durante a rejeição. Recentemente, outros *loci* HLA

classe I foram identificados, HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-H e HLA-J, entretanto sua relevância na resposta alogênica ao transplante ainda permanece desconhecida.

Os antígenos HLA classe II são codificados por dois diferentes tipos de genes, denominados “A” e “B”. Três genes funcionais A e seis B estão localizados nas sub-regiões denominadas HLA-DR, -DQ e -DP. Os genes A e B codificam glicoproteínas transmembrânicas denominadas cadeias α e β , respectivamente, as quais formam um heterodímero na superfície celular. Todos os antígenos HLA-DR apresentam a mesma cadeia α , não polimórfica. Assim, o que distingue um antígeno de outro são diferenças na seqüência de aminoácidos encontradas nas cadeias β . A cadeia β presente nos antígenos HLA-DR1 a DR18 é codificada pelo gene DRB1. A união do gene A com o gene DRB3 produz os antígenos chamados de HLA-DR52, com o gene DRB4 produz o antígeno HLA-DR53 e com o gene DRB5 a molécula HLA-DR51. As proteínas dos antígenos HLA-DQ e -DP são codificadas por dois pares de genes DQA e DQB. As moléculas de histocompatibilidade de classe II têm uma distribuição celular mais restrita sendo encontradas, constitutivamente, em linfócitos B, macrófagos/monócitos, células dendríticas, células de Langerhans da pele e em algumas células hematopoiéticas precursoras. A expressão das moléculas classe II também pode ser induzida em linfócitos T ativados e em outras células incluindo fibroblastos e células endoteliais. Estas moléculas HLA classe II têm como função apresentar peptídeos exógenos ao receptor do linfócito T auxiliador (Ta), CD4⁺, durante a resposta imune. A principal função efetora dos linfócitos T auxiliares é a secreção de citocinas, as quais atuam sobre células T auxiliares e citotóxicas, além de outras, incluindo linfócitos B, células NK (do inglês, *Natural Killer*), macrófagos, polimorfonucleares e endotélio vascular. Estas citocinas exercem vários efeitos que promovem e regulam as respostas imunes específicas humoral e celular e também a reação inflamatória.

O sistema HLA tem um papel de destaque na área dos transplantes. Suas moléculas agem como fortes antígenos de transplantação e o seu polimorfismo constitui uma séria barreira para transplantes de órgãos entre indivíduos não

consangüíneos. Maior sobrevida de aloenxertos é observada entre indivíduos HLA-*idênticos*, para os *loci* HLA-A, B, DRB1 e DQB1.

A influência da incompatibilidade HLA-DP tem sido alvo de controvérsia no transplante de medula óssea. Para alguns autores, os determinantes antigênicos HLA-DP não atuam da mesma maneira que os HLA-A, B, DR ou DQ, de modo que uma incompatibilidade DP não implicaria em risco de GVHD (PETERSDORF *et al.*, 1993). Uma vez que todo o complexo HLA é herdado em bloco, uma incompatibilidade DP entre indivíduos aparentados seria resultante da recombinação entre os genes DQ/DP. Até o presente momento, ainda não está claro se a disparidade HLA-DP deve ser utilizada como critério de exclusão do doador (PETERSDORF *et al.*, 1993; GASCHET *et al.*, 1996).

Com os recentes avanços nos métodos de tipagem por DNA (genotipagens) é possível definir incompatibilidades antes não detectadas por métodos sorológicos ou por cultura mista de linfócitos primária. Diferenças alélicas têm sido correlacionadas com GVHD, principalmente, em casos de doadores não aparentados. Mais de 130 diferentes antígenos HLA-A, B, Cw, DR, DQ e DP foram definidos sorologicamente. Até o presente momento, com a introdução de métodos de tipagem de DNA, com alta resolução, foram incluídos 5.320 haplótipos HLA-A e B e 1.647 HLA-DRB1 e DQB1, analisando-se 4 grupos étnicos: Asiáticos, Negros, Caucásios Europeus e Caucásios Norte-Americanos (GJERTSON e LEE, 1998). Em relação ao *locus* HLA-DP, já foram definidos mais de 70 alelos diferentes (BODMER *et al.*, 1997).

1.3. DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO (GVHD)

Em transplantes de células progenitoras hematopoiéticas, o sistema imune do receptor deve sofrer uma ablação praticamente total, para não haver rejeição das células-tronco alogênicas transplantadas. As células efectoras podem ser linfócitos T citotóxicos e células NK e os alvos, as moléculas (em geral as clássicas) codificadas pelos genes ligados ao CPH. Contudo, as células do enxerto podem elaborar uma resposta de rejeição contra o receptor, causando a GVHD, que se constitui na

principal limitação ao uso da transplantação de medula óssea. A GVHD pode ser dividida em duas formas baseadas no tempo de ocorrência e nas manifestações clínicas. A forma aguda ocorre nos primeiros dois a três meses após a transplantação, enquanto a forma crônica manifesta-se mais tarde, 3 a 6 meses após o transplante. A GVHD aguda pode ser classificada de acordo com as manifestações clínicas em graus I, II, III e IV (GLUCKSBERG *et al.*, 1974). As formas clinicamente relevantes, graus II a IV, ocorrem em aproximadamente 20% a 50% dos pacientes que recebem células progenitoras de um irmão HLA-idêntico e em 50% a 80% daqueles que recebem estas células de um irmão com uma ou mais incompatibilidades ou células HLA compatíveis de doador não-aparentado. Dermatite, hepatite e enterite são manifestações clínicas que caracterizam a GVHD aguda. Esta síndrome ocorre como um resultado do reconhecimento de antígenos HLA dos tecidos do receptor pelas células T implantadas do doador. A limitação do número de diferenças nos alelos do CPH entre doador e receptor minimiza a ocorrência de GVHD. De fato, em sua maior parte, os transplantes de medula óssea humana são realizados entre irmãos ou indivíduos da população completamente idênticos em todos os *loci* de HLA. Em nosso centro, um recente trabalho mostrou que 43,6% dos pacientes encontraram um doador compatível na família (EID *et al.*, 2003). Doadores HLA compatíveis não-aparentados podem ser uma fonte alternativa de medula óssea para aqueles pacientes que não encontram um doador na família (CHARRON, 1996).

O sucesso do transplante em humanos ainda é impedido pela GVHD crônica, pela falha da “pega” do enxerto e pela rejeição, mesmo quando é realizado entre irmãos genotipicamente idênticos (STORB *et al.*, 1986; GALE *et al.*, 1987). A falha da “pega” do enxerto e a rejeição são importantes complicações, principalmente para pacientes com anemia aplástica (CHAMPLIN *et al.*, 1989). A GVHD crônica pode ocorrer como uma extensão da GVHD aguda (progressiva), após um intervalo livre da doença (quiescente) ou sem precedentes (de novo). Ela pode ser classificada em limitada ou extensa, dependendo dos órgãos atingidos (SHULMAN *et al.*, 1980).

Moléculas HLA e outros antígenos de transplantação ainda não totalmente conhecidos, como os antígenos de histocompatibilidade secundários (mHag, do inglês, *minor Histocompatibility antigens*), podem estar envolvidos na patogênese da GVHD e rejeição (AL-DACCAK *et al.*, 1990; GOULMY *et al.*, 1996; TSENG *et al.*, 1999). As moléculas HLA do receptor podem funcionar como antígenos nominais ao apresentar os mHag aos linfócitos T do doador. Antígenos de histocompatibilidade secundários são peptídeos associados ao HLA, originais de regiões polimórficas de proteínas presentes nas células-alvo do receptor. Apesar destes peptídeos do receptor terem, normalmente, um grau limitado de polimorfismo, também são capazes de serem reconhecidos pelas células T do doador e de elicitarem uma resposta imune. Disparidades nestes mHag, entre doadores e receptores, parecem constituir um risco potencial para GVHD e rejeição, implicando num tratamento prolongado com drogas imunossupressoras. Estes antígenos podem evocar forte resposta citotóxica (Tc) restrita ao CPH e resposta proliferativa de linfócitos T auxiliares. Cinco mHag já foram caracterizados: HA-1, 2, 3, 4 e 5 (van ELS *et al.*, 1990) e podem ser detectados pelo teste de citotoxicidade celular (GOULMY *et al.*, 1996) ou por métodos de genotipagem (WILKE *et al.*, 1998).

1.4. SELEÇÃO DE DOADORES DE MEDULA ÓSSEA

Em nosso meio, a identificação e seleção de doadores de medula óssea aparentados HLA-idênticos tem sido baseada na definição sorológica de antígenos HLA-A, -B, -DR e -DQ, na genotipagem dos alelos HLA-DRB1 e -DQB1 e na resposta em cultura mista de linfócitos clássica (CML).

A tipagem sorológica dos antígenos HLA se baseia no método de microlinfocitotoxicidade, dependente de complemento, padronizado pelo NIH (do inglês, *National Institute of Health*). Os soros específicos utilizados na tipagem são de origem de múltiparas, politransfundidos ou produzidos por técnicas para obtenção de anticorpos monoclonais *in vitro*. Para a tipagem dos antígenos HLA classe I e II, normalmente se utilizam suspensões de células mononucleares obtidas

a partir do sangue periférico. Uma das grandes limitações desta técnica é a dependência da viabilidade celular, da expressão dos antígenos HLA na superfície celular e mesmo da disponibilidade de quantidade suficiente de linfócitos, principalmente em caso de aplasia. Além disto, os antígenos HLA apresentam múltiplas especificidades sorológicas ou epítomos, o que pode levar um mesmo soro a reagir com diferentes antígenos pertencentes ao mesmo grupo de reação cruzada (CREG, do inglês, *Cross Reaction Group*), dificultando a interpretação da tipagem.

A tecnologia molecular teve um profundo impacto na tipagem HLA, principalmente com o desenvolvimento de sondas com seqüências específicas de oligonucleotídeos para alelos HLA (BIGNON *et al.*, 1997). A tipagem HLA pode ser definida selecionando-se segmentos de maior variação do DNA, correspondentes ao segundo éxon, amplificados pela reação em cadeia da enzima polimerase – PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), a qual é capaz de gerar milhões de cópias de um gene específico. Esta seleção pode ser realizada utilizando-se um painel específico de iniciadores (“primers”), no método SSP (do inglês, *Sequence-Specific Primer*) ou um painel específico de sondas (“probes”), no método SSOP (do inglês, *Sequence-Specific Oligonucleotide Probes*) (BUGAWAN *et al.*, 1990). “Probes” e “primers” são pedaços de fita única de DNA sintético (oligonucleotídeos). Quando o oligonucleotídeo é usado para iniciar a síntese de DNA ele é chamado de “primer”. Quando o oligonucleotídeo é usado para hibridização e, esta é usada para definir um tipo de HLA, o oligonucleotídeo é chamado de “probe”.

Apesar dos recentes avanços na biologia molecular para se tipar os diferentes alelos dos vários *loci* do complexo HLA, a técnica de cultura mista de linfócitos (CML) clássica ainda é aceita como um ensaio funcional em alguns centros, pois além de permitir a definição da compatibilidade entre doador e receptor, também avalia a capacidade estimulatória de diferentes produtos de genes HLA clássicos. A CML é um teste *in vitro* que avalia as capacidades de reconhecimento e proliferação de linfócitos. Este ensaio representa uma medida funcional da imunidade celular, na qual linfócitos T de um indivíduo são induzidos a proliferarem quando estimulados por leucócitos mononucleares de um outro indivíduo. O reconhecimento de alo-antígenos HLA de classe II e a ativação de

células T que ocorrem na CML são vistos como um modelo *in vitro* da fase aferente de uma reação aloenxerto *in vivo*. Embora mais trabalhosa, a CML pode prover informações sobre eventos de reconhecimento celular que podem não ser discerníveis por sorologia ou métodos de tipagem por DNA.

A CML é baseada nas observações de BAIN *et al.* (1964), de que ao manter por vários dias, em cultura, uma mistura de linfócitos de dois indivíduos, geneticamente diferentes, ocorria uma série de eventos metabólicos que resultava na ativação e proliferação celular e presença de células blásticas. Esta transformação blástica reflete a capacidade de uma ou ambas populações de linfócitos reconhecerem aloantígenos presentes na outra célula.

A CML unidirecional é utilizada quando se deseja avaliar a resposta de cada indivíduo isoladamente. Neste caso, bloqueia-se a capacidade de síntese de DNA dos linfócitos de um dos indivíduos, por métodos envolvendo irradiação ou tratamento com drogas como Mitomicina-C. Estas células passam a funcionar como estimuladoras, enquanto que as não tratadas como respondedoras.

Entre as limitações da CML, podemos citar: (1) o longo período de incubação da cultura; (2) a eventual baixa expressão das moléculas de histocompatibilidade nas células de pacientes hematológicos; (3) a deficiência funcional na imunidade celular de pacientes hematológicos; (4) a necessidade de inclusão no teste de células de indivíduos normais com o máximo de incompatibilidades HLA para atuarem adequadamente como controles de estimulação e resposta; (5) a variação de reagentes, como o soro utilizado para suplementação do meio de cultura e isótopos radioativos empregados para avaliar a proliferação celular.

A sensibilidade do método de cultura clássico em detectar diferenças entre o receptor e doador, muitas vezes relatadas como importantes no desenvolvimento de GVHD, vem sendo questionada. Embora alguns estudos mais recentes tenham mostrado que a CML poderia prever o desenvolvimento de GVHD aguda (CHANG *et al.*, 1999) e crônica (VISENTAINER *et al.*, 2002) após o

transplante alogênico de medula, estudos realizados anteriormente não mostraram o mesmo (LIM *et al.*, 1988; DeGAST *et al.*, 1992; van DER MEER *et al.*, 1998). Para aumentar a sensibilidade do teste, alguns autores têm sugerido modificações da CML, como um aumento no tempo de incubação e um aumento no número de células respondedoras e estimuladoras que permitiriam a detecção de disparidades HLA-DP (SELL e DAVID, 1990; PETERSDORF *et al.*, 1993). Outros têm proposto o uso de citocinas exógenas, para amplificar a resposta proliferativa não detectada na CML (BISHARA *et al.*, 1994).

A correlação entre a resposta em CML e a incidência de GVHD pode, em parte, ser explicada pelo fato de que a proliferação celular observada na cultura é resultante da produção e secreção de uma série de citocinas, bem como a expressão de receptores para as mesmas. Citocinas também estão envolvidas nas respostas imunológicas observadas, *in vivo*, nos episódios de rejeição e GVHD resultantes da interação de várias citocinas com capacidade de estimulação ou inibição mútua.

1.5. MECANISMOS IMUNOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DA GVHD

A patogênese da GVHD aguda pode ser descrita em três fases, nas quais fagócitos mononucleares e outras células acessórias seriam as responsáveis pela iniciação de uma reação do enxerto contra o hospedeiro e pela subsequente lesão dos tecidos do hospedeiro após complexa interação com citocinas. Estas fases estão esquematizadas na Figura 2, a seguir.

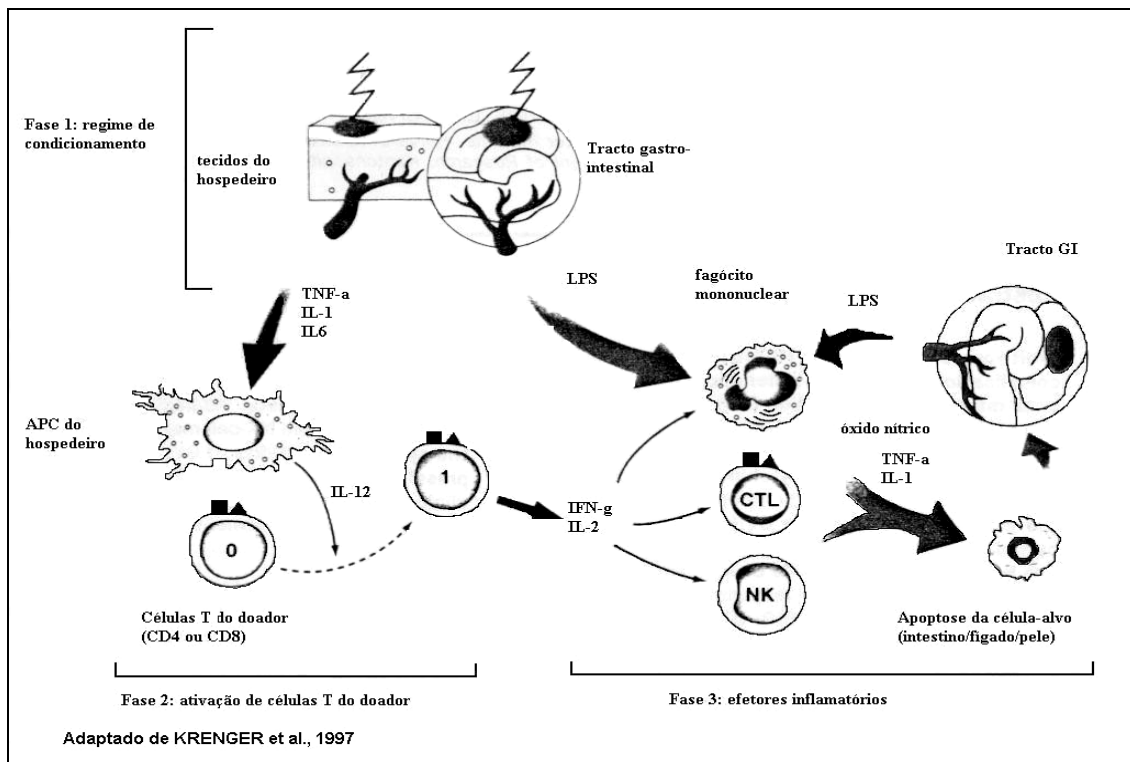


Figura 2. Patogênese da doença do enxerto contra o hospedeiro aguda em transplantes de células progenitoras hematopoiéticas.

Na fase 1, o regime de condicionamento do paciente para receber o enxerto leva a uma lesão dos seus tecidos, incluindo a mucosa intestinal, fígado e outros tecidos, e induz a secreção de citocinas inflamatórias como TNF- α (do inglês, *Tumor Necrosis Factor- α*), IL-6 e IL-1. As conseqüências da ação destas citocinas são o aumento na expressão de antígenos CPH e de moléculas de adesão, estimulando o reconhecimento dos antígenos de histocompatibilidade principais e secundários do hospedeiro por células T maduras após o transplante alogênico. Na fase 2, a ativação de células do doador é caracterizada pela proliferação de células T auxiliaadoras do tipo 1 e secreção de IL-2 e IFN- γ (Interferon- γ). Estas citocinas induzem a expansão numérica das próprias células T, além da ativação e expansão numérica de linfócitos T citotóxicos e de células NK. Durante a fase 3, as funções

efetoras de fagócitos mononucleares são induzidas pela ação direta de IFN- γ e via um sinal secundário, provido de lipopolissacarídeos (LPS), liberados da mucosa intestinal durante a fase 1. Os LPS podem subseqüentemente ativar linfócitos e macrófagos associados à mucosa intestinal. Na pele, os LPS podem ainda estimular queratinócitos, fibroblastos e macrófagos a produzirem citocinas. Todos estes mecanismos podem resultar na amplificação da lesão tecidual, promovendo uma resposta inflamatória, que junto com as células T citotóxicas e NK, levam à destruição de tecidos alvos no hospedeiro do transplante (FERRARA, 2000).

A patogênese da GVHD crônica é diferente da aguda. Ela pode ser relacionada à alo-reatividade vista na GVHD aguda ou à uma disfunção na reconstituição imune com geração de clones de células auto-reativas. Evidências sugerem que esta síndrome seja mediada por linfócitos T do doador que reconhecem diferenças alogênicas presentes nos antígenos secundários (mHag) do receptor e por linfócitos T que são primariamente auto-reativos e reconhecem antígenos compartilhados pelas células do doador e receptor (FERRARA e DEEG, 1991). Estes linfócitos T ativados são capazes de levar à lise da célula alvo e à produção de citocinas. Interleucina-4 e IFN- γ são produzidos por estas células e podem ser a causa da disfunção imunológica associada com esta síndrome, incluindo a produção de auto-anticorpos. O aumento na deposição de colágeno na pele tem sido associado ao estímulo da sua produção por uma variedade de citocinas, como IL-1, TNF- α , IL-4 e TGF- β 1 (do inglês, *Transforming Growth Factor- β 1*) (FERRARA e DEEG, 1991). Mudanças esclerodérmicas na pele e imunossupressão prolongada têm sido vistas durante a GVHD crônica e a citocina TGF- β 1 pode ser um importante mediador destes eventos, pois é capaz de estimular a síntese de matriz extracelular, além de possuir um papel regulatório no sistema imune (LETTERIO e ROBERTS, 1998).

1.6. CITOCINAS

As citocinas são proteínas ou glicoproteínas secretadas que têm importante papel na comunicação celular e são elementos chave no controle da resposta imune, pois regulam a magnitude e natureza destas respostas, influenciando no crescimento e diferenciação de linfócitos. Elas exercem seus efeitos pela interação com receptores de membrana celular, caracterizados como glicoproteínas transmembrânicas. Estes têm a capacidade de se ligarem às citocinas e de transferir a informação destas ao citoplasma da célula via componentes intracelulares. Como os receptores de citocinas têm distribuição ampla em diversos tipos celulares, uma citocina pode atuar em todos os tipos de células que possuem receptores para a mesma. Sendo, portanto, chamadas de mediadores pleiotrópicos (MEAGER, 1998).

O efeito de uma dada citocina será governado pelo micro ambiente tecidual e pelo tipo de célula portadora do respectivo receptor. Parâmetros, como concentração da citocina e de seus receptores solúveis, presença de outras citocinas, funcionamento de vias intracelulares de sinalização, ação de fatores de transcrição nuclear, indução da expressão de genes e síntese e secreção de proteínas podem influenciar o efeito final. Na realidade, a atividade de uma citocina reflete o contexto de uma célula em relação a diversos fatores, o que pode resultar em efeitos sinérgicos ou antagonistas (MEAGER, 1998).

Recentemente, tem sido reconhecido que a produção de algumas citocinas está sob controle genético. Polimorfismos localizados dentro de regiões codificadoras, íntrons ou regiões promotoras de genes de citocinas podem afetar a transcrição gênica, causando variações interindividuais na produção de citocinas (WILSON *et al.*, 1997; TURNER *et al.*, 1997a; AWAD *et al.*, 1998; FISHMAN *et al.*, 1998; PRAVICA *et al.*, 1999). Como estes polimorfismos segregam independentemente, cada pessoa é um mosaico de fenótipos capazes de produzir níveis elevados ou reduzidos de citocinas. Em termos gerais, um indivíduo pode ser capaz de produzir níveis altos, intermediários e baixos de citocinas, de acordo com a herança de alelos. Polimorfismos de genes de citocinas têm sido associados ao

desenvolvimento de rejeição de órgãos sólidos (TURNER *et al.*, 1997b; AWAD *et al.*, 1998; SANKARAN *et al.*, 1999; HAHN *et al.*, 2001; REVIRON *et al.*, 2001; POLI *et al.*, 2001; GEORGE *et al.*, 2001; FERNANDES *et al.*, 2002) e GVHD após o transplante de células progenitoras hematopoiéticas (MIDDLETON, 1998; CAVET *et al.*, 1999; CAVET *et al.*, 2001; LEFFELL *et al.*, 2001; TAMBUR *et al.*, 2001; SOCIÉ *et al.*, 2001; DICKINSON *et al.*, 2001). A análise de genótipos de citocinas poderia determinar quais citocinas são de importância (causal) no processo de rejeição e/ou GVHD. Além disso, estes genótipos poderiam ser usados como indicadores prognósticos de rejeição e/ou GVHD e imunossupressão.

Vários trabalhos têm demonstrado um aumento de citocinas com funções inflamatórias e imunoestimuladoras e/ou seus receptores (TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- γ , sIL-2R e sIL-6R) no soro de pacientes com GVHD ou rejeição (NIEDERWIESER *et al.*, 1990; SYMINGTON *et al.*, 1992; IMAMURA *et al.*, 1994; REMBERGER *et al.*, 1995; LANGE *et al.*, 1996; MIYAMOTO *et al.*, 1996; TOREN *et al.*, 1996; KOBAYASHI *et al.*, 1997; REMBERGER *et al.*, 1997; ABDALLAH *et al.*, 1997; LIEM *et al.*, 1998; GRIMM *et al.*, 1998; FOLEY *et al.*, 1998; CHANG *et al.*, 1999; KOBAYASHI *et al.*, 1999; KAYABA *et al.*, 2000; MATHIAS *et al.*, 2000; KAMI *et al.*, 2000; NAKAMURA *et al.*, 2000; HUANG *et al.*, 2001; NAGLER *et al.*, 1995). Citocinas com funções imunorreguladoras (IL-4, IL-10 e TGF- β 1) também têm sido associadas a estas complicações (TANAKA *et al.*, 1997; REMBERGER *et al.*, 1997; HEMPEL *et al.*, 1997; LIEM *et al.*, 1998; BAKER *et al.*, 1999; TAKATSUKA *et al.*, 1999; LIEM *et al.*, 1999; SAKATA *et al.*, 2001). Contudo, um balanço entre estas citocinas parece ser crítico para o desenvolvimento de GVHD (TANAKA *et al.*, 1997; NIKOLIC *et al.*, 2000).

Técnicas de cultura mista de linfócitos mais sensíveis e a definição de um perfil genético de produção de citocinas, aliadas à genotipagem dos alelos HLA classe I e II, bem como o seguimento da produção de citocinas, no período pós-condicionamento e pós-transplante de medula óssea, poderiam permitir um melhor entendimento dos processos imunopatológicos envolvidos na rejeição e GVHD. Estes ensaios laboratoriais poderiam fornecer ao clínico um indicativo em

relação ao risco destas complicações e auxiliar na adequação da terapia imunossupressora.



2. OBJETIVOS

Tendo em vista, que a rejeição do enxerto e a doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD) são as principais complicações do transplante de células progenitoras hematopoiéticas e que os métodos empregados para seleção de doadores não são capazes de prever a ocorrência destes eventos em receptores de células HLA-compatíveis, o presente trabalho teve os seguintes objetivos:

2.1. OBJETIVO GERAL

Propor procedimentos laboratoriais que, isoladamente ou em conjunto, sejam úteis para prever a ocorrência de rejeição ou GVHD em pacientes submetidos ao transplante de células progenitoras hematopoiéticas de irmão HLA-idêntico e que ao mesmo tempo possam ser economicamente viáveis e de fácil e rápida execução.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em uma população de 118 pacientes transplantados no Centro de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Estadual de Campinas, no período compreendido entre agosto de 1994 a fevereiro de 2002, o presente trabalho se propôs a:

- 2.2.1.** Padronizar um método de cultura mista de linfócitos com emprego de citocinas exógenas e comparar a sua sensibilidade com o método clássico;
- 2.2.2.** Definir o polimorfismo dos alelos dos genes reguladores das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 e TGF- β 1 entre receptores e doadores;
- 2.2.3.** Avaliar o nível sérico de sIL-2R, TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 e TGF- β 1 dos receptores nos períodos pré-condicionamento, pós-condicionamento e, semanalmente, até 15 semanas pós-transplante;

2.2.4. Avaliar a correlação dos itens anteriores com a incidência de rejeição do enxerto e doença do enxerto contra o hospedeiro.



3. METODOLOGIA

3.1. CASUÍSTICA

3.1.1. Elegibilidade

O presente trabalho incluiu pacientes com doenças hematológicas, que receberam um primeiro transplante de células progenitoras hematopoiéticas no Centro de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Estadual de Campinas, no período compreendido entre agosto de 1994 a fevereiro de 2002. Os pacientes foram acompanhados clinicamente até setembro de 2002. Foram avaliados somente os pacientes que receberam transplante alogênico de irmãos HLA-identicos e a seleção destes pacientes seguiu o protocolo vigente por ocasião do transplante.

A histocompatibilidade entre os irmãos foi definida pela tipagem dos antígenos HLA classe I (HLA-A e -B) e classe II (HLA-DR e -DQ) por métodos sorológicos e pela técnica de cultura mista de linfócitos clássica (CML) até outubro de 1997. A partir desta data, a tipagem molecular dos alelos DRB1 e DQB1 foi introduzida e realizada pelo método de PCR-SSP (do inglês, *Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primer*).

Foram incluídos 118 pacientes com material biológico disponível e suficiente para as análises. Destes, 85 pacientes (72,0%) eram do sexo masculino e 33 (28,0%) do sexo feminino, com mediana de idade de 30 anos (3 – 59). Oitenta e dois pacientes (69,5%) receberam enxerto proveniente da medula óssea (MO) e 36 (30,5%) de células progenitoras do sangue periférico (CPP). Cinquenta e quatro pacientes (45,8%) eram portadores de leucemia mielóide crônica; 21 (17,8%), leucemia mielóide aguda; 10 (8,5%), leucemia linfóide aguda; 21 (17,8%), anemia aplástica grave; 7 (5,9%), síndrome mielodisplástica; 2 (1,7%), mieloma múltiplo; 1 (0,8%), leucemia mielomonocítica crônica; 1 (0,8%), hemoglobinúria paroxística noturna e 1 (0,8%), anemia diseritropoiética congênita. Dos 118 doadores estudados, 66 (55,9%) eram do sexo masculino e 52 (44,1%) do sexo feminino, com mediana de idade de 30 anos (4 – 60). Receberam enxerto de doador do mesmo sexo, 39,4% dos pacientes do sexo feminino e 54,1% dos pacientes do sexo

masculino. As características dos pacientes e doadores para os casos acompanhados neste estudo estão listadas na Tabela 1. Mais detalhes podem ser vistos no ANEXO I.

Tabela 1. Características dos pacientes e doadores.

Número de Pacientes e Doadores:	118
Idade (mediana): Pacientes	3 - 59 anos (30)
Doadores	4 - 60 anos (30)
Sexo Doador/Paciente:	F/M = 39/85 (45,9%) F/F = 13/33 (39,4%) M/M = 46/85 (54,1%) M/F = 20/33 (60,6%)
Regime de Condicionamento:	Bu + Cy = 97 (82,2%) Bu + Cy + VP = 2 (1,7%) Cy = 7 (5,9%) Cy + TBI = 12 (10,2%)
Primeiro transplante:	MO = 82 (69,5%) CPP = 36 (30,5%)
Profilaxia da GVHD:	MTX + CsA = 109 (92,4%) CsA = 2 (1,7%) CsA + cort = 7 (5,9%)
Doenças malignas:	
Doença precoce: (LMC, 1ª FC; LMA, 1ª RC; LMA, 1ª re; LLA, 1ª RC)	73 (61,9%)
Doença avançada: (LMC, FA/CB; LMA > 1ª re; LMA refratária; LLA > 2ª)	22 (18,6%)
Outras doenças malignas e não-malignas: (AA, HPN, SMD, MM, LMMC, ADC)	23 (19,5%)

M, masculino; F, feminino; Bu, busulfan; Cy, ciclofosfamida; VP, etoposide; TBI, irradiação corporal total; MO, medula óssea; CPP, células progenitoras do sangue periférico; MTX, metotrexato; CsA,

ciclosporina; cort, corticosteróides; LMC, leucemia mielóide crônica; FC, fase crônica; LMA, leucemia mielóide aguda; RC, remissão completa; re, recaída; LLA, leucemia linfóide aguda; FA/CB, fase acelerada /crise blástica; AA, anemia aplástica grave; HPN, hemoglobinúria paroxística noturna; SMD, síndrome mielodisplástica; MM, mieloma múltiplo; LMMC, leucemia mielomonocítica crônica; ADC, anemia diseritropoiética congênita.

Todos os pacientes foram avaliados em relação à incidência de GVHD aguda e rejeição. A análise da incidência de GVHD crônica só foi possível entre 94 pacientes que sobreviveram mais que 100 dias após o transplante.

O termo de consentimento informado foi obtido utilizando-se protocolos e impressos de acordo com nossas regulamentações institucionais (ANEXO II).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Tipagem dos Antígenos HLA por Sorologia

Células mononucleares de pacientes e doadores foram isoladas de amostras de sangue coletadas com heparina, através de centrifugação por gradiente de densidade usando Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals[®], Uppsala, Suécia; Wintrop Products Inc., New York, USA). A nuvem formada entre o plasma e o gradiente foi aspirada cuidadosamente com pipeta Pasteur e transferida para um tubo plástico de 15 mL. O volume foi completado com solução fisiológica, homogeneizado e lavado por centrifugação (1200 rpm/10 min.) à temperatura ambiente, por duas vezes. Para os experimentos de microlinfocitotoxicidade, as células foram ressuspensas em solução balanceada de Hanks (TC Hanks Solution, Difco Laboratories[®], Detroit, USA). A seguir, foi realizado um método para obtenção de suspensões celulares enriquecidas de linfócitos T e B. O método realizado baseia-se na incubação de células mononucleares em fibra de lã de vidro (Glass Fiber Filter Type A 257 mm, Trial Pack, Gelman Sciences Inc.[®], Ann Arbor, USA), onde 150,0 mg de fibra foram adicionados a tubos plásticos contendo 10 mL de solução de Hanks com 5% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco Laboratories[®], Grand Island, USA) e incubados por 30 minutos, em banho-maria a 37°C. A seguir,

foi introduzida no tubo uma vareta de madeira (com aproximadamente 2 mm de diâmetro e 14 cm de comprimento) e, por meio de movimentos circulares, a fibra de vidro foi enrolada na mesma, de modo a formar um "cotonete". Um mL de células mononucleares com concentração máxima de $20,0 \times 10^6$ células por mL em solução de Hanks foi gotejado sobre o "cotonete" e, este incubado, em posição horizontal, em câmara úmida, a 37°C , por 30 minutos. Após a incubação, a fibra de vidro foi lavada, por gotejamento, com 20 mL de solução de Hanks com 5% de SBF, aquecida a 37°C . Este procedimento resultou na liberação dos linfócitos T. A seguir, o cotonete foi transferido para outro tubo contendo 10 mL de solução de Hanks com 10% de SBF e, por meio de movimentos circulares foram liberados os linfócitos B. Em seguida, ambas suspensões foram lavadas e a concentração ajustada para $2,0 \times 10^6$ por mL, em solução de Hanks. As suspensões de células enriquecidas com linfócitos T e B ($2,0 \times 10^6$ células/mL) foram então incubadas com uma mistura de anticorpos aloimunes (Pel-Freez[®], Brow Deer, WI, USA) e/ou anticorpos monoclonais (One Lambda[®], Canoga Park, CA, USA) específicos para os antígenos HLA de classe I e de classe II, respectivamente, por 1 hora a 22°C junto com o complemento. A proporção (%) de células mortas foi avaliada pela incorporação de solução de azul tripan observada em microscópio óptico comum com aumento de 150 vezes. A interpretação dos resultados obedeceu a um padrão de reatividade de anticorpos previamente conhecido e disponibilizado pela empresa fornecedora dos anti-soros.

3.2.2. Tipagem dos Alelos HLA-DRB1 e DQB1 por Técnicas de Biologia Molecular

Basicamente, os procedimentos incluíram a extração do DNA, sua amplificação pelo método de PCR, sua detecção em gel de agarose e a interpretação dos resultados.

O DNA foi extraído de amostras de sangue coletadas com EDTA pela técnica de extração com o reagente DNazol (Life Technologies[®], Grand Island, NY,

USA) ou com “Kits” de Isolamento de DNA (Gentra Systems[®], Minneapolis, MN), conforme ANEXOS III e IV, respectivamente.

A seguir, a tipagem genérica ou de baixa resolução dos alelos de classe II foi realizada utilizando-se a técnica de PCR-SSP (BIGNON *et al.*, 1997), conforme ANEXO V. O segundo éxon dos genes DRB1 e DQB1 foi amplificado com diferentes combinações de “primers” específicos para a discriminação dos diferentes alelos de cada gene. O painel de “primers” e demais reagentes específicos utilizados foram procedentes da Dynal (Dynal Ltd.[®], Bromborough, Wirral, UK). As ampliações e interpretações dos resultados foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante.

3.2.3. Cultura Mista de Linfócitos Clássica (CML)

Técnicas de cultura mista de linfócitos unidirecionais foram realizadas de acordo com a técnica padrão, modificada por LIEBER (1990), em placas de microcultura, estéreis, com 96 escavações de fundo redondo e com capacidade para 0,25 mL (Corning Incorporated, New York, USA). Os volumes foram dispensados com auxílio de seringas Hamilton de 1,0 mL e 5,0 mL acopladas com dispensador repetitivo PB600 e PB601 (Hamilton Co. Inc. Whittier[®], Califórnia, USA), e adaptadas para ponteiras descartáveis de 1,0 mL.

Células mononucleares do sangue periférico, obtidas esterilmente de acordo com o método já descrito, foram ressuspensas em meio RPMI-1640 (Gibco Laboratories[®], Grand Island, USA) e divididas em duas amostras. Uma das amostras foi reservada para atuar como células estimuladoras e a outra foi ajustada à concentração de $1,0 \times 10^6$ por mL, para atuar como células respondedoras.

A suspensão reservada para atuar como estimuladora foi submetida ao tratamento com Mitomicina-C (Mitomicin C, Laborterápica Bristol, Química e Farmacêutica Ltda[®], São Paulo). Para isto, sua concentração foi ajustada a $10,0 \times 10^6$ células mononucleares por mL e 50,0 µg de Mitomicina-C foram adicionados por mL de suspensão, a fim de bloquear a proliferação celular. As células foram, então, incubadas por 30 minutos em banho-maria 37°C, com homogeneização a cada 10

minutos. Após a incubação, foi adicionado igual volume de uma mistura de soros inativados, de pelo menos 2 indivíduos normais, do sexo masculino, sem história de transfusões sanguíneas prévias (SN), completado o volume com solução fisiológica e as suspensões celulares foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Estas suspensões celulares, foram lavadas por mais três vezes em solução fisiológica e a concentração ajustada para $1,0 \times 10^6$ por mL de meio RPMI-1640, sem soro.

Foram misturados, nas escavações apropriadas da microplaca, 100 μL da suspensão de células respondedoras com 100 μL da suspensão de células tratadas com Mitomicina-C (células estimuladoras) e 20 μL de SN. Foram incluídas no experimento, células respondedoras e estimuladoras de pelo menos dois indivíduos normais não aparentados, além das células do paciente e do doador e agrupadas em todas as combinações possíveis.

As placas tampadas foram mantidas por 7 dias em estufa úmida, a 37°C com 5% de tensão de CO_2 .

Dezoito horas antes do término da incubação, foram adicionados a cada escavação da placa, 20 μL de solução de timidina triciada com $2,49 \times 10^{11}$ Bq/mmol de atividade específica (DuPont, New England Nuclear, Boston, USA), adequadamente diluída em água destilada. Ao final, as culturas foram coletadas semi-automaticamente (Cell Harvest- Skatron Instruments, USA) em papel de fibra de vidro (Millipore-AP 20-810, Millipore Ind. Brasileira[®], São Paulo, Brasil), por meio de filtração a vácuo e lavadas com água destilada (Harteman, 1972). Os discos, correspondentes a cada escavação da placa, foram destacados e transferidos para frascos de cintilação (Wheaton Disposable Scintillation Vials) contendo 2,0 mL de líquido de cintilação. Em seguida, cada frasco foi contado em Cintilador Beckman-LS-100, durante um minuto. A síntese de DNA foi avaliada pela contagem em cintilação líquida. Os resultados foram obtidos pela média aritmética das triplicatas em contagem por minuto (cpm). Como em geral, o coeficiente de variação não ultrapassou 15%, este não foi levado em consideração na expressão dos resultados.

As respostas dos linfócitos do receptor às células do doador (RxDm) e do doador às células do receptor (DxRm) foram avaliadas em relação às respostas contra células de pelo menos dois indivíduos normais não aparentados (Na), e expressas como resposta relativa do doador (DRR) e do receptor (RRR) calculada de acordo com as fórmulas descritas a seguir:

$$\text{RRR (\%)} = \frac{(\text{RxDm} - \text{RxRm})}{\text{---} \times 100}$$

$$\frac{[(\text{RxNa}_{1m} - \text{RxRm}) + (\text{RxNa}_{2m} - \text{RxRm}) + (\text{RxNa}_{nm} - \text{RxRm})] / n}{(\text{DxRm} - \text{DxDm})}$$

$$\text{DRR (\%)} = \frac{\text{---}}{\text{--} \times 100}$$

$$[(\text{DxNa}_{1m} - \text{DxDm}) + (\text{DxNa}_{2m} - \text{DxDm}) + (\text{DxNa}_{nm} - \text{DxDm})] / n$$

3.2.4. Cultura Mista de Linfócitos Potencializada com Citocinas Exógenas (CMLp)

Para evitar uma possível influência da droga Mitomicina C, utilizada para impedir a proliferação celular, nestes experimentos foi empregado o tratamento por irradiação (4000 rads por 789 segundos), em aparelho Cisbio International (IBL 437 C; CEDEX-France) para o preparo das células estimuladoras. As concentrações das células respondedoras e estimuladoras, o tempo de incubação e demais procedimentos foram os mesmos empregados na cultura mista clássica descrita anteriormente.

3.2.4.1. Pré-tratamento de Células Estimuladoras

Com o objetivo de aumentar a expressão das moléculas de histocompatibilidade, a suspensão de células mononucleadas a ser utilizada como célula estimuladora foi previamente incubada com IL-4 ou IFN- γ (Gibco Laboratories[®], Grand Island, USA). Para se definir a concentração mais adequada de cada citocina, foram realizadas culturas preliminares empregando-se células de 6 pares de indivíduos normais não aparentados, onde as células estimuladoras foram incubadas com concentrações de IL-4 variando de 0,1 a 500 η g/mL e com concentrações de INF- γ variando de 0,1 a 1000 η g/mL. As células foram mantidas por 24 horas, a 37° C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Antes de ser submetida à irradiação a suspensão celular foi lavada por 3 vezes em meio de cultura RPMI 1640.

Os estudos preliminares mostraram que nenhuma das concentrações causou um incremento considerável nas respostas das culturas. Assim, este método não foi empregado na avaliação das respostas dos candidatos ao transplante.

3.2.4.2. Suplementação do Meio de Cultura com Citocinas Exógenas

Com a finalidade de aumentar a capacidade proliferativa de linfócitos, foram adicionadas ao meio as citocinas IL-2 ou IL-4 (Gibco Laboratories[®], Grand Island, USA), no período inicial da cultura.

As doses apropriadas das citocinas foram definidas previamente, num ensaio de titulação empregando-se células de 6 pares de indivíduos normais não aparentados, onde as concentrações de IL-2 variaram de 0,00001 a 100 $\eta\text{g/mL}$ e de IL-4 de 0,1 a 500 $\eta\text{g/mL}$.

Com as melhores concentrações definidas, 10 $\eta\text{g/mL}$, para IL-2 e 100 $\eta\text{g/mL}$, para IL-4, foram realizados estudos das respostas em CMLp em 17 pares doador-receptores dentre os 118, incluídos neste trabalho.

3.2.5. Tipagem dos Alelos de Genes Reguladores de Citocinas

Amostras de DNA de 109 receptores e 106 doadores de medula óssea, dentre os 118 selecionados no estudo, foram disponibilizadas para a tipagem dos alelos de citocinas. Os genótipos dos receptores e doadores de transplantes para os polimorfismos TNF- α ⁻³⁰⁸, IFN- γ ⁺⁸⁷⁴, IL-6⁻¹⁷⁴, IL-10^{-1082, -819, -592} e TGF- β ^{1+869, +915} foram analisados por PCR-SSP, usando o “Kit” de genotipagem de citocinas (One Lambda[®], Canoga Park, CA, USA), conforme ANEXO VI. Todas as amplificações foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante. Os produtos PCR foram então visualizados por eletroforese em gel de agarose 2,5%. Os indivíduos foram considerados bons ou maus produtores para estas citocinas, de acordo com seus genótipos (Tabela 2).

Tabela 2. Polimorfismos dos genes reguladores de citocinas associados com a produção de citocinas.

Alelo	Genótipo	Fenótipo associado (produção de citocina)
TNF- α (-308)	G/G	baixa
	G/A ou A/A	alta
IFN- γ (+874)	A/A	baixa
	T/A	intermediária
	T/T	alta
	C/C	baixa
IL-6 (-174)	G/G ou G/C	alta
IL-10 (-1082, -819, -592)	ACC/ ACC ou ACC/ ATA ou ATA/ ATA	baixa
	GCC/ ACC ou GCC/ ATA	intermediária
	GCC/ GCC	alta
TGF- β 1 (+869, +915)	CG/ CC ou CC/ CC ou TC/ TC ou TC/ CC	baixa
	TG/ CC ou CG/ CG ou TG/ TC	intermediária
	TG/ TG ou TG/ CG	alta

3.2.6. Determinação do Nível de Citocinas Séricas em Pacientes Transplantados

Empregando-se métodos imunoenzimáticos quantitativos (ELISA do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) foram avaliados os níveis de sIL-2R, TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 e TGF- β 1 em amostras de soro de 13 pacientes, dentre os 118 submetidos ao transplante, utilizando-se “Kits” comerciais (BioSource[®], Europe, Nivelles, Belgium). A metodologia utilizada seguiu as recomendações do fabricante e estão detalhadas nos ANEXOS VII, VIII, IX, X, XI e XII. As concentrações de cada citocina foram determinadas empregando-se a equação da reta dos valores de referência que acompanhavam os “Kits”. Os limites de detecção foram: 16 μ g/mL para sIL-2R, 3 μ g/mL para TNF- α , 4 μ g/mL para IFN- γ , 2 μ g/mL para IL-6, 1 μ g/mL para IL-10 e 2 μ g/mL para TGF- β 1.

As amostras de sangue dos pacientes foram coletadas assepticamente, por punção venosa, nos períodos pré-condicionamento, pós-condicionamento e, semanalmente, até 15 semanas após o transplante, ou até a morte do paciente ou reinfusão de células do doador, totalizando 172 avaliações. As amostras de soro foram fracionadas até 2 horas após a coleta, acondicionadas em frascos de criopreservação e mantidas a -80°C até o momento do teste.

3.2.7. Procedimentos de Transplantação

Todos os pacientes foram preparados para o transplante de acordo com os protocolos apropriados para sua doença. A medula óssea foi obtida dos doadores por métodos padrões (THOMAS, 1974) e as células progenitoras do sangue periférico por aférese, conforme descrito por VIGORITO *et al.* (1998). O dia 0 (zero) para os pacientes foi definido como o dia da infusão da medula ou das células progenitoras do sangue periférico. Fatores de crescimento não foram usados nos pacientes após a transplantação. Um resumo do regime pré-condicionamento e da profilaxia da GVHD é mostrado na Tabela 1. A medula óssea e as células progenitoras periféricas foram analisadas para as células CD34⁺ e subpopulações de células T por citometria de fluxo. Anticorpos monoclonais foram obtidos da Becton Dickinson® Immunocytometry Systems (San Jose, CA, USA). A “pega” de neutrófilos foi considerada no primeiro de dois dias consecutivos de contagem absoluta de neutrófilos $>0,5 \times 10^9/\text{L}$. A “pega” de plaquetas foi considerada no primeiro de sete dias consecutivos com uma contagem de plaquetas $>20,0 \times 10^9/\text{L}$ sem transfusão de plaquetas. A “pega” foi também documentada por aspiração da medula óssea, biópsia e citogenética. A classificação da GVHD aguda e crônica foi obtida seguindo os critérios de GLUCKSBERG (1974) e SHULMAN (1980), respectivamente. Neste estudo, somente GVHD aguda de grau II ou maior foi considerada como doença de relevância clínica.

3.2.8. Suporte Clínico

O suporte clínico ao paciente foi provido em quartos equipados com filtros HEPA. Transfusões de células vermelhas e plaquetas irradiadas, assim como, antibióticos de amplo espectro junto com agentes anti-fúngicos, foram sempre dados quando indicados. A administração de Ceftazidime foi iniciada tão logo a contagem de neutrófilos ficou abaixo de $0,5 \times 10^9/L$ e trocas de antibióticos foram realizadas quando indicadas por culturas e curso clínico, mantendo o paciente com antibióticos até a contagem de granulócito alcançar $1,0 \times 10^9/L$. Todos os pacientes receberam Ganciclovir ($5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ três vezes por semana) após a “pega” da medula óssea como medida profilática para a infecção por citomegalovírus até o dia 75 pós-transplante. Suporte nutricional, incluindo nutrição intravenosa total, foi provido para assegurar um balanço nutricional adequado.

3.2.9. Análise Estatística

As análises estatísticas foram conduzidas usando-se os pacotes estatísticos SPSS 10.0 e S-Plus 2000, para o programa Windows. O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, todos os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

A influência das respostas em cultura mista de linfócitos clássica e de outros fatores na incidência de GVHD aguda e crônica foi averiguada numa análise multivariada de Cox (COX, 1972). Nesta análise, o intervalo de confiança (IC) foi de 95%.

As comparações das respostas (cpm) obtidas em cultura mista de linfócitos clássica e potencializada pela adição de citocinas exógenas foram realizadas utilizando-se o método estatístico não-paramétrico de Willcoxon.

Para averiguar uma possível influência da genotipagem de genes de citocinas na ocorrência de complicações pós-transplante, foi realizada uma análise

univariada de Cox. Os riscos relativos (RR) de complicações (GVHD aguda, GVHD crônica e falha do enxerto mais rejeição) foram estimados com relação à genotipagem de citocinas e outras variáveis que poderiam estar associadas a elas: a idade e o sexo do paciente e doador, a fonte de células do enxerto (medula óssea ou células progenitoras periféricas) e a situação da doença no momento do transplante. Os fatores associados ao risco destas complicações ao nível de 20% de significância foram examinados pela análise multivariada de Cox, com intervalo de confiança (IC) de 95%. As curvas de incidência acumulada de GVHD crônica, nos grupos de receptores e doadores classificados como baixos e altos produtores de IL-6, foram obtidas pelo método de Kaplan-Meier (KAPLAN e MEIER, 1958) e comparadas usando-se o teste de log-rank. Os pacientes foram censurados ao tempo da morte ou reinfusão de células do doador.

A comparação de variáveis contínuas, como os níveis médios de citocinas no soro detectados pelo método ELISA, entre o grupo que desenvolveu e aquele que não desenvolveu GVHD aguda, foi realizada por meio do teste T para amostras independentes. Quando estes níveis foram comparados dentro de cada grupo, em quatro períodos de tempo: pré-condicionamento, pós-condicionamento, durante a “pega” e após a “pega”, a análise de variância ANOVA e os testes de comparação múltipla de Tukey foram utilizados.



4. RESULTADOS

4.1. SEGUIMENTO CLÍNICO DOS PACIENTES

Os pacientes foram seguidos até setembro de 2002. A mediana do tempo de seguimento após o transplante foi de 363 dias (3 dias a 5,9 anos). Ao final do seguimento, a casuística mostrou que, dos 118 pacientes HLA-idênticos transplantados, 16,1% desenvolveram GVHD aguda, com a seguinte distribuição: 26,3% grau II, 26,3% grau III e 47,4% grau IV. GVHD crônica foi observada em 45,7% dos pacientes: a forma limitada em 23,3% e a forma extensa em 76,7%. Além disso, 14,3% dos pacientes com anemia aplástica grave como doença primária e 14,5% com outras doenças apresentaram falha do enxerto ou rejeição.

4.2. PADRONIZAÇÃO DA CULTURA MISTA DE LINFÓCITOS POTENCIALIZADA COM CITOCINAS EXÓGENAS

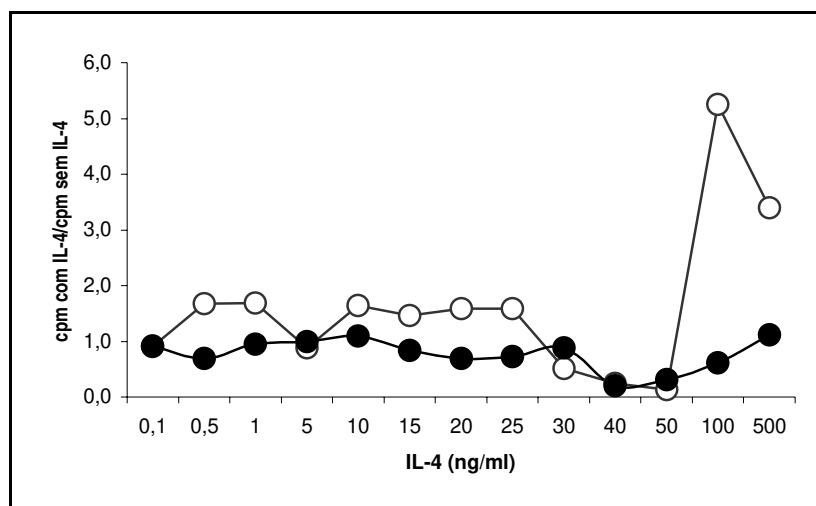
4.2.1. Titulação de IL-4 e IFN- γ Empregadas no Pré-tratamento das Células Estimuladoras

Nestes experimentos, foram analisadas as respostas de linfócitos entre seis pares de indivíduos normais não aparentados. Os resultados foram analisados empregando-se o índice calculado a partir das cpm obtidas em culturas utilizando o pré-tratamento das células estimuladoras com IL-4 (cpm IL-4) ou com IFN- γ (cpm IFN- γ), dividido pela cpm observada nas culturas clássicas (cpm sem IL-4 ou IFN- γ).

A Figura 3 mostra os índices médios das respostas frente às diferentes doses de IL-4 (a) e IFN- γ (b) usadas para o pré-tratamento das células estimuladoras. Os círculos abertos representam os índices obtidos nas culturas autólogas e os círculos fechados representam os índices obtidos nas culturas alogênicas. A pré-incubação de células estimuladoras com IL-4 ou IFN- γ não aumentou as respostas em culturas alogênicas. Além disso, com o aumento das concentrações de citocinas, as respostas autólogas aumentaram de forma

significativa. Conseqüentemente, estes procedimentos não foram empregados em culturas entre pacientes e doadores de transplante de medula óssea.

a



b

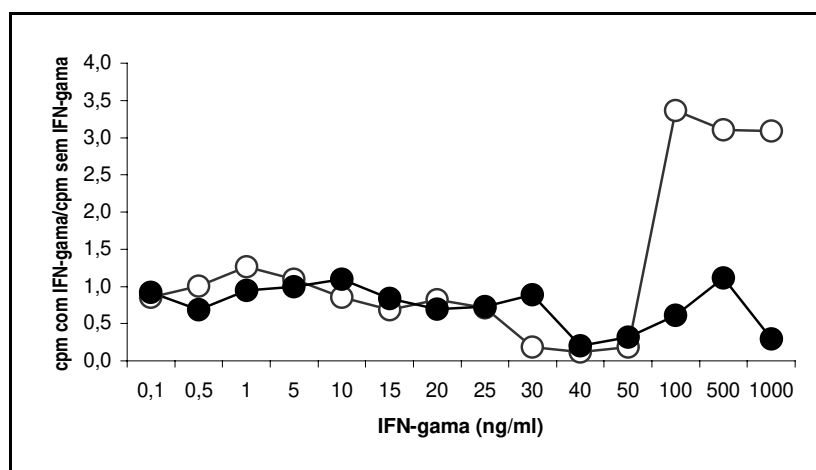


Figura 3. Dose-efeito da pré-incubação de células estimuladoras com IL-4 (**a**) ou IFN- γ (**b**) em ensaios de Cultura Mista de Linfócitos (CML) realizados com seis pares de indivíduos não-aparentados. Os resultados são expressos pela média da cpm observada na presença da citocina dividida pela cpm observada no método de cultura clássica. Círculos abertos

representam CML autóloga e círculos fechados representam CML alogênica.

4.2.2. Titulação de IL-4 e IL-2 Utilizadas para Suplementação do Meio de Cultura

O tipo de análise dos resultados e os pares de células utilizados neste procedimento foram os mesmos descritos para o pré-tratamento de células estimuladoras com IL-4 ou IFN- γ .

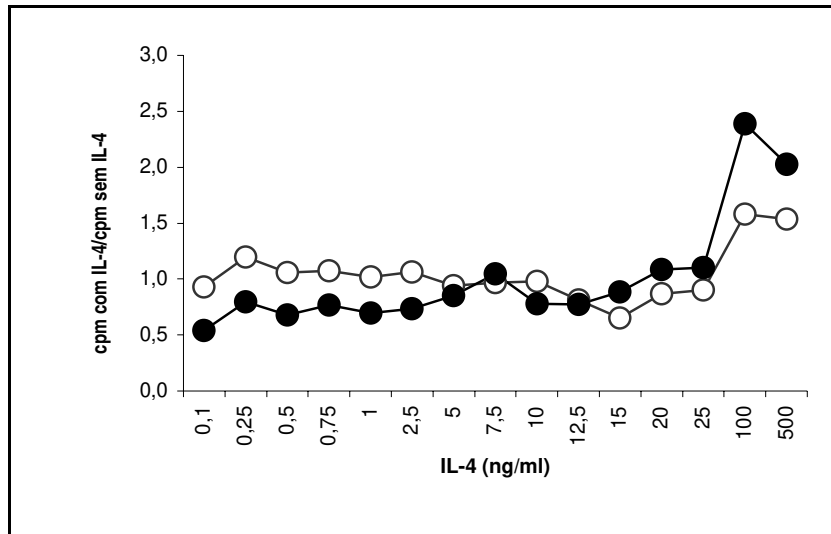
A Figura 4 representa os índices médios das respostas autólogas (círculos abertos) e alogênicas (círculos fechados) frente a diferentes doses de IL-4 (a) e IL-2 (b) adicionadas no início da cultura.

A análise dos resultados mostrou que, para IL-4, a melhor dose foi 100 $\eta\text{g/ml}$, ou seja, a dose que induziu um incremento de 140% da resposta alogênica e 60% da resposta autóloga.

Para IL-2, a melhor dose foi 10 $\eta\text{g/ml}$, ocorrendo um aumento de 90% nas respostas alogênicas e de 10% nas autólogas.

Estas concentrações foram empregadas para avaliar as respostas entre doadores e receptores submetidos para o transplante.

a



b

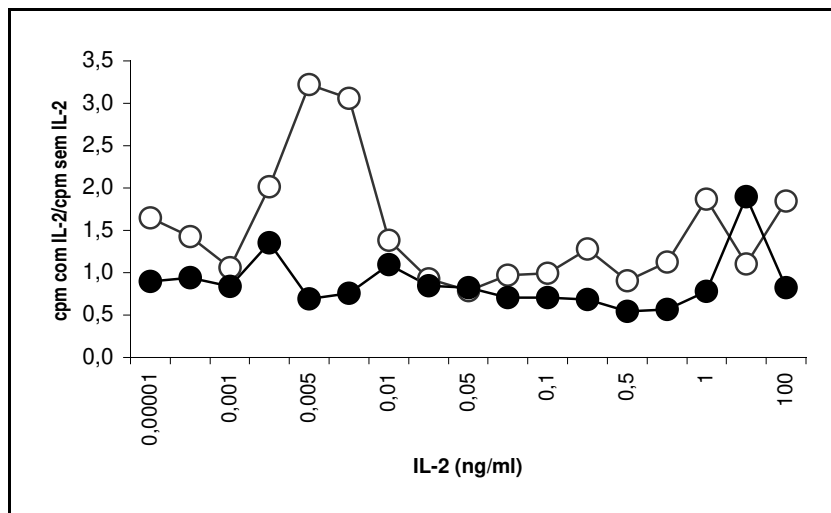


Figura 4. Dose-efeito da adição de IL-4 (a) ou IL-2 (b) no início dos ensaios de Cultura Mista de Linfócitos (CML) realizados com seis pares de indivíduos não-aparentados. Os resultados são expressos pela média da cpm observada na presença da citocina dividida pela cpm observada no método padrão. Círculos abertos representam CML autóloga e círculos fechados representam CML alogênica.

4.2.3. Resposta de Linfócitos do Doador frente às Células do Receptor em Cultura Mista de Linfócitos Potencializada pela Suplementação do Meio de Cultura com IL-4 ou IL-2

Neste estudo, foram analisadas as respostas de linfócitos de 17 doadores frente às células dos respectivos receptores (DxR), de indivíduos normais não aparentados (DxNa) e frente às próprias células (DxD). Como controle da capacidade estimulatória das células do receptor, também foram incluídas as respostas dos indivíduos não aparentados às células do receptor (NaxR).

Além da potencialização com a adição de IL-4 ou IL-2, as culturas também foram realizadas empregando-se o método clássico.

Os níveis médios das respostas avaliadas em cpm estão representados na Figura 5. Quando comparadas ao método clássico, as médias das respostas na cultura potencializada aumentaram 2,0 vezes com IL-4 ($p < 0,001$) e 6,4 vezes com IL-2 ($p < 0,001$), para respostas autólogas do doador (DxD); 1,9 vezes com IL-4 ($p < 0,001$) e 4,1 vezes com IL-2 ($p < 0,001$), para respostas do doador *versus* receptor (DxR); foi observado um aumento não significativo com IL-4 e uma média de 20% de inibição de resposta com IL-2 ($p < 0,001$) em respostas de culturas de doadores *versus* não-aparentados (DxNa). Nenhuma das citocinas mostrou diferenças significativas nas culturas de não-aparentados *versus* receptores (NaxR).

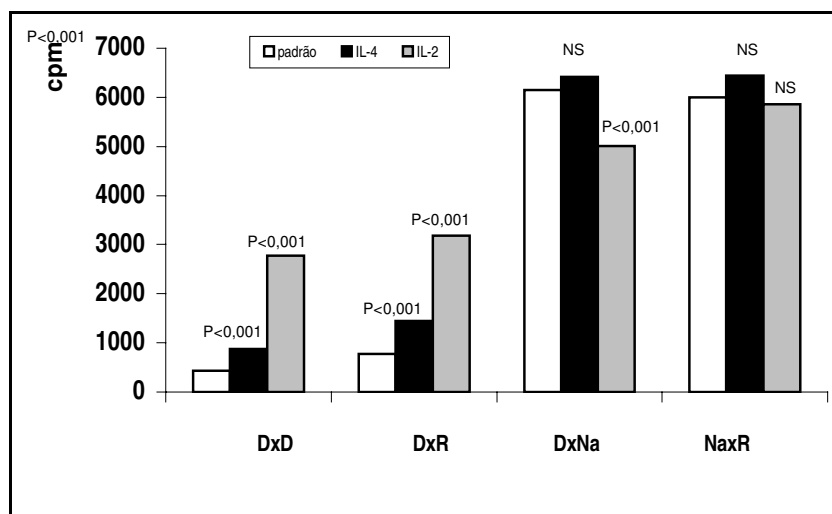


Figura 5. Efeito da adição de citocinas em ensaios de Cultura Mista de Linfócitos (CML) realizados com dezessete pares receptor-doadores HLA-idênticos, selecionados para o transplante de medula óssea nas respostas de culturas de Doador versus Doador, Doador versus Receptor, Doador versus Não-aparentado e Não-aparentado versus Receptor. Os resultados são expressos pela cpm média observada no método de cultura clássica (coluna branca), na presença de IL-4 (coluna preta) ou na presença de IL-2 (coluna cinza). D = doador; R = receptor; Na = não-aparentado.

4.2.4. Resposta de Linfócitos do Receptor frente às Células do Doador em Cultura Mista de Linfócitos Potencializada pela Suplementação do Meio de Cultura com IL-4 ou IL-2

As respostas dos linfócitos dos receptores, dos 17 casos selecionados para este estudo, foram analisadas frente às células dos doadores (RxD) e frente às próprias células (RxR). Como controle da capacidade de resposta das células do receptor, foram incluídas culturas de células do receptor *versus* não aparentados (RxNa).

Os níveis médios de respostas avaliadas em cpm estão representados na Figura 6. Quando comparadas ao método padrão, as ampliações médias na

cultura potencializada foram de 3,6 vezes com IL-4 ($p < 0,001$) e de 6,7 vezes com IL-2 ($p < 0,001$), em respostas autólogas de receptores (RxR); 3,1 para IL-4 ($p < 0,002$) e 4,5 para IL-2 ($p < 0,001$), em respostas de culturas do receptor *versus* doador (RxD); em culturas do receptor *versus* não-aparentados (RxNa), houve uma amplificação de respostas de 1,3 vezes, com IL-4 ($p < 0,005$); verificou-se, porém, uma média de 10% de inibição da resposta, usando IL-2 ($p < 0,03$).

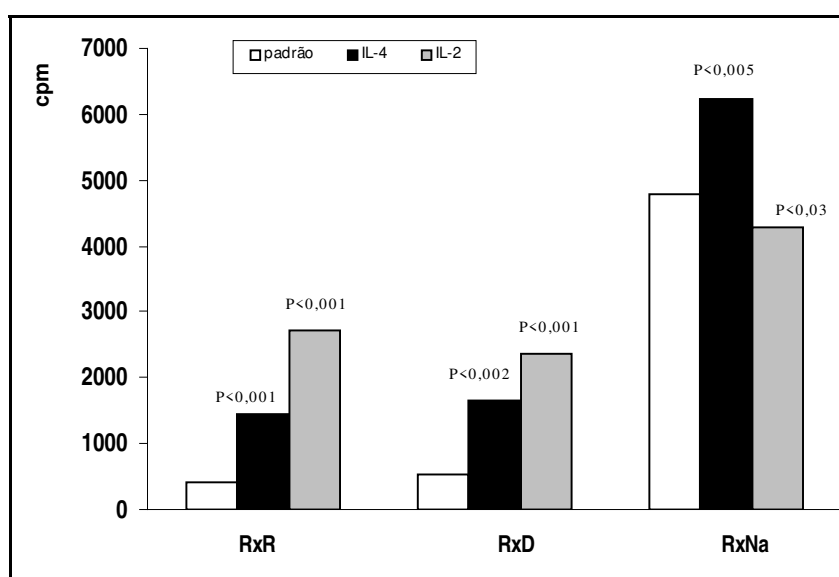


Figura 6. Efeito da adição de citocinas em ensaios de Cultura Mista de Linfócitos (CML) realizados com dezessete pares receptor-doadores HLA-idênticos, selecionados para o transplante de medula óssea nas respostas de culturas de Receptor versus Receptor, Receptor versus Doador e Receptor versus Não-aparentado. Os resultados são expressos pela cpm observada no método de cultura clássica (coluna branca), na presença de IL-4 (coluna preta) ou na presença de IL-2 (coluna cinza). D = doador; R = receptor; Na = não-aparentado.

4.3. POLIMORFISMO DOS GENES REGULADORES DE CITOCINAS

Os genótipos de 109 receptores e 106 doadores de transplantes para os polimorfismos TNF- α ⁻³⁰⁸, IFN- γ ⁺⁸⁷⁴, IL-6⁻¹⁷⁴, IL-10^{-1082, -819, -592} e TGF- β ^{1+869, +915} foram analisados por PCR-SSP e os resultados estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3. Distribuição dos polimorfismos de genes reguladores de citocinas em receptores e doadores de medula óssea.

Alelo	Genótipo Identificado	Fenótipo		Receptor (n=109)	%	Doador (n=106)	%
		relativo (produção de citocinas)					
TNF- α ⁻³⁰⁸	G/G	baixa		82	75,2	80	75,5
	G/A ou A/A	alta		27	24,8	26	24,5
IFN- γ ⁺⁸⁷⁴	A/A	baixa		33	30,3	35	33,0
	T/A	intermediária		60	55,0	56	52,8
	T/T	alta		16	14,7	15	14,2
IL-6 ⁻¹⁷⁴	C/C	baixa		5	4,6	9	8,5
	G/G ou G/C	alta		104	95,4	97	91,5
IL-10 ^{-1082, -819, -592}	ACC/ACC ou ACC/ATA ou ATA/ATA	baixa		40	36,7	40	37,7
	GCC/ACC ou GCC/ATA	intermediária		53	48,6	46	43,4
	GCC/GCC	alta		16	14,7	20	18,9

TGF- β 1 ^{+869, +915}	CG/CC ou CC/CC ou TC/TC ou TC/CC	baixa	6	5,5	7	6,6
	TG/CC ou CG/CG ou TG/TC	intermediária	17	15,6	22	20,8
	TG/TG ou TG/CG	alta	86	78,9	77	72,6

De uma maneira geral, as distribuições dos fenótipos para todas as citocinas analisadas foram semelhantes entre as duas populações estudadas. Considerando-se a totalidade dos 215 indivíduos, pode-se constatar que a maioria é portadora dos seguintes fenótipos: baixo produtor de TNF- α (75,3%), alto produtor de IL-6 (93,5%) e alto produtor de TGF- β 1 (75,8%). Em relação ao IFN- γ , os fenótipos mais frequentes foram: produtores intermediários (54,0%) e baixos (31,6%). E, em relação a IL-10, os fenótipos mais frequentes foram: produtores intermediários (46,0%) e baixos (37,7%).

4.3.1. Compatibilidade Receptor-Doador em Relação ao Fenótipo Produtor de Citocinas e o Desenvolvimento de Complicações Pós-Transplante

A análise da compatibilidade receptor-doador revelou total concordância para o fenótipo relativo ao TNF- α . Este fato já era esperado, pois um dos critérios de inclusão dos pares no estudo era a compatibilidade total para os antígenos HLA classe I e II. Como os alelos do gene de TNF- α estão localizados no cromossomo 6, próximos aos alelos do sistema HLA, eles são herdados em blocos.

Em relação aos fenótipos das demais citocinas, a compatibilidade total entre receptor e doador foi observada em 69,1%, para IFN- γ ; 71,1%, para IL-6; 52,6%, para IL-10 e 56,7%, para TGF- β 1, em 97 pares analisados.

A compatibilidade entre o receptor e doador para os genes reguladores das citocinas não interferiu na evolução do transplante. As incidências de GVHD aguda, GVHD crônica e falha do enxerto ou rejeição não foram diferentes nos

receptores compartilhando os mesmos fenótipos dos doadores daqueles cujo fenótipo diferia do doador, para todas as citocinas avaliadas.

4.3.2. Perfil da Produção de Citocinas e o Desenvolvimento de Complicações Pós-Transplante

A Tabela 4 mostra a distribuição do perfil de produção de citocinas entre doadores e receptores de medula óssea, de acordo com o desenvolvimento de GVHD aguda, GVHD crônica e falha do enxerto mais rejeição. Nenhum destes fenótipos (do doador ou do receptor) apresentou associação estatisticamente significativa ao risco aumentado de GVHD aguda e falha do enxerto mais rejeição, nos casos avaliados. Somente os fenótipos de baixa produção de IL-6 do receptor e doador foram associados ao desenvolvimento de GVHD crônica. Resultados referentes a outras variáveis incluídas na análise não foram mostrados. A Figura 7 mostra as curvas de incidência acumulada de GVHD crônica em relação aos fenótipos de produção de IL-6 do receptor (a) e do doador (b), obtidas pelo método de Kaplan-Meier e os valores de p resultantes da comparação destas incidências pelo teste de log-rank. A análise multivariada confirmou esta associação. Nesta, os fenótipos de baixo produtor de IL-6 do receptor (RR= 3,87; $p=0,04$) e doador (RR= 6,64; $p<0,001$) e o uso de células progenitoras periféricas como enxerto (RR= 3,67; $p<0,001$) foram associados de forma independente ao risco de GVHD crônica.

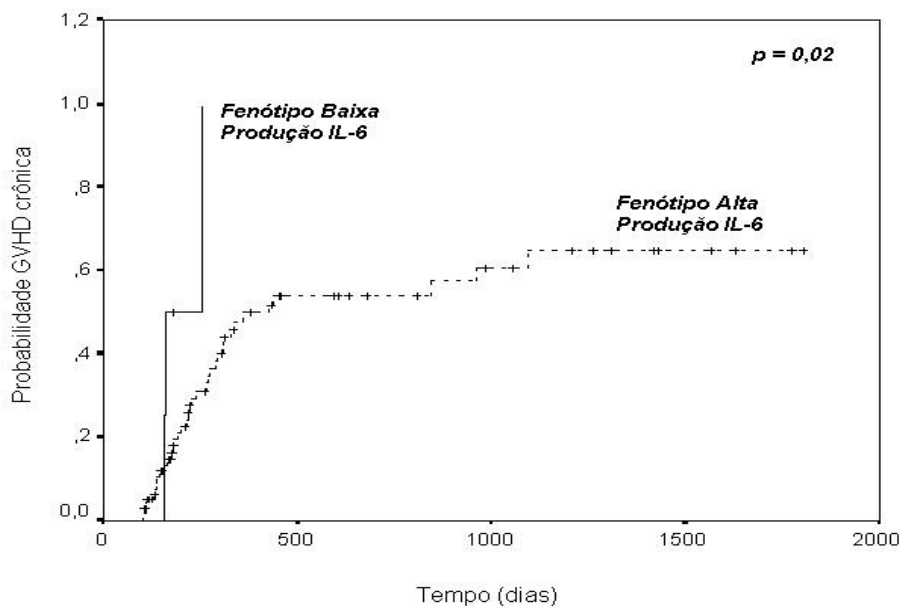
Tabela 4. Distribuição do perfil produtor de citocinas em receptores e doadores de medula óssea, de acordo com o genótipo, em pacientes com GVHD aguda, GVHD crônica e falha do enxerto mais rejeição.

Citocina	Fenótipo	GVHD aguda			GVHD crônica			Falha do enxerto mais rejeição			
		produção de citocinas	ausente	presente	P	ausente	presente	P	ausente	presente	P
TNF- α (R)	baixa		67	15	NS	36	27	NS	70	12	NS
	alta		24	3		12	12		23	4	
TNF- α (D)	baixa		66	14	NS	35	27	NS	67	13	NS
	alta		23	3		12	11		22	4	
IFN- γ (R)	baixa		28	5	NS	16	10	NS	27	6	NS
	intermediária		50	10		25	21		51	9	
	alta		13	3		7	8		15	1	
IFN- γ (D)	baixa		30	5	NS	15	12	NS	29	6	NS
	intermediária		46	10		26	19		45	11	
	alta		13	2		6	7		15	0	
IL-6 (R)	baixa		4	1	NS	1	3	0,04	5	0	NS
	alta		87	17		47	36		88	16	
IL-6 (D)	baixa		8	1	NS	1	5	0,05	9	0	NS
	alta		81	16		46	33		80	17	
IL-10 (R)	baixa		34	6	NS	18	16	NS	35	5	NS
	intermediária		43	10		23	9		44	9	
	alta		14	2		7	4		14	2	
IL-10 (D)	baixa		33	7	NS	15	15	NS	36	4	NS
	intermediária		37	9		22	18		38	8	
	alta		19	1		10	5		15	5	
TGF- β 1 (R)	baixa		6	0	NS	3	1	NS	6	0	NS
	intermediária		13	4		4	9		15	2	
	alta		72	14		41	29		72	14	

TGF-β1 (D)	baixa	7	0	NS	4	2	NS	5	2	NS
	intermediária	17	5		10	8		21	1	
	alta	65	12		33	28		63	14	

Análise univariada de Cox.

a



b

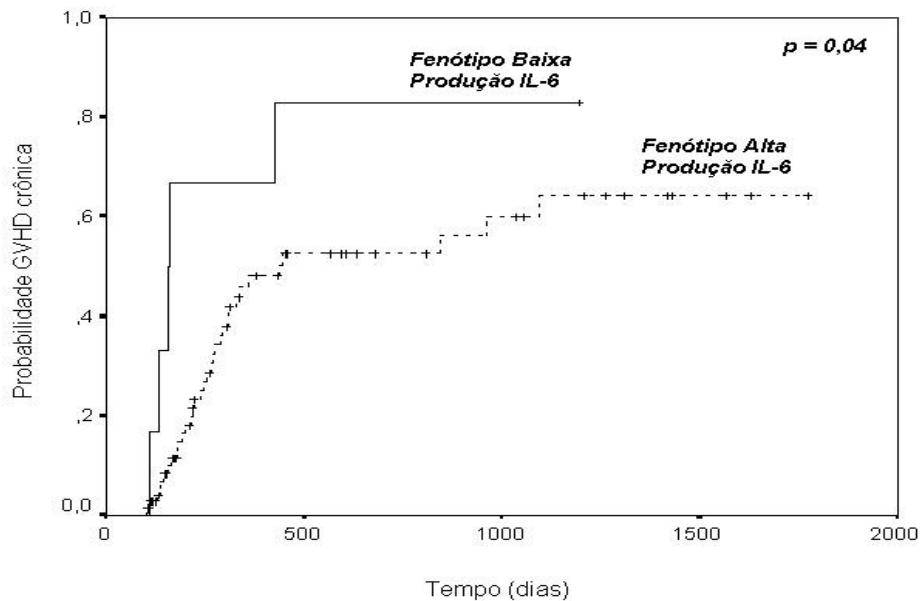


Figura 7. Incidência acumulada da doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD) crônica, seguindo o transplante de células progenitoras hematopoiéticas, em função do genótipo relativo à produção de IL-6 do receptor (a) e do

Neste estudo foram avaliados os níveis séricos de sIL-2R, TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 e TGF- β 1 em amostras de soro de 13 dentre 118 pacientes que se submeteram ao transplante. Para avaliar o efeito do tratamento utilizado no condicionamento destes pacientes e a cinética da produção após o transplante, as citocinas foram dosadas nos períodos pré-condicionamento, pós-condicionamento e, semanalmente, até a 15ª semana após o transplante, ou até a morte do paciente ou reinfusão de células do doador.

Na fase pré-transplante, foi avaliada a influência da doença hematológica de base e do desenvolvimento de GVHD aguda nos níveis de citocinas. Enquanto que, na fase pós-transplante foi analisada a influência da GVHD aguda e de infecções virais.

Foram consideradas como GVHD aguda somente as manifestações com graus II a IV. Entre os 13 pacientes estudados, 5 desenvolveram GVHD aguda, 5 tiveram infecções virais e todos apresentaram infecções bacterianas.

O período de “pega” do enxerto ficou compreendido entre a 2^a e 4^a semana após o transplante. As manifestações clínicas da GVHD aguda surgiram a partir da terceira semana e da GVHD crônica a partir da 14^a semana.

4.4.1. Níveis de Citocinas nos Períodos Pré e Pós-Condicionamento

Durante a fase de pré-condicionamento, de todas as citocinas avaliadas, apenas TGF- β 1 mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$), de acordo com o tipo de doença hematológica. Entre 9 pacientes com leucemia mielóide crônica ou aguda, o nível médio de TGF- β 1 foi $42,3 \pm 6,5$ ng/mL e entre 4 pacientes com anemia aplástica grave foi $1,0 \pm 0,3$ ng/mL.

Em relação ao desenvolvimento de GVHD aguda, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação a todas as citocinas avaliadas no período pré-condicionamento.

No período pós-condicionamento, os níveis médios de todas as citocinas avaliadas não foram diferentes quando comparados aos obtidos na fase pré-condicionamento. Em apenas 2 pacientes foi observado aumento de TNF- α e IL-6, todavia, este aumento não foi associado com o desenvolvimento de GVHD aguda no período pós-transplante.

4.4.2. Níveis de Citocinas no Período Pós-Transplante

Na Tabela 5, estão expressos os níveis médios de cada citocina durante as 15 avaliações realizadas no período pós-transplante, do grupo constituído por 5

pacientes que desenvolveram GVHD aguda e do grupo de 8 pacientes que não desenvolveram a doença.

Tabela 5. Nível sérico médio de citocinas no período compreendido entre a 1^a e a 15^a semana pós-transplante de células progenitoras hematopoiéticas, em pacientes com e sem desenvolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD) aguda.

Citocinas	Sem GVHD aguda		Com GVHD aguda		P
	N=8		N=5		
	Média	Desvio	Média	Desvio	
sIL-2R	541,1 µg/ml	17,3 µg/ml	776,4 µg/ml	65,5 µg/ml	<0,01
TNF-α	70,2 µg/ml	10,9 µg/ml	71,9 µg/ml	9,8 µg/ml	NS
IFN-γ	4,7 µg/ml	1,5 µg/ml	3,9 µg/ml	1,8 µg/ml	NS
IL-6	22,9 µg/ml	5,4 µg/ml	58,9 µg/ml	21,3 µg/ml	NS
IL-10	2,5 µg/ml	1,2 µg/ml	10,9 µg/ml	3,3 µg/ml	<0,05
TGF-β1	13,2 ηg/mL	1,4 ηg/mL	12,4 ηg/mL	1,9 ηg/mL	NS

Como pode ser observado na Tabela 5, entre todas as citocinas avaliadas, somente o nível sérico médio de sIL-2R e IL-10 apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos com e sem o desenvolvimento de GVHD aguda no período pós-transplante (1^a a 15^a semana). Todavia, variações temporais importantes também ocorreram com as demais citocinas. Assim, a cinética de cada citocina será comentada, separadamente, a seguir.

4.4.3. Cinética dos Níveis Séricos de Citocinas no Período Pós-Transplante

Na Figura 8, está representada a cinética dos níveis médios de cada citocina observados em cada tempo estudado, incluindo os períodos pré e pós-condicionamento. Os círculos fechados representam as médias das dosagens do

grupo de pacientes que desenvolveu GVHD aguda e os círculos abertos representam as médias das dosagens do grupo que não desenvolveu a doença.

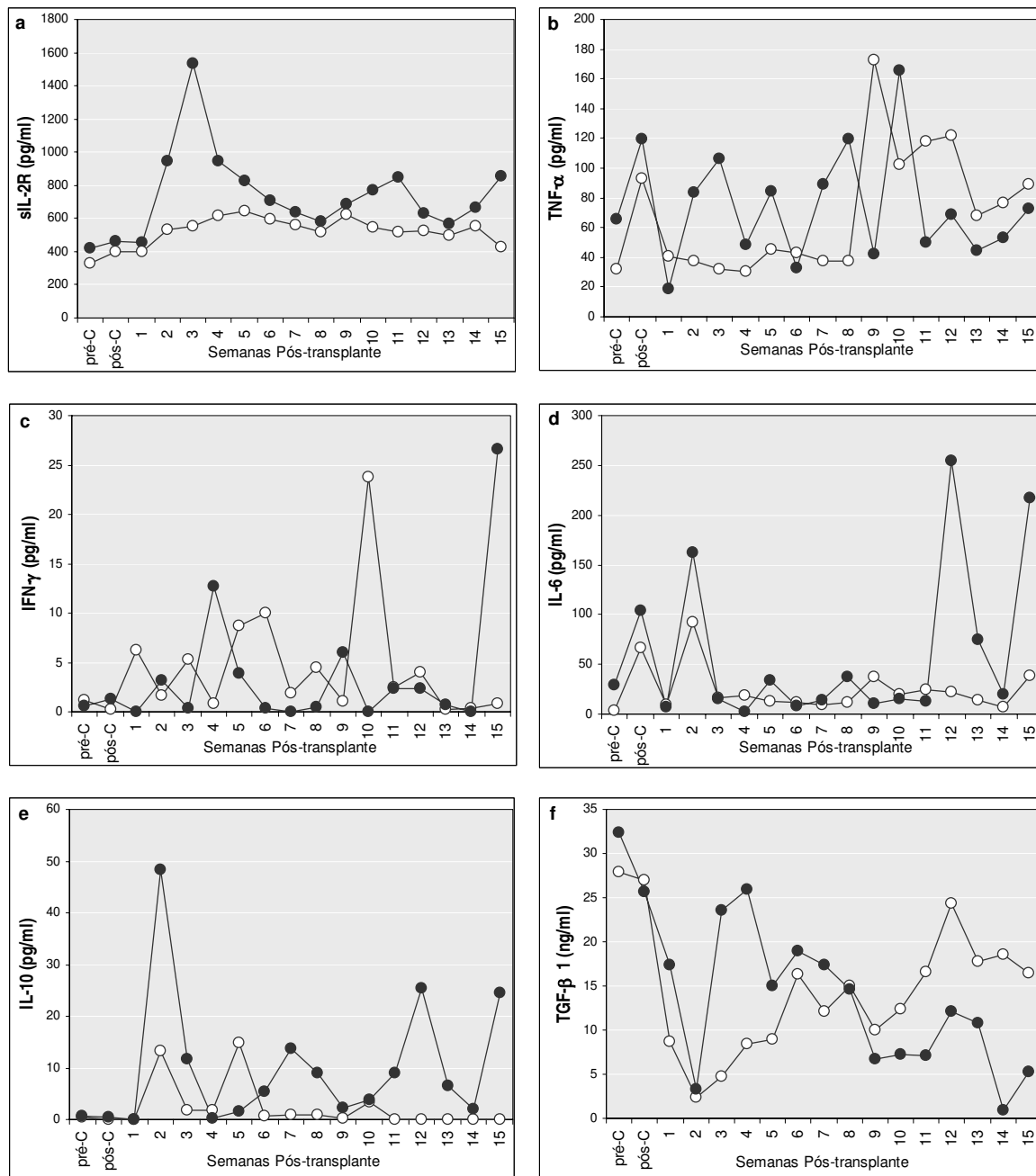


Figura 8. Cinética dos níveis de sIL-2R (a), TNF-α (b), IFN-γ (c), IL-6 (d), IL-10 (e) e TGF-β1 (f) no soro de pacientes com GVHD aguda de graus II a IV (círculos fechados) e sem GVHD aguda (círculos abertos), nos períodos pré-condicionamento (pré-C), pós-condicionamento (pós-C) e pós-transplante.

4.4.3.1. Cinética dos Níveis Séricos de sIL-2R

Ao analisar a figura 8-a, podemos observar que o aumento de sIL-2R coincidiu com o período de “pega” do enxerto, isto é, entre a 2^a e 4^a semana, quando a concentração de neutrófilos e plaquetas periféricas atingiu níveis aceitáveis pré-definidos (descritos em métodos) e com o período da manifestação da doença GVHD aguda, isto é, a partir da 3^a semana, até a 12^a semana pós-transplante. Deve-se ressaltar que, uma vez detectada clinicamente a doença, os pacientes receberam doses adicionais de terapia imunossupressora, o que teria contribuído para que os níveis de sIL-2R caíssem em determinados períodos pós-transplante. No entanto, estes níveis parecem aumentar novamente e podem refletir a persistência da doença em alguns indivíduos. A comparação entre os níveis médios de sIL-2R, correspondentes ao período de manifestação de GVHD, mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) entre o grupo que desenvolveu a doença ($926,4 \pm 142,5$ $\mu\text{g/mL}$) e o grupo sem manifestação da doença ($496,5 \pm 48,7$ $\mu\text{g/mL}$).

A Figura 9 compara os níveis médios de sIL-2R dos grupos com e sem GVHD aguda graus II a IV, nos períodos pré e pós-condicionamento e nos períodos de “pega” e pós-“pega” do enxerto. Ambos os grupos mostraram um incremento no nível de sIL-2R a partir da “pega” do enxerto, porém, este aumento foi estatisticamente maior ($p < 0,01$) no tempo de “pega” do enxerto no grupo que desenvolveu GVHD aguda ($1.165,0 \pm 179,2$ $\mu\text{g/mL}$) quando comparado com o grupo que não desenvolveu a doença ($578,0 \pm 47,2$ $\mu\text{g/mL}$).

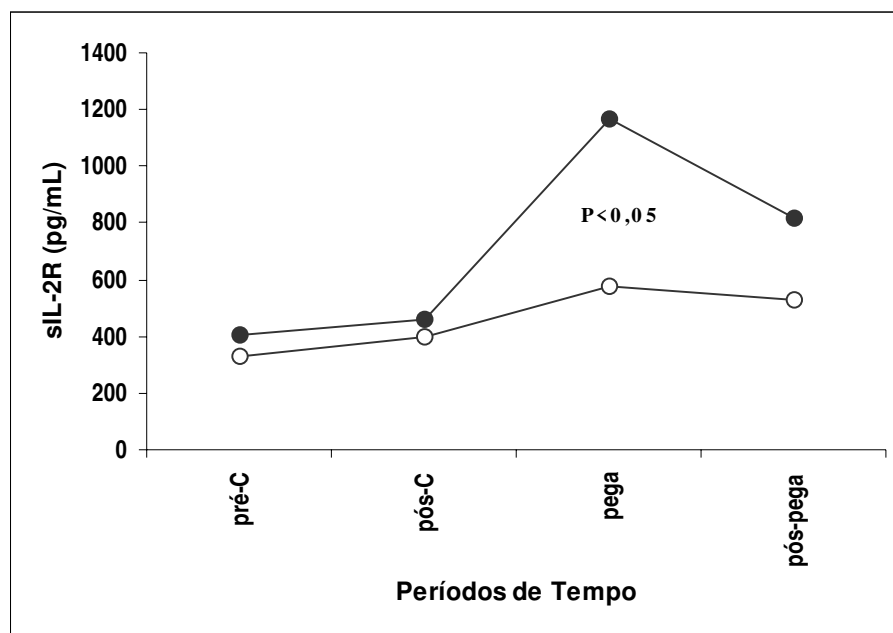


Figura 9. Níveis de sIL-2R no soro de 13 pacientes recebendo transplante de células progenitoras hematopoiéticas, medidos em 4 períodos de tempo. Os pacientes foram agrupados de acordo com a ocorrência (círculos fechados) ou ausência (círculos abertos) de GVHD aguda de graus II a IV. Os níveis de sIL-2R foram combinados para comparar as diferenças em cada período de tempo. Em pacientes com GVHD aguda, houve significantes diferenças, como segue: pré-condicionamento (pré-C) vs. “pega” ($p < 0,01$) e pós-condicionamento (pós-C) vs. “pega” ($p < 0,05$). Em pacientes sem GVHD aguda, houve significantes diferenças, como segue: pré-condicionamento vs. “pega” ($p < 0,01$), pós-condicionamento vs. “pega” ($p < 0,05$) e pré-condicionamento vs. pós-”pega” ($p < 0,01$). Os grupos com e sem GVHD aguda mostraram uma significantes diferença dos níveis de sIL-2R no período de “pega” ($p < 0,05$).

4.4.3.2. Cinética dos Níveis Séricos de TNF- α

O seguimento dos pacientes no pós-transplante permitiu observar que, embora picos de TNF- α tenham sido vistos em pacientes que desenvolveram GVHD aguda e crônica e rejeição, eles não puderam ser associados especificamente a GVHD aguda (Tabela 5). Além disso, os níveis de TNF- α , nos grupos com e sem GVHD aguda, não diferiram ao tempo da GVHD aguda, nem quando comparados nos períodos de pré-condicionamento, pós-condicionamento, “pega” e pós-“pega” do enxerto.

No entanto, a cinética dos níveis médios desta citocina, representada na Figura 8-b, mostra que, entre a 2^a e a 8^a semana, os picos de TNF- α foram maiores no grupo que desenvolveu a GVHD aguda, que naquele que não manifestou a doença ($72,7 \pm 2,6$ $\mu\text{g/mL}$ vs. $38,1 \pm 1,7$ $\mu\text{g/mL}$; $p < 0,01$). Após este período de tempo, esta diferença não se manteve, pois picos desta citocina também apareceram no grupo sem a doença, talvez devido àqueles pacientes que desenvolveram GVHD crônica e rejeição. Realmente, as médias dos níveis de TNF- α no pós-transplante foram maiores nos indivíduos que desenvolveram complicações pós-transplante (GVHD aguda e crônica e rejeição) que naqueles que não desenvolveram ($88,9 \pm 10,9$ vs. $37,5 \pm 3,4$; $p < 0,001$).

4.4.3.3. Cinética dos Níveis Séricos de INF- γ

Os níveis médios de INF- γ não diferiram entre os grupos com e sem GVHD aguda conforme mostra a Tabela 5. Além disso, as análises estatísticas mostraram que os níveis de INF- γ não foram diferentes entre os grupos ao tempo da GVHD aguda e nem quando os períodos de pré-condicionamento, pós-condicionamento, “pega” e pós-“pega” do enxerto foram analisados.

A cinética dos níveis médios desta citocina, avaliada nos grupos com e sem manifestação de GVHD aguda, está representada na Figura 8-c.

4.4.3.4. Cinética dos Níveis Séricos de IL-6

Os níveis de IL-6 em indivíduos que desenvolveram GVHD aguda e naqueles sem a doença não foram estatisticamente diferentes, apesar da maior média ter sido observada no grupo com a doença (Tabela 5). Contudo, a cinética desta citocina (Figura 8-d) nos revela alguns picos em determinados momentos após o transplante. Numa análise individual dos pacientes, também foi observado um aumento de IL-6 em alguns pacientes no momento da manifestação de crises de GVHD crônica e de rejeição. Todavia, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com e sem manifestação destas complicações.

Quando a análise levou em consideração os quatro períodos de tempos (pré-condicionamento, pós-condicionamento, “pega” e pós-”pega”) ou o tempo da manifestação da GVHD aguda, também nenhuma associação pôde ser observada.

4.4.3.5. Cinética dos Níveis Séricos de IL-10

A análise estatística mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) nas médias obtidas durante o período pós-transplante. Os níveis médios observados foram $10,9 \pm 3,3$ pg/mL para o grupo com GVHD aguda e $2,5 \pm 1,2$ pg/mL para o grupo sem a doença. Esta diferença estatística não se manteve ao se restringir a análise aos períodos pré-condicionamento, pós-condicionamento, “pega” e pós-”pega” do enxerto, ao período de manifestação da GVHD aguda e nem mesmo com as ocorrências de GVHD crônica ou rejeição. Todavia, deve-se ressaltar que no grupo com GVHD aguda, 3 pacientes que morreram precocemente apresentaram aumento de IL-10 ao tempo da GVHD aguda. Um deles morreu com GVHD aguda e falha múltipla de órgãos, outro com GVHD aguda e infecção viral e outro com GVHD grave (grau IV). Dois pacientes que não mostraram um aumento destes níveis se mantiveram vivos, pelo menos até a elaboração deste relatório. Somente um paciente morreu com GVHD aguda e falha múltipla de órgãos sem mudanças nos níveis de IL-10. A cinética dos níveis médios de IL-10 dos grupos com e sem

manifestação de GVHD aguda está representada na Figura 8-e. Nesta, podem ser observados picos de IL-10 em vários momentos pós-transplante no grupo com GVHD aguda, inclusive muitas vezes coincidentes com os picos de sIL-2R.

4.4.3.6. Cinética dos Níveis Séricos de TGF- β 1

Na Figura 8-f está representada a cinética dos níveis médios de TGF- β 1 avaliada nos grupos com e sem manifestação de GVHD aguda.

A comparação das médias dos níveis relativos ao período de 15 semanas pós-transplante não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos

(Tabela 5). Porém, se forem considerados os períodos compreendidos entre a 2^a e a 8^a semana e entre a 9^a e a 15^a semana, podemos observar que os níveis de TGF- β 1 se apresentaram de maneira distinta e antagônica entre os dois grupos.

O nível de TGF- β 1 diminuiu drasticamente após o transplante e começou a aumentar após a 3^a semana em todos os pacientes. É interessante destacar que, no grupo de pacientes que não desenvolveu GVHD, a recuperação dos níveis foi mais lenta e, até o fim do período de estudo, se mostrou bem próxima dos parâmetros observados no pré-condicionamento. Já, no grupo que desenvolveu GVHD aguda, a recuperação foi mais rápida e o pico máximo coincidiu com a “pega” do enxerto e com os picos de sIL-2R, precedendo a GVHD aguda. Todavia, nestes pacientes, o nível de TGF- β 1 voltou a cair a partir da 9^a semana e se manteve assim, até o fim do estudo.

A comparação das médias dos níveis de TGF- β 1 nos grupos com ($17,0 \pm 2,4$ ng/mL) e sem ($10,3 \pm 1,8$ ng/mL) GVHD aguda, relativas ao período compreendido entre a 1^a e 8^a semana e aquelas observadas nos grupos com ($7,1 \pm 1,3$ ng/mL) e sem ($16,5 \pm 1,7$ ng/mL) GVHD aguda, entre a 9^a e 15^a semana mostrou diferenças estatisticamente significantes, em ambos os períodos de tempo ($p < 0,05$).

4.5. NÍVEIS DE CITOCINAS EM PACIENTES COM INFECÇÕES BACTERIANAS E VIRAIS SEGUINDO O TRANSPLANTE ALOGÊNICO

Como todos os pacientes desenvolveram infecções bacterianas seguindo o transplante, não foi possível verificar se havia uma correlação entre os níveis de citocinas e as manifestações destas infecções.

Contudo, a média dos níveis de IFN- γ foi significativamente maior em pacientes que apresentaram infecções virais, comparada à média naqueles sem a infecção ($8,8 \pm 2,7$ pg/ml vs. $1,5 \pm 0,6$ pg/ml; $p= 0,01$). Outras citocinas não foram associadas com infecções neste estudo.



5. DISCUSSÃO

Este estudo nasceu da necessidade de desenvolver técnicas laboratoriais capazes de prever reações de rejeição e/ou GVHD, complicações ainda comuns após o transplante de medula óssea alogênico. A compatibilidade dos principais antígenos de histocompatibilidade do sistema HLA, entre os irmãos que realizam o transplante, muitas vezes não é suficiente para evitar essas complicações graves. Disparidades nos antígenos de histocompatibilidade secundários HA-1 podem também estar envolvidas no desenvolvimento de GVHD (GOULMY *et al.*, 1996; TSENG *et al.*, 1999). Outra possibilidade é que mecanismos de tolerância imunológica pós-transplante, incluindo mecanismos supressores, possam influenciar o desenvolvimento de GVHD (TSOI *et al.*, 1981).

5.1. AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE CULTURA MISTA DE LINFÓCITOS POTENCIALIZADA PELO USO DE CITOCINAS EXÓGENAS

Uma das técnicas utilizadas na rotina de investigação de compatibilidade entre o doador e o receptor é a cultura mista de linfócitos (CML), a qual permite a avaliação da capacidade estimulatória de produtos de genes classe II. Com o advento de técnicas de biologia molecular para tipagem destes alelos de classe II, o teste de CML clássico tem sido abandonado. Embora, em nossa análise, as respostas em CML clássica puderam ser associadas ao desenvolvimento de GVHD crônica (VISENTAINER *et al.*, 2002), sua utilidade para prever GVHD aguda em transplantes entre irmãos HLA-idênticos tem sido questionada (LIM *et al.*, 1988; van DER MEER *et al.*, 1998). Em nosso estudo, o risco relativo (RR) de desenvolver GVHD crônica foi de 2,5 para pacientes com resposta relativa do doador (DRR) na CML maior que 4,5%. A falta de correlação entre as respostas em CML clássica e o desenvolvimento de GVHD aguda poderia em parte ser explicada pela falta de sensibilidade deste teste.

Alguns autores reportaram que o pré-tratamento de células estimuladoras com IL-4 e IFN- γ resultou em CML positiva entre pares de pacientes e doadores HLA-idênticos (BISHARA *et al.*, 1994). Na comparação com o método clássico de CML, em nossos testes preliminares, o emprego destas citocinas não conseguiu

melhorar as respostas. Esta discrepância poderia ser parcialmente explicada pelo fato de que, em nossos experimentos, os indivíduos eram normais e também não-aparentados. Então, é possível que antígenos do CPH estivessem já expressos em alta concentração. Apesar disso, o índice de estimulação costuma ser maior entre pessoas não-aparentadas que entre pessoas aparentadas e, portanto, o uso de citocinas exógenas não faria diferença. Embora IFN- γ tenha sido descrito como um bom indutor de antígenos de histocompatibilidade de classe I, seu papel, com relação aos de classe II, é controverso. Alguns autores descreveram que IFN- γ , sozinho, não estimula a expressão destes antígenos em algumas linhagens de células T (GERRARD *et al.*, 1988). Então, o sinergismo entre IFN- γ e outras citocinas poderia ser necessário para obter este efeito.

Apesar do aumento das respostas autólogas, a suplementação do meio de cultura com IL-4 ou IL-2 pareceu ser mais promissora. Então, para os pares receptor-doadores de medula óssea, foi decidido usar as doses de 100 $\eta\text{g/mL}$ e 10 $\eta\text{g/mL}$, respectivamente para IL-4 e IL-2, com as quais foi encontrado um aumento das respostas alogênicas com um mínimo de interferência nas autólogas.

Nas culturas de células de pacientes e doadores, IL-2 aumentou mais as respostas autólogas que as alogênicas. Outros autores também obtiveram aumento da resposta autóloga com a adição de IL-2 humana às culturas (BISHARA *et al.*, 1994). A expressão do receptor de IL-2 costuma variar de acordo com o estágio de ativação da célula: células não ativadas expressam diferentes receptores de IL-2 quando comparadas à forma ativada, e IL-2, por si próprio, interfere na mudança da forma do receptor (PEROLA *et al.*, 2000). Embora esta mudança costume ser dirigida pelo antígeno, foi observada uma proliferação celular na ausência de células alogênicas em nossos experimentos. Conseqüentemente, outros estímulos devem estar presentes. Uma origem provável destes antígenos pode ter sido o soro usado para suplementar o meio de cultura. De fato, em nossa prévia experiência laboratorial, usando soro bovino fetal, o nível de proliferação de respostas autólogas foi maior. Por outro lado, nós também comentamos que as respostas entre indivíduos normais não-aparentados não foram afetadas pela adição de IL-4

ou IL-2, provavelmente porque o estímulo foi forte o suficiente para induzir a resposta máxima em CML e o efeito do soro foi mascarado. Na verdade, em vários casos, os níveis de cpm foram menores quando IL-2 foi adicionada à cultura. Sabe-se que a estimulação crônica de células T leva à liberação de receptores de IL-2 e estes podem se ligar a IL-2 livre, prevenindo sua interação com as células. A própria IL-2 parece estar envolvida nesta liberação de receptores (DEGIANNIS *et al.*, 1991). Além disso, a produção de várias citocinas, normalmente, acontece *in vitro* e algumas delas poderiam prevenir a proliferação celular (DANZER *et al.*, 1994). Altas doses de IL-2 e o longo período de incubação poderiam induzir a liberação de receptores de IL-2 e antagonistas de citocinas. Estes eventos poderiam explicar as baixas respostas quando comparadas às das culturas clássicas, nas quais a quantidade de IL-2 é limitada pela produção *in vitro*.

Dentre os quatro ensaios propostos aqui, para aumentar a sensibilidade da CML, a suplementação do meio com IL-4 trouxe o melhor resultado, uma vez que células dos pacientes e doadores tiveram maior proliferação que no método padrão, frente à maioria das células estimuladoras. Outros autores também relataram resultados semelhantes (BISHARA *et al.*, 1994). E, apesar de IL-4 também ter aumentado as respostas autólogas, isso ocorreu de uma forma menos intensa, em relação a IL-2.

No entanto, com esta perda de especificidade, concluiu-se que a CMLp não trouxe vantagens adicionais ao método clássico, nem mesmo com a adição de IL-4, pelo menos em casos de doadores aparentados.

5.2. CORRELAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DE GENES REGULADORES DE CITOCINAS COM O DESENVOLVIMENTO DE REAÇÕES DE REJEIÇÃO E GVHD

Prévios estudos têm elucidado e analisado polimorfismos em regiões reguladoras de genes de citocinas inflamatórias e antiinflamatórias e têm mostrado ou confirmado a correlação entre diferenças na seqüência de genes e a expressão

fenotípica (WILSON *et al.*, 1997; TURNER *et al.*, 1997a; AWAD *et al.*, 1998; FISHMAN *et al.*, 1998; PRAVICA *et al.*, 1999). Além disso, estes polimorfismos têm sido associados ao desenvolvimento de rejeição pós-transplante de órgãos sólidos (TURNER *et al.*, 1997b; AWAD *et al.*, 1998; SANKARAN *et al.*, 1999; HAHN *et al.*, 2001; REVIRON *et al.*, 2001; POLI *et al.*, 2001; GEORGE *et al.*, 2001; FERNANDES *et al.*, 2002) e GVHD após o transplante de células progenitoras hematopoiéticas (MIDDLETON *et al.*, 1998; CAVET *et al.*, 1999; CAVET *et al.*, 2001; LEFFELL *et al.*, 2001; TAMBUR *et al.*, 2001; SOCIÉ *et al.*, 2001; DICKINSON *et al.*, 2001).

No presente estudo, as análises dos polimorfismos de genes reguladores de TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 e TGF- β 1 e de sua possível influência no curso clínico pós-transplante de células progenitoras hematopoiéticas demonstraram que, o genótipo de IL-6, correspondente à baixa produção desta citocina, foi associado com uma maior incidência de GVHD crônica. Enquanto, nenhum dos polimorfismos estudados pôde ser associado com a ocorrência de GVHD aguda ou falha do enxerto mais rejeição.

Alguns autores têm relatado correlações do genótipo de TNF- α ³⁰⁸, referente à alta produção de TNF- α , com o risco aumentado de GVHD aguda em transplantes de medula (TAKAHASHI *et al.*, 2000). No entanto, os resultados obtidos neste e em outros estudos mostraram que o polimorfismo TNF- α ³⁰⁸ não havia influenciado na incidência de GVHD (MIDDLETON *et al.*, 1998; TAMBUR *et al.*, 2001; SOCIÉ *et al.*, 2001 e LEFFELL *et al.*, 2001). Uma explicação para esta falta de associação poderia ser o fato que, o tratamento com ciclosporina, usada na profilaxia da GVHD, removeria a resposta de alta produção de TNF- α vista em indivíduos com o genótipo TNF- α ³⁰⁸ de alto produtor, possivelmente devido à interrupção da regulação da transcrição de TNF- α em células T e macrófagos (SCHREIBER *et al.*, 1992; McCAFFREY *et al.*, 1994).

O polimorfismo IFN- γ ⁸⁷⁴ no *intron* 1 tem sido associado aos níveis de produção desta citocina (PRAVICA *et al.*, 1999). CAVET *et al.* (2001) descreveram um aumento na incidência das formas mais graves de GVHD aguda em pacientes

com o genótipo de IFN- γ^{+874} responsável pela produção de níveis altos desta citocina. No entanto, a falta de correlação destes genótipos com a ocorrência de GVHD aguda foi relatada por SOCIÉ *et al.* (2001) e confirmada neste presente estudo.

Estudos dos polimorfismos de IL-10^{-1082,-819,-592}, os quais têm sido correlacionados com os níveis de produção de IL-10, têm mostrado resultados contraditórios. Em transplantes de células progenitoras hematopoiéticas, entre irmãos HLA compatíveis, alguns autores mostraram um risco aumentado de GVHD aguda em receptores com genótipos referentes à baixa produção de IL-10 (MIDDLETON *et al.*, 1998; CAVET *et al.*, 1999), enquanto outros relacionaram o genótipo referente à alta produção de IL-10 ao risco aumentado de GVHD aguda (SOCIÉ *et al.*, 2001) ou crônica (TAKAHASHI *et al.*, 2000). No presente estudo, nenhuma correlação entre estes genótipos e o desenvolvimento de GVHD aguda ou crônica pôde ser estabelecida, em concordância com estudos recentes de TAMBUR *et al.* (2001) e LEFFEL *et al.* (2001).

TGF- β 1 é uma citocina multifuncional que controla a proliferação e diferenciação de muitos tipos de células. Esta citocina está também envolvida na produção de matriz extracelular e de colágeno, conseqüentemente, ela tem sido implicada no desenvolvimento de fibrose em tecidos transplantados (AWAD *et al.*, 1998). Polimorfismos do gene TGF- β 1 nas posições +869 e +915 têm sido associados com a produção desta citocina (AWAD *et al.*, 1998). O polimorfismo na posição +869 representa uma troca de um resíduo de aminoácido leucina por prolina no *codon* 10, enquanto o polimorfismo na posição +915 representa uma troca de um resíduo de aminoácido arginina por prolina no *codon* 25. A literatura ainda tem mostrado resultados conflitantes entre estes polimorfismos e a ocorrência de GVHD em transplantes alogênicos de medula. Alguns autores observaram associação entre uma alta expressão de TGF- β 1 e GVHD aguda (LEFFELL *et al.*, 2001). Outros relataram que 92% dos indivíduos com alta capacidade de expressão desta citocina não desenvolveram a doença, enquanto somente 25% dos pacientes com GVHD tinham esta habilidade (TAMBUR *et al.*,

2001). Entretanto, no presente estudo, não foi possível mostrar uma correlação genética do polimorfismo desta citocina com a ocorrência de GVHD ou rejeição.

CAVET *et al.* (2001) demonstraram que, receptores com genótipo referente à produção intermediária de IL-6 apresentavam uma forte tendência ao desenvolvimento de GVHD aguda, enquanto receptores e doadores com genótipo de alta produção tinham uma maior incidência de GVHD crônica. Neste mesmo ano, SOCIÉ *et al.* (2001) relataram que o genótipo, correspondente à alta produção de IL-6, foi associado com a incidência aumentada de GVHD crônica, mas não de GVHD aguda. Nossos resultados foram contraditórios a estes estudos, pois o genótipo IL-6⁻¹⁷⁴CC do doador e receptor, referente à baixa produção de IL-6, foi associado ao desenvolvimento de GVHD crônica no grupo de pacientes avaliados.

Todavia, é importante ressaltar que, em transplantes renais, o genótipo IL-6⁻¹⁷⁴CC de doadores foi identificado como um fator de risco para a ocorrência de rejeição (MARSHAL *et al.*, 2001) e foi associado ao risco aumentado de perda do enxerto (MÜLLER-STEINHARDT *et al.*, 2002).

Interleucina-6 é uma citocina pleiotrópica com um papel central na defesa imunológica. Embora, inicialmente, ela tenha sido descrita como uma citocina pró-inflamatória, recentemente, tem sido reconhecido que ela possui propriedades antiinflamatórias e imunossupressoras adicionais (TILG *et al.*, 1997). O papel de IL-6 na diferenciação de linfócitos-T auxiliares tem sido discutido (DIEHL e RINCON, 2002) e poderia esclarecer a sua participação nos mecanismos imunológicos envolvidos na patogênese da GVHD crônica.

Embora uma correlação da habilidade genética de produzir baixos níveis de IL-6 com GVHD crônica tenha sido encontrada neste estudo, ela deve ser melhor investigada, já que o número de indivíduos com esta habilidade é muito pequeno na população deste estudo (6,5%).

A variação individual da resposta imune a transplantes é, pelo menos em parte, devido à variação genética na regulação da expressão dos genes de citocinas.

Contudo, as interpretações destas correlações devem ser cuidadosas, pois cada indivíduo pode ser caracterizado como alto ou baixo produtor de uma determinada citocina, independentemente de outra. E, dependendo de certas combinações de genes de citocinas, as respostas a transplantes podem variar entre os indivíduos. É provável que um único polimorfismo não afete significativamente o curso do transplante sozinho, mas particulares combinações podem ser mais importantes. E, a alta produção de uma citocina pró-inflamatória pode ser contrabalançada pela alta produção de uma citocina antiinflamatória.

Além disso, outros fatores intrínsecos e extrínsecos do indivíduo também podem influenciar nesta resposta, como a idade e o sexo do receptor e doador, tipo de enxerto, profilaxia da GVHD, condicionamento pré-transplante, fase da doença ao transplante e outros. Além disso, é preciso levar em consideração o tipo de tecido onde estas reações acontecem, pois um determinado tecido pode ser mais sensível à resposta humoral e outro à celular, as quais estão sob influência de diferentes citocinas. Embora, a síntese de citocinas possa estar sob controle genético, uma desregulação na produção de citocinas pode gerar conseqüências patológicas graves, como é o caso dos transplantes de medula óssea. Então, embora a habilidade genética de produção de uma citocina possa influenciar no curso do transplante, outros fatores capazes de alterar esta produção podem ser mais importantes em determinar a ocorrência de GVHD e/ou rejeição.

Certamente, o uso de perfis de genótipos de citocinas para guiar a imunossupressão ainda requer extensas pesquisas, mesmo em transplantes de rim e coração, onde certos genótipos parecem prever quais pacientes estariam mais aptos a desenvolver episódios de rejeição aguda. Contudo, a determinação do genótipo de citocinas pode ser realizada em análises retrospectivas. A metodologia é simples para qualquer laboratório de tipagem HLA realizar em paralelo com outros testes de histocompatibilidade e poderia fazer parte da rotina em muitos centros de transplante. Finalmente, estes resultados poderiam fazer parte de um

estudo multicêntrico envolvendo pacientes e doadores de diversas regiões brasileiras.

A associação de diferentes alelos de citocinas com a GVHD não tem sido extensivamente investigada, principalmente no Brasil. Desta forma, este estudo necessita ser confirmado independentemente em outras populações. Além disso, outras associações alélicas com GVHD detectadas em outros estudos poderiam ser pesquisadas no Brasil.

5.3. CORRELAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS COM O DESENVOLVIMENTO DE GVHD AGUDA EM PACIENTES TRANSPLANTADOS

As nossas análises demonstraram que a quantificação de citocinas no período pré e pós-condicionamento não foi útil para a previsão do desenvolvimento de GVHD aguda.

Contudo, em pacientes que desenvolveram GVHD aguda, as concentrações séricas médias pós-transplante de sIL-2R e IL-10 foram maiores que aquelas observadas no grupo que não desenvolveu a doença.

Níveis séricos elevados de sIL-2R têm sido reportados em indivíduos com GVHD aguda após transplante alogênico por vários pesquisadores (MIYAMOTO *et al.*, 1996; KOBAYASHI *et al.*, 1997; GRIMM *et al.*, 1998; FOLEY *et al.*, 1998; KOBAYASHI *et al.*, 1999; CHANG *et al.*, 1999; MATHIAS *et al.*, 2000; KAMI *et al.*, 2000; NAKAMURA *et al.*, 2000). Além disso, anticorpos monoclonais anti-IL-2R têm mostrado eficiência no tratamento da GVHD aguda em humanos (CUTHBERT *et al.*, 1992; OZSAHIN *et al.*, 1998). No presente estudo, os níveis de sIL-2R no período de “pega” do enxerto foram melhor associados ao desenvolvimento de GVHD aguda e estão de acordo com prévios estudos (MIYAMOTO *et al.*, 1996; FOLEY *et al.*, 1998; KOBAYASHI *et al.*, 1999). Segundo KOBAYASHI *et al.* (1999), este fenômeno pode ser devido à administração de G-CSF (do inglês: *granulocyte colony-stimulating factor*), o qual pareceu estimular a liberação de sIL-2R por ativação direta ou mediada indiretamente via células

respondedoras. Contudo, neste estudo, fatores de crescimento não foram usados após a transplantação no grupo de pacientes. Desta forma, outros fatores podem ser responsáveis pela liberação de sIL-2R no soro, normalmente infecções durante o período granulocitopênico (FOLEY *et al.*, 1998), síndrome da “pega” (SPITZER, 2001) e ativação imune durante a GVHD aguda. Neste estudo, o aumento de sIL-2R após o transplante não foi relacionado a infecções bacterianas e virais. Várias citocinas são também conhecidas como necessárias para a “pega” do enxerto após o transplante, como IL-2, TNF- α e IFN- γ (FLEISCHMANN *et al.*, 1991), e estas também podem estar envolvidas no desenvolvimento de GVHD aguda. TAKATSUKA *et al.* (2000) reportaram um aumento de citocinas, durante a fase de “pega” do enxerto, em pacientes que desenvolveram complicações após o transplante. Em nosso estudo, o aumento de sIL-2R ocorreu em paralelo com o início da “pega” hematopoiética em ambos os grupos. Todavia, os níveis de sIL-2R em pacientes com GVHD aguda foram maiores que aqueles em pacientes sem a doença. Assim sendo, a concentração de sIL-2R seguindo a transplantação provavelmente reflete a magnitude da ativação das células T derivadas do doador. Em pacientes que desenvolveram GVHD aguda graus II-IV, esta ativação deve ser mais intensa e, conseqüentemente, o aumento de sIL-2R também. Assim, níveis séricos mais elevados de sIL-2R no período de “pega” podem ser indicativos de GVHD aguda.

TNF- α é um importante mediador de lesões teciduais durante a rejeição de enxertos e GVHD e, seu papel nas respostas alorreativas de células T tem sido demonstrado (IMAMURA *et al.*, 1994; REMBERGER *et al.*, 1995; KAYABA *et al.*, 2000; HUANG *et al.*, 2001). No presente estudo, quando os níveis pós-transplante de TNF- α foram comparados entre os grupos com e sem GVHD aguda, nenhuma correlação foi observada. Contudo, uma análise mais detalhada da cinética desta citocina revelou que, nas primeiras semanas após o transplante, TNF- α foi encontrado em níveis maiores no grupo que desenvolveu a GVHD aguda. KAYABA *et al.* (2000) também observaram um aumento desta citocina no grupo com GVHD aguda, durante as 7 primeiras semanas seguindo o transplante. Este fato pode ser devido à

participação desta citocina pró-inflamatória nas etapas iniciais da GVHD aguda. Também foi observado que os níveis de TNF- α no soro aumentaram em pacientes que mais tarde desenvolveram GVHD crônica e em pacientes que evoluíram para a perda do enxerto. HOLLER *et al.* (1990) também descreveram níveis aumentados de TNF- α precedendo as principais complicações do transplante, além da GVHD aguda. Estes resultados indicam um principal papel patofisiológico de TNF- α em complicações após o transplante. Assim, níveis altos desta citocina nas primeiras semanas pós-transplante podem ser indicativos de GVHD aguda, mas também podem ocorrer no pós-transplante precedendo complicações, como rejeição e GVHD crônica. TNF- α pode ser liberado dos tecidos do hospedeiro durante a lesão tecidual causada pelo condicionamento do transplante e após a transplantação induzido por outras citocinas. Respostas inflamatórias que ocorrem nestes processos podem ser responsáveis pela sua produção. Estudos sobre o regime de condicionamento têm mostrado a indução da liberação de TNF- α pela irradiação corporal total e/ou uso de ciclofosfamida. CLIFT *et al.* (1994) mostraram que a probabilidade de GVHD aguda foi maior em pacientes tratados com irradiação corporal total/ciclofosfamida que naqueles tratados com busulfan/ciclofosfamida devido à liberação de TNF- α , enquanto HOLLER *et al.* (1995) reportaram uma indução significativa de TNF- α pelo condicionamento com irradiação corporal total e ciclofosfamida quando comparado com busulfan. Neste estudo, embora níveis aumentados de TNF- α tenham sido encontrados no soro de dois pacientes após o regime de condicionamento com ciclofosfamida e busulfan, nossos dados não puderam confirmar o papel do condicionamento na liberação de citocinas. Este fato pode ser explicado pelo condicionamento sem irradiação corporal total e pela baixa capacidade de ciclofosfamida e busulfan na indução da liberação de TNF- α .

O papel de IFN- γ na expressão da GVHD é complexo. Níveis aumentados de IFN- γ têm sido observados no soro de pacientes com GVHD aguda, regeneração hematopoiética e infecções (NIEDERWIESER *et al.*, 1990; IMAMURA *et al.*, 1994; LANGE *et al.*, 1996). Contudo, nós não pudemos mostrar uma

associação entre os níveis de IFN- γ e GVHD aguda neste estudo. Resultados similares foram também reportados por SAKATA *et al.* (2001). Estudos com animais têm mostrado que embora IFN- γ tenha funções imunoestimulatórias, ele não parece essencial para a rejeição aguda de enxertos alogênicos em camundongos (STEIGER *et al.*, 1998). Altos níveis de IFN- γ foram associados a infecções virais neste estudo, confirmando seu papel imunológico nestas infecções.

A citocina IL-6 está envolvida em muitos aspectos da resposta inflamatória. Alguns estudos têm mostrado sua participação em complicações relacionadas ao transplante de medula (SYMINGTON *et al.*, 1992; SCHWAIGHOFER *et al.*, 1994; ABDALLAH *et al.*, 1997; LIEM *et al.*, 1998). Embora nossos dados não tenham mostrado uma associação entre os níveis de IL-6 e GVHD aguda, talvez devido ao baixo número de pacientes, a presença de níveis altos de IL-6 em pacientes que desenvolveram GVHD aguda e rejeição, sugere que IL-6 poderia indiretamente influenciar estas complicações por promover a ativação da resposta imune. Alternativamente, IL-6 poderia diretamente refletir os mecanismos envolvidos na doença. Além disso, pacientes que apresentaram uma elevação dos níveis de TNF- α no pós-condicionamento mostraram um aumento concomitante de IL-6. Este aumento pode corresponder à elevação de TNF- α , porque TNF- α pode contribuir na indução da produção de IL-6 em uma variedade de células (BROUCKAERT *et al.*, 1989). Ao contrário de resultados obtidos por SCHWAIGHOFER *et al.* (1994) e LIEM *et al.* (1998), os níveis de IL-6 não foram associados com infecções bacterianas e virais neste estudo.

Várias linhas de evidência têm estabelecido a importância de IL-10 na patogênese da GVHD aguda (REMBERGER *et al.*, 1997; HEMPEL *et al.*, 1997; LIEM *et al.*, 1998; TAKATSUKA *et al.*, 1999; BAKER *et al.*, 1999; HOLLER *et al.*, 2000; SAKATA *et al.*, 2001) e uma correlação entre IL-10 e o curso fatal em pacientes após o transplante tem sido reportada (HEMPEL *et al.*, 1997; BAKER *et al.*, 1999; TAKATSUKA *et al.*, 1999; SAKATA *et al.*, 2001). Nós confirmamos um aumento dos níveis de IL-10 associado com GVHD aguda e observamos que a

maioria dos pacientes que morreram com GVHD aguda e complicações tinha mostrado níveis aumentados desta citocina durante a GVHD. A principal função de IL-10 parece ser limitar e regular as respostas inflamatórias (MOORE *et al.*, 2001). A elevação de IL-10 em vários momentos pós-transplante pode ter ocorrido em resposta à liberação de citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-2. Além disso, seu papel na diferenciação de um novo tipo de célula T, a célula T regulatória, tem sido discutido, o qual pode figurar proeminentemente no controle da resposta imune e tolerância *in vivo* (LEVINGS *et al.*, 2001). Se o efeito imunossupressor de IL-10 é benéfico para GVHD permanece controverso, porque a alta produção de IL-10 poderia levar a uma imunodeficiência funcional e conseqüentemente ao desenvolvimento de graves complicações. Por outro lado, um estudo mostrou que IL-10 poderia inibir ou estimular células T CD8⁺, dependendo do tempo no qual as células estivessem expostas a IL-10 (GROUX *et al.*, 1998). IL-10 poderia inibir respostas imunes se presente ao mesmo tempo da exposição ao Ag, mas ela poderia falhar em suprimir respostas mediadas por células T CD8⁺ ativadas. Este fato poderia explicar porque altos níveis de IL-10, durante a fase efetora de GVHD aguda, falharam em controlar a progressão da doença neste estudo.

Após o transplante, níveis de TGF- β 1 caíram a baixos níveis e começaram a aumentar após a terceira semana do transplante. LIEM *et al.* (1999) também observaram esta cinética e uma forte correlação entre os níveis de TGF- β 1 e a contagem de plaquetas e neutrófilos. Baixos níveis pré-condicionamento de TGF- β 1 em pacientes com anemia aplástica neste estudo devem ser explicados pelas baixas contagens de plaquetas e neutrófilos nestes indivíduos. Além disso, nossos dados mostraram uma queda dos níveis de TGF- β 1 no grupo que desenvolveu GVHD aguda, após a 9^a semana do transplante. Estes resultados estão de acordo com IMAMURA *et al.* (1996), que encontraram um decréscimo na expressão de RNAm para TGF- β 1 em células mononucleares do sangue periférico durante a GVHD aguda. Recentemente, um estudo de polimorfismo genético mostrou que 92% dos pacientes sem GVHD eram bons produtores de TGF- β 1, enquanto 25% dos pacientes com a doença tinham a habilidade de secretar altos níveis (TAMBUR *et al.*, 2001). TGF- β 1 é uma citocina imunossupressora potente

que possui um importante papel regulador na resposta imune. Baixos níveis desta citocina podem não ser suficientes para suprimir a reatividade da célula T e outros tipos celulares, resultando em GVHD aguda. De fato, esta hipótese parece explicar a progressão da GVHD aguda em nosso grupo de pacientes.

Parece possível que todas estas citocinas devam combinar-se para causar progressão da GVHD de diferentes maneiras em cada indivíduo e um balanço entre estas citocinas pode ser importante no controle da GVHD.

Embora os níveis de sIL-2R, TNF- α , IL-10 e TGF- β 1, em determinados períodos pós-transplante, tenham sido correlacionados com GVHD aguda no nosso estudo, os níveis de sIL-2R no período de “pega” do enxerto parecem prover um parâmetro melhor para a detecção precoce de GVHD aguda após o transplante alogênico. Estes níveis aumentaram num período de tempo limitado e precedente à ocorrência de GVHD aguda. Futuros estudos com mais pacientes são necessários para determinar a importância destas citocinas na gravidade da GVHD.



6. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstra a viabilidade da execução de determinadas técnicas laboratoriais, com o objetivo de prever o desenvolvimento de GVHD e rejeição, após o transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas. As seguintes conclusões puderam ser formuladas:

1. Os procedimentos que envolveram a adição de IL-2 e IL-4 exógenas às culturas mistas de linfócitos foram capazes de aumentar a sensibilidade da cultura clássica, todavia um aumento das respostas autólogas também foi gerado, causando uma perda de especificidade. Desta forma, modificações da cultura clássica pela adição de citocinas não trariam vantagens em relação ao método clássico, pelo menos em casos de doadores aparentados.
2. A avaliação genética da capacidade de produção de citocinas do receptor e doador, empregando-se técnicas de genotipagem de alelos de citocinas, mostrou que somente o genótipo IL-6⁻¹⁷⁴CC, correspondente à baixa produção de IL-6, tanto do doador como do receptor, foi associado com o desenvolvimento de GVHD crônica.
3. O acompanhamento da produção de citocinas, no soro do receptor, após o transplante alogênico pela técnica de ELISA mostrou que, os níveis de sIL-2R, TNF- α , IL-10 e TGF- β 1 foram correlacionados com o desenvolvimento de GVHD aguda. Todavia, os níveis de sIL-2R no período de “pega” do enxerto puderam prover um parâmetro melhor para a detecção precoce de GVHD aguda, já que este período geralmente antecedeu os sintomas clínicos desta doença.

Desta forma, baseado em nossos resultados, o melhor teste prognóstico para GVHD aguda, em receptores de células HLA-compatíveis, seria a quantificação dos níveis séricos de sIL-2R no pós-transplante pelo método de ELISA. Mas, um monitoramento dos níveis séricos de sIL-2R, TNF- α , IL-10 e TGF- β 1 no pós-transplante poderia fornecer ao clínico um indicativo em relação ao risco de GVHD aguda e outras complicações, permitindo a otimização de terapêuticas

individualizadas apropriadas. Além disso, a quantificação dos níveis séricos de citocinas no pós-transplante poderia esclarecer a patogênese da GVHD e rejeição.

No caso da GVHD crônica, o melhor procedimento capaz de prever a sua ocorrência foi a genotipagem de IL-6⁻¹⁷⁴ do doador e do receptor de transplantes. No entanto, a correlação da habilidade genética de produzir baixos níveis de IL-6 com GVHD crônica e sua gravidade deve ser melhor investigada, já que a frequência de indivíduos com esta habilidade é muito pequena na população deste estudo.

Finalmente, nenhum dos métodos estudados se mostrou capaz de prever a falha do enxerto mais rejeição.

No futuro, novas análises dos níveis de sIL-2R, TNF- α , IL-10 e TGF- β 1 envolvendo um número maior de indivíduos e de genótipos destas e de outras citocinas poderão confirmar a capacidade destas metodologias em prever reações de rejeição e/ou GVHD em transplantes alogênicos de células progenitoras hematopoiéticas.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, A. N.; BOIRON, J. M.; ATTIA, Y.; CASSAIGNE, A.; REIFFERS, J.; IRON, A. Plasma cytokines in graft vs host disease and complications following bone marrow transplantation. **Hematol Cell Ther**, 39: 27-32, 1997.

AL-DACCAK, R.; LOISEAU, P.; SOULIE, A.; VARRIN, F.; RABIAN, C.; RAFFOUX, C. et al. HLA-DP genotyping in HLA-A, B, and DR identical intrafamilial bone marrow transplantation. **Leukemia**, 4(3): 222-6, 1990.

AWAD, M. R.; EL-GAMEL, A.; HASLETON, P.; TURNER, D. M.; SINNOTT, P. J.; HUTCHINSON, I. V. Genotypic variation in the transforming growth factor- β 1 gene. **Transplantation**, 66(8): 1014-20, 1998.

BAIN, B.; VAS, M. R.; LOWENSTEIN, L. The development of large immature mononuclear cells in mixed leukocyte cultures. **Blood**, 23(1): 108-16, 1964.

BAKER, K. S.; RONCAROLO, M. G.; PETERS, C.; BIGLER, M.; DEFOR, T.; BLAZAR, B. R. High spontaneous IL-10 production in unrelated bone marrow transplantation recipients is associated with fewer transplant-related complications and early deaths. **Bone Marrow Transplant**, 23: 1123-9, 1999.

BIGNON, J. D.; FERNANDEZ-VIÑA, M. A.; CHENEAU, M. L.; FAUCHET, R.; SCHREUDER, G. M. T.; CLAYTON, J. et al. HLA DNA class II typing by PCR-SSOP: 12th International Histocompatibility Workshop experience. In: CHARRON, D., Ed. **Genetic diversity of HLA Functional and Medical Implication**. Paris, France: EDK, 1997. p. 584-95.

BISHARA, A.; BRAUTBAR, C.; NAGLER, A.; SLAVIN, S.; LESHEM, B.; COHEN, I.; KEDAR, E. Prediction by a modified mixed leukocyte reaction assay of graft-versus-host disease and graft rejection after allogeneic bone marrow transplantation. **Transplantation**, 57(10): 1474-9, 1994.

BODMER, J. R.; MARSH, S. G.; ALBERT, E. D.; BODMER, W. F.; BONTROP, R. E.; CHARRON, D. et al. Nomenclature for factors of HLA system, 1996. **Tissue Antigens**, 49: 297-321, 1997.

BROUCKAERT, P.; SPRIGGS, D.R.; DEMETRI, G.; KUFÉ, D. W.; FIERS, W. Circulating interleukin-6 during a continuous infusion of tumor necrosis factor and interferon γ . **J Exp Med**, 169(6): 2257-62, 1989.

BUGAWAN, T. L.; BEGOVICH, A. B.; ERLICH, H. A. Rapid HLA-DPB typing using enzymatically amplified DNA and nonradioactive sequence-specific oligonucleotide probes. **Immunogenetics**, 32(4): 231-41, 1990.

CAVET, J.; DICKINSON, A. M.; NORDEN, J.; TAYLOR, P. R. A.; JACKSON, G. H.; MIDDLETON, P. G. IFN- γ and interleukin-6 gene polymorphisms associate with graft-versus-host disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation. **Blood**, 98(5): 1594-600, 2001.

CAVET, J.; MIDDLETON, P. G.; SEGALL, M.; NOREEN, H.; DAVIES, S. M.; DICKINSON, A. M. Recipient tumor necrosis factor- α and interleukin-10 gene polymorphisms associate with early mortality and acute graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplants. **Blood**, 94(11): 3941-6, 1999.

CHAMPLIN, R. E.; HOROWITZ, M. M.; van BEKKUM, D. W.; CAMITTA, B. M.; ELFENBEIN, G. E.; GALE, R. P. et al. Graft failure following bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: risk factors and treatment results. **Blood**, 73(2): 606-13, 1989.

CHANG, D. M.; WANG, C. J.; KUO, S. Y.; LAI, J. H. Cell surface markers and circulating cytokines in graft versus host disease. **Immunol Invest**, 28(1): 77-86, 1999.

CHARRON, D. J. HLA matching in unrelated donor bone marrow transplantation. **Curr Opin Hematol**, 3(6): 416-22, 1996.

CLIFT, R. A.; BUCKNER, C. D.; THOMAS, E. D.; BENSINGER, W. I.; ROWDEN, R.; BRYANT, E. et al. Marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia: A randomised study comparing cyclophosphamide and total body irradiation with busulphan and cyclophosphamide. **Blood**, 84: 2036-43, 1994.

COX, D. R. Regression models and life-tables (with discussions), series B. **J Royal Stat Soc**, 34: 184-7, 1972.

CUTHBERT, R. J., PHILLIPS, G. L., BARNETT, M. J., NANTEL, S. H., REECE, D. E., SHEPHERD, J. D. Anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody (BT 563) in the treatment of severe aGVHD refractory to systemic corticosteroid therapy. **Bone Marrow Transplant**, 10: 451-5, 1992.

DANZER, S. G.; KIRCHNER, H.; RINK, L. Cytokine interactions in human mixed lymphocyte culture. **Transplantation**, 57: 1638-42, 1994.

DeGAST, G. C.; MICKELSON, E. M.; BEATTY, P. G.; AMOS, D.; SULLIVAN, K. M.; SCHOC, H. G. et al. Mixed leukocyte culture reactivity and graft-versus-host disease in HLA-identical marrow transplantation for leukemia. **Bone Marrow Transplant**, 9(2): 87-90, 1992.

DEGIANNIS, D.; CZARNECKI, M.; HORNUNG, N.; RASKOVA, J.; RASKA, K. Mixed lymphocyte reaction-induced release of soluble IL-2 receptor. **Transplantation**, 51: 518-23, 1991.

DICKINSON, A. M.; CAVET, J.; CULLUP, H.; WANG, X. N.; SVILAND, L.; MIDDLETON, P. G. GvHD risk assessment in hematopoietic stem cell transplantation: role of cytokine gene polymorphisms and an in vitro human skin explant model. **Hum Immunol**, 62: 1266-76, 2001.

DIEHL, S.; RINCON, M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. **Mol Immunol**, 39(9): 531-6, 2002.

EID, K. A. B.; MIRANDA, E. C. M.; VIGORITO, A. C.; OLIVEIRA, G. B.; de SOUZA, C. A. Critical analysis concerning the availability of full match sibling donors and feasibility of allogenic bone marrow transplantation in Brazil. **Braz J Med Biol Res** "in press".

FERNANDES, H.; KONERU, B.; FERNANDES, N.; HAMEED, M.; COHEN, M. C.; RAVECHE, E. et al. Investigation of promoter polymorphisms in the tumor necrosis factor- α and interleukin-10 genes in liver transplant patients. **Transplantation**, 73: 1886-91, 2002.

- FERRARA, J. L. M. Pathogenesis of acute graft-versus-host disease: cytokines and cellular effectors. **J Hematother Stem Cell Res**, 9: 299-306, 2000.
- FERRARA, J. L. M.; DEEG, H. J. Graft-versus-host disease. **N Engl J Med**, 324: 667-74, 1991.
- FISHMAN, D.; FAULDS, G.; JEFFRY, R.; MOHAMED-ALLI, V.; YUDKIN, J.S.; HUMPHRIES, S. et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **J Clin Invest**, 102: 1369-76, 1998.
- FLEISCHMANN, J.; SHINGLETON, W.; GALLAGHER, C.; RATNOFF, O. D.; CHAHINE, A. Fibrinolysis, thrombocytopenia, and coagulation abnormalities complicating high dose interleukin-2 immunotherapy. **J Lab Clin Med**, 117(1): 76-82, 1991.
- FOLEY, R.; COUBAN, S.; WALKER, I.; GREENE, K.; CHEN, C.S.; MESSNER, H. et al. Monitoring soluble interleukin-2 receptor levels in related and unrelated donor allogeneic bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant**, 21: 769-73, 1998.
- GALE, R. P.; BORTIN, M. M.; van BEKKUM, D. W.; BIGGS, J. C.; DICKE, K. A.; GLUCKMAN, E. et al. Risk factors for acute graft versus host disease. **Br J Haematol**, 67: 397-406, 1987.
- GASCHET, J.; LIM, A.; LIEM, L.; VIVIEN, R.; HALLET, M. M.; HAROUSSEAU, J. L. et al. Acute graft-versus-host disease due to T lymphocytes recognizing a single HLA-DP1*0501 mismatch. **J Clin Invest**, 98(1): 100-7, 1996.
- GATTI, R. A.; MEUWISSEN, H. J.; ALLEN, H. D.; HONG, R.; GOOD, R.A. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. **Lancet**, 2: 1366-9, 1968.
- GEORGE, S.; TURNER, D.; REYNARD, M.; NAVARRETE, C.; RIZVI, I.; FERNANDO, O. N. et al. Significance of cytokine gene polymorphism in renal transplantation. **Transplant Proc**, 33: 483-4, 2001.

GERRARD, T. L.; DYER, D. R.; ZOON, K. C.; ZUR NEDDEN, D.; SIEGEL, J. P. Modulation of class I and class II histocompatibility antigens on human T cell lines by IFN-gamma. **J Immunol**, 140: 3450-5, 1988.

GJERTSON, D. W.; LEE, SU-HUI. HLA-A/B and -DRB1/DQB1 allele-level haplotype frequencies. In: GJERTSON, D. W.; TERASAKI, P. L., Eds. **HLA 1998**. Lenexa, USA: ASHI, 1998. p. 365-450.

GLUCKSBERG, H.; STORB, R.; FEFER, A. Clinical manifestation of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA matched sibling donors. **Transplantation**, 18: 295-314, 1974.

GOULMY, E.; SCHIPPER, R.; POOL, R.; BLOKLAND, E.; FALEKENBURG, J. H. F.; VOSSEN, J. et al. Mismatches of minor histocompatibility antigen between HLA-identical donor and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. **N Engl J Med**, 334: 281-5, 1996.

GRIMM, J.; ZELLER, W.; ZANDER, A. R. Soluble interleukin-2 receptor serum levels after allogeneic bone marrow transplantation as a marker for GVHD. **Bone Marrow Transplant**, 21: 29-32, 1998.

GROUX, H.; BIGLER, M.; DE VRIES, J. E.; RONCAROLO, M. G. Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells. **J Immunol**, 160: 3188-93, 1998.

HAHN, A. B.; KASTEN-JOLLY, J. C.; CONSTANTINO, D. M.; GRAFFUNDER, E.; SINGH, T. P.; SHEN, G. K. et al. TNF- α , IL-6, IFN- γ , and IL-10 gene expression polymorphisms and the IL-4 receptor α -chain variant Q576R: effects on renal allograft outcome. **Transplantation**, 72(4): 660-5, 2001.

HEMPEL, L.; KÖRHOLZ, D.; NUBBAUM, P.; BÖNIG, H.; BURDACH, S.; ZINTL, F. High interleukin-10 serum levels are associated with fatal outcome in patients after bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant**, 20: 365-8, 1997.

HOLLER, E.; KOLB, H. J.; MITTERMUELLER, J.; KAUL, M.; LEDDEROSE, G.; DUELL, T. et al. Modulation of acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation by tumor necrosis factor α (TNF- α) release in the

course of pretransplant conditioning: role of conditioning regimens and prophylactic application of a monoclonal antibody neutralizing human TNF α (MAK 195F). **Blood**, 86: 890-9, 1995.

HOLLER, E.; KOLB, H.; MOLLER, A.; KEMPENI, J.; LIESENFELD, S.; PECHUMER, H. et al. Increased serum levels of tumor necrosis factor precede major complications of bone marrow transplantation. **Blood**, 75: 1011-6, 1990.

HOLLER, E.; RONCAROLO, M. G.; HINTERMEIER-KNABE, R.; EISSNER, G.; ERTL, B.; SCHULZ, U. et al. Prognostic significance of increased IL-10 production in patients prior to allogeneic bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant**, 25(3): 237-41, 2000.

HUANG, X. J.; WAN, J.; LU, D. P. Serum TNF alpha levels in patients with graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. **Leukemia**, 15: 1089-91, 2001.

IMAMURA, M.; HASHINO, S.; KOBAYASHI, H.; KUBAYASHI, S.; HIRANO, S.; MINAGAWA, T. et al. Serum cytokine levels in bone marrow transplantation: synergistic interaction of interleukin-6, interferon- γ , and tumor necrosis factor- α in graft-versus-host disease. **Bone Marrow Transplant**, 13: 745-51, 1994.

IMAMURA, M.; TANAKA, J.; HASHINO, S.; KOBAYASHI, S.; IMAI, K.; ASAKA, M. et al. Immunopathogenesis of GVHD. **Transplant Proc**, 28(3): 1181-3, 1996.

JACOBSON, L. O.; MARQUES, E. K.; ROBSON, M. J. Effect of spleen protection on mortality following x-irradiation. **J Lab Clin Med**, 34: 1538-43, 1949.

KAMI, M.; MATSUMURA, T.; TANAKA, Y.; MIKAMI, Y.; MIYAKOSHI, S.; UYAMA, J.I. et al. Serum levels of soluble interleukin-2 receptor after bone marrow transplantation: a true marker of acute graft-versus-host disease. **Leuk Lymphoma**, 38: 533-40, 2000.

KAPLAN, E. D.; MEIER, P. Non parametric estimation from incomplete observations. **J Am Stat Assoc**, 53: 457-81, 1958.

KAYABA, H.; HIROKAWA, M.; WATANABE, A.; SAITOH, N.; CHANGHAO, C.; YAMADA, Y. et al. Serum markers of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. **J Allergy Clin Immunol**, 106: S40-4, 2000.

KOBAYASHI, S.; IMAMURA, M.; HASHINO, S.; NOTO, S.; MORI, A.; TANAKA, J. et al. Possible role of granulocyte colony-stimulating factor in increased serum soluble interleukin-2 receptor- α levels after allogeneic bone marrow transplantation. **Leuk Lymphoma**, 33: 559-66, 1999.

KOBAYASHI, S.; IMAMURA, M.; HASHINO, S.; TANAKA, J.; ASAKA, M. Clinical relevance of serum soluble interleukin-2 receptor levels in acute and chronic graft-versus-host disease. **Leuk Lymphoma**, 28: 159-69, 1997.

KRENGER, W.; GEOFFREY, R. H.; FERRARA, J. L. M. Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease. **Transplantation**, 64: 553-8, 1997.

LANGE, A.; KARABON, L.; KLIMCZAK, A.; DLUBEK, D.; BOGUNIA-KUBIK, K.; SWIDER, C. et al. Serum interferon- γ and C-reactive protein levels as predictors of acute graft-vs-host disease in allogeneic hematopoietic precursor cell (marrow or peripheral blood progenitor cells) recipients. **Transplant Proc**, 28: 3522-5, 1996.

LEFFELL, M. S.; VOGELSANG, G. B.; LUCAS, D. P.; DELANEY, N. L.; ZACHARY, A. A. Association between TGF- β expression and severe GVHD in allogeneic bone marrow transplantation. **Transplant Proc**, 33: 485-6, 2001.

LETTERIO, J. J.; ROBERTS, A. B. Regulation of immune responses by TGF- β . **Annu Rev Immunol**, 16: 137-61, 1998.

LEVINGS, M.K.; SANGREGORIO, R.; GALBIATI, F.; SQUADRONE, S.; MALEFYT, R. W.; RONCAROLO, M. G. IFN- α and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. **J Immunol**, 166: 5530-9, 2001.

LIEBER, S. R. **Resposta Imune e Transfusões Sangüíneas em Pacientes com Insuficiência Renal Crônica**. São Paulo, 1990. (Tese - Doutorado - Escola Paulista de Medicina).

LIEM, L. M.; FIBBE, W. E.; VAN HOUWELINGEN, H. C.; GOLMY, E. Serum transforming growth factor- β 1 levels in bone marrow transplant recipients correlate with blood cell counts and chronic graft-versus-host disease. **Transplantation**, 67(1): 59-65, 1999.

- LIEM, L. M.; VAN HOUWELINGEN, H. C.; GOULMY, E. Serum cytokine levels after HLA-identical bone marrow transplantation. **Transplantation**, 66(7): 863-71, 1998.
- LIM, S. H.; PATTON, W. N.; JOBSON, S.; GENTLE, T. A.; BAYNHAM, M. I. D.; FRANKLIN, I. M. et al. Mixed lymphocyte reactions do not predict severity of graft versus host disease (GVHD) in HLA-DR compatible, sibling bone marrow transplants. **J Clin Pathol**, 41: 1155-7, 1988.
- MARSHAL, S. E.; McLAREN, A. J.; McKINNEY, E. F.; BIRD, T. G.; HALDAR, N. A.; BUNCE, M. et al. Donor cytokine genotype influences the development of acute rejection after renal transplantation. **Transplantation**, 71(3): 469-76, 2001.
- MATHIAS, C.; MICK, R.; GRUPP, S.; DUFFY, K.; HARRIS, F.; LAPORT, G. et al. Soluble interleukin-2 receptor concentration as a biochemical indicator for acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. **J Hematother Stem Cell Res**, 9: 393-400, 2000.
- McCAFFREY, P. G.; GOLDFELD, A. E.; RAO, A. The role of NFATp in cyclosporin A-sensitive tumor necrosis factor-alpha gene transcription. **J Biol Chem**, 269(48): 30445-50, 1994.
- MEAGER, T. **The Molecular Biology of Cytokines**. National Institute for Biological Standards: Wiley, J. & Sons, Eds. Potters Bar, England, 1998. p. 1-415.
- MIDDLETON, P. G.; TAYLOR, P. R. A.; JACKSON, G.; PROCTOR, S. J.; DICKINSON, A. M. Cytokine gene polymorphisms associating with severe acute graft-versus-host disease in HLA-identical sibling transplants. **Blood**, 92(15): 3943-8, 1998.
- MIYAMOTO, T.; AKASHI, K.; HAYASHI, S.; GONDO, H.; MURAKAWA, M.; TANIMOTO, K. et al. Serum concentration of the soluble interleukin-2 receptor for monitoring acute graft-versus-host disease. **Bone Marrow Transplant**, 17: 185-90, 1996.
- MOORE, K. W.; MALEFYT, R. W.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and interleukin-10 receptor. **Ann Rev Immunol**, 19: 683-765, 2001.

- MÜLLER-STEINHARDT, M.; HÄRTEL, C.; MÜLLER, B.; KIRCHNER, H.; FRICKE, L. The interleukin-6⁻¹⁷⁴ promoter polymorphism is associated with long-term kidney allograft survival. **Kidney Int**, 62(5): 1824-7, 2002.
- NAGLER, A.; OR, R.; NISMAN, B.; KALICKMAN, I.; SLAVIN, S.; BARAK, V. Elevated inflammatory cytokine levels in bone marrow graft rejection. **Transplantation**, 60(9): 943-8, 1995.
- NAKAMURA, H.; KOMATSU, K.; AYAKI, M.; KAWAMOTO, S.; MURAKAMI, M.; UOSHIMA, N. et al. Serum levels of soluble IL-2 receptor, IL-12, IL-18, and IFN- γ in patients with graft-versus-host disease after human bone marrow transplantation. **J Allergy Clin Immunol**, 106: S45-50, 2000.
- NEPOM, B. S.; NEPOM, G. T. Polyglot and polymorphism an HLA update. **Arthritis Rheum**, 38: 1715-21, 1995.
- NIEDERWIESER, D.; HEROLD, M.; WOLOSZCZUK, W.; AULITZKY, W.; MEISTER, B.; TILG, H. et al. Endogenous IFN-gamma during human bone marrow transplantation. **Transplantation**, 50: 620-5, 1990.
- NIKOLIC, B.; LEE, S.; BRONSON, R. T.; GRUSBY, M. J.; SYKES, M. Th1 and Th2 mediate acute graft-versus-host disease, each with distinct end-organ targets. **J Clin Invest**, 105: 1289-98, 2000.
- OZSAHIN, H.; TUCHSCHMID, P.; LAUENER, R.; WALDVOGEL, K.; NADAL, D.; SEGER, R. A. Blockade of acute grade IV skin and eye graft-versus-host disease by anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody in genotypical bone marrow transplantation setting. **Turk J Pediatr**, 40: 231-5, 1998.
- PEROLA, O.; RIPATTI, A.; PELKONEN, J. T-lymphocyte subpopulations do not express identical combinations of Interleukin-2 receptor chains in the early phase of their activation and proliferation. **Scand J Immunol**, 52: 123-30, 2000.
- PETERSDORF, E. W.; SMITH, A. G.; MICKELSON, E. M.; LONGTON, G. M.; ANASETTI, S.; CHOO, Y. et al. The role of HLA-DPB1 disparity in the development of acute graft-versus-host disease following unrelated donor marrow transplantation. **Blood**, 81(7): 1923-32, 1993.

POLI, F.; BOSCHIERO, L.; GIANNONI, F.; TONINI, M.; ANCONA, G.; SCALAMOGNA, M. et al. TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10, and TGF- β 1 gene polymorphisms in renal allografts. **Transplant Proc**, 33: 348-9, 2001.

POLLACK, M. S. The History of Allogenic Bone Marrow / Stem Cell Transplantation: the Last Five Years. In: TERASAKI, P. L.; GJERTSON, D. W., Eds. **HLA 1997**. Los Angeles, California: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1997. p. 39-44.

PRAVICA, V.; ASDERAKIS, A.; PERREY, C.; HAJEER, A.; SINNOT, P.; HUTCHINSON, I. V. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. **Eur J Immunogenet**, 26: 1-3, 1999.

REMBERGER, M.; RINGDÉN, O. Serum levels of cytokines after bone marrow transplantation: increased IL-8 levels during severe veno-occlusive disease of the liver. **Eur J Haematol**, 59: 254-62, 1997.

REMBERGER, M.; RINGDEN, O.; MARKLING, L. TNF α levels are increased during bone marrow transplantation conditioning in patients who develop aGVHD. **Bone Marrow Transplant**, 15: 99-104, 1995.

REVIRON, D.; DUSSOL, B.; ANDRE, M.; BRUNET, P.; MERCIER, P.; BERLAND, Y. TNF- α and IL-6 gene polymorphism and rejection in kidney transplantation recipients. **Transplant Proc**, 33: 350-1, 2001.

SACHS, D. H. The major histocompatibility complex. In: PAUL, W. E., Ed. **Immunology**. New York, Raven, 1984.

SAKATA, N.; YASUI, M.; OKAMURA, T.; INOUE, M.; YUMURA-YAGI, K.; KAWA, K. Kinetics of plasma cytokines after hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors: the ratio of plasma IL-10/sTNFR level as a potential prognostic marker in severe acute graft-versus-host disease. **Bone Marrow Transplant**, 27: 1153-61, 2001.

SANKARAN, D.; ASDERAKIS, A.; ASHRAF, S.; ROBERTS, I. S. D.; SHORT, C. D.; DYER, P. A. et al. Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. **Kidney Int**, 56(1): 281-8, 1999.

SCHREIBER, S. L.; CRABTREE, G. R. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. **Immunol Today**, 13(4): 136-42, 1992.

SCHWAIGHOFER, H.; HEROLD, M.; SCHWARZ, T.; NORDBERG, J.; CESKA, M.; PRIOR, C. et al. Serum levels of interleukin 6, interleukin 8, and C-reactive protein after human allogeneic bone marrow transplantation. **Transplantation**, 58(4): 430-6, 1994.

SELL, T. W.; DAVID, D. E. Primary Mixed Lymphocyte Responses to HLA-DP. **Hum Immunol**, 29: 23-30, 1990.

SHULMAN, H. M.; SULLIVAN, K. M. & WEIDEN, P. L. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. **Am J Med**, 69: 204-17, 1980.

SOCIÉ, G.; LOISEAU, P.; TAMOUZA, R.; JANIN, A.; BUSSON, M.; GLUCKMAN, E. Both genetic and clinical factors predict the development of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Transplantation**, 72(4): 699-706, 2001.

SPITZER TR. Engraftment syndrome following hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant**, 27: 893-8, 2001.

STEIGER, J.U.; NICKERSON, P.W.; HERMLE, M.; THIELK, G.; HEIM, M.H. Interferon- γ receptor signaling is not required in the effector phase of the alloimmune response. **Transplantation**, 65: 1649-56, 1998.

STORB, R.; DEEG, H. J.; WHITEHEAD, J.; APPELBAUM, F.; BEATTY, P. B.; BENSINGER, W. et al. Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. **N Engl J Med**, 314: 729-35, 1986.

SYMINGTON, F. W.; SYMINGTON, B. E.; LIU, P. Y.; VIGUET, H.; SANTHANAM, U.; SEHGAL, P. B. The relationship of serum IL-6 levels to acute graft-versus-host

disease and hepatorenal disease after human bone marrow transplantation. **Transplantation**, 54: 457-62, 1992.

TAKAHASHI, H.; FURUKAWA, T.; HASHIMOTO, S.; SUSUKI, N.; YAMAZAKI, F.; INANO, K. et al. Contribution of TNF- α and IL-10 gene polymorphisms to graft-versus-host disease following allo-hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant**, 26: 1317-23, 2000.

TAKATSUKA, H.; TAKEMOTO, Y.; OKAMOTO, T.; FUJIMORI, Y.; TAMURA, S.; WADA, H. et al. Predicting the severity of graft-versus-host disease from interleukin-10 levels after bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant**, 24: 1005-7, 1999.

TAKATSUKA, H.; TAKEMOTO, Y.; YAMADA, S.; WADA, H.; TAMURA, S.; FUJIMORI, Y. Complications after bone marrow transplantation are manifestations of systemic inflammatory response syndrome. **Bone Marrow Transplant**, 26: 419-26, 2000.

TAMBUR, A. R.; YANIV, I.; STEIN, J.; LAPIDOT, M.; SHABTAI, E.; KFIR, B. et al. Cytokine gene polymorphism in patients with graft-versus-host disease. **Transplant Proc**, 33: 502-3, 2001.

TANAKA, J.; IMAMURA, M.; KASAI, M.; HASHINO, S.; KOBAYASHI, S.; NOTO, S. et al. The important balance between cytokines derived from type 1 and type 2 helper T cells in the control of graft-versus-host disease. **Bone Marrow Transplant**, 19: 571-6, 1997.

THOMAS, E. D. Allogeneic marrow transplantation using matched sibling donors. **Transplant Proc**, 6: 115-9, 1974.

THOMAS, E. D.; LOTTO, H. L.; LEA, W. I. C.; FREEBIE, J. A. W. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. **N Engl J Med**, 257: 491-6, 1957.

THOMAS, E. D.; STORB, R.; CLIFT, R. A.; FEFER, A.; JOHNSON, F. L.; NEIMAN, P. E. et al. Bone marrow transplantation. **N Engl J Med**, 292: 832-43, 895-902, 1975.

TILG, H.; DINARELLO, C. A.; MIER, J. W. IL-6 and APPs: Anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. **Immunol Today**, 18: 428-32, 1997.

TOREN, A.; NOVICK, D.; OR, R.; SLAVIN, S.; NAGLER, A. Soluble interleukin-6 receptors in haematology patients undergoing bone marrow transplantation. **Transplantation**, 62: 138-42, 1996.

TSENG, L. H.; LIN, M. T.; HANSEN, J. A.; GOOLEY, T.; PEI, J.; SMITH, A. G. et al. Correlation between disparity for the minor histocompatibility antigen HA-1 and the development of acute graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation. **Blood**, 94(8): 2911-4, 1999.

TSOI, M. S.; STORB, R.; DOBBS, S. Specific suppressor cells in graft-host tolerance of HLA-identical marrow transplantation. **Nature**, 292: 355-7, 1981.

TURNER, D. M.; WILLIAMS, D. M.; SANKARAN, D.; LAZARUS, M.; SINNOTT, P. J.; HUTCHINSON, I. V. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **Eur J Immunogenet**, 24: 1-8, 1997a.

TURNER, D.; GRANT, S. C. D.; YONAN, N.; SHELDON, S.; DYER, P. A.; SINNOTT, P. J. et al. Cytokine gene polymorphism and heart transplant rejection. **Transplantation**, 64(5): 776-9, 1997b.

van DER MEER, A.; ALLEBES, W. A.; VOORTER, C. E. M.; van DEN BERG-LOONEN, E. M.; SCHATTENBERG, A. V.; DE WITTE, T. J. et al. Helper and cytotoxic T cell precursor frequencies are not predictive for development of acute graft-versus-host disease after partially T cell-depleted HLA-identical sibling BMT. **Bone Marrow Transplant**, 22: 1049-55, 1998.

van ELS, C. A.; BAKKER, A.; ZWINDERMAN, A. H.; ZWAAN, F. E.; van ROOD, J. J.; GOULMY, E. Effector mechanisms in graft-versus-host disease in response to minor histocompatibility antigens. I. Absence of correlation with cytotoxic effector cells. **Transplantation**, 50: 62-6, 1990.

VIGORITO, A. C.; AZEVEDO, W. M.; MARQUES, J. F. C.; AZEVEDO, A. M.; EID, K. A. B.; ARANHA, F. J. P. et al. A randomized, prospective comparison of allogeneic bone marrow and peripheral blood progenitor cell transplantation in the

treatment of hematological malignancies. **Bone Marrow Transplant**, 22: 1145-51, 1998.

VISENTAINER, J. E. L.; LIEBER, S. R.; PERSOLI, L. B. L.; de SOUZA LIMA, S. C. B.; VIGORITO, A. C.; ARANHA, F. J. P. et al. Correlation of mixed lymphocyte culture with chronic graft-versus-host disease following allogeneic stem cell transplantation. **Braz J Med Biol Res**, 35: 567-72, 2002.

WILKE, M.; POOL, J.; den HAAN, J. M. M.; GOULMY, E. Genomic identification of the minor histocompatibility antigen HA-1 locus by allele-specific PCR. **Tissue Antigens**, 52: 312-7, 1998.

WILSON, A. G.; SYMONS, J. A.; MCDOWELL, T. L.; McDEVITT, H. O.; DUFF, G. W. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. **Proc Natl Acad Sci USA**, 94: 3195-9, 1997.

ZINKERNAGEL, R. M.; DOHERTY, P. C. MHC restricted cytotoxic T cells studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T cell restriction specificity, function and responsiveness. **Adv Immunol**, 27: 51-177, 1979.



8. ANEXOS

ANEXO I

UPN	Receptor		Doador		Transplante			GVHD							Reinfusão	Óbito	Seguimento
Paciente	sexo	Idade	sexo	Idade	Diagnóstico	Data	Tipo	Condicionamento	Profilaxia	Aguda	grau	Crônica	grau	Rejeição	Data	Causa	Data
27	M	32	M	25	AA	04/08/94	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	0			15/07/99
84	M	36	M	43	LLA	25/04/96	MO	Bus + Cy + VP	CsA + Cort.	0	0	1	1	0			15/03/02
87	M	48	F	60	LMC	20/06/96	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	1	4			0		50	23/07/96
91	F	31	F	12	LMC	15/08/96	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	1	4			0		50	01/10/96
100	M	20	F	23	AA	14/11/96	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0			26/11/01
103	M	37	F	42	SMD	16/01/97	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	1	4			0		50	03/05/97
105	M	30	M	35	LMC	30/01/97	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0			12/03/02
107	M	42	F	37	LMC	06/03/97	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	1	4	1	2	0		60	26/06/97
108	M	26	M	27	AA	13/03/97	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	1	4			0		50	27/05/97
113	M	46	F	42	MM	08/05/97	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	2	0		21	23/12/97
114	M	51	F	57	MM	15/05/97	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA					0		80	06/06/97
115	M	15	M	5	LMA	28/05/97	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	1		70	27/04/01
118	F	21	F	21	LMC	03/07/97	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	1	3	1	2	0			15/05/02
123	M	26	F	28	AA	28/08/97	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	0			11/12/01
124	M	3	F	13	ADC	11/09/97	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	1			19/07/02
126	F	9	M	17	LMC	25/09/97	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0			05/11/01
127	M	15	M	20	LMA	16/10/97	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	1		70	15/05/98
128	F	43	M	34	LMC	30/10/97	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0		60	08/03/98
129	M	28	F	49	LMC	13/11/97	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA					0		21	11/12/97
130	M	34	F	27	LMC	13/11/97	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	1	4			0		50	02/03/98
131	F	45	M	34	SMD	15/01/98	MO	Bus + Cy	MTX + CsA					0		82	05/02/98
132	M	26	M	19	HPN	29/01/98	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0			11/07/02
133	M	38	M	33	LLA	01/02/98	MO	Cy + ICT	CsA + Cort.	1	4			0		50	30/04/98
135	M	36	F	38	LMA	12/02/98	MO	Bus + Cy	MTX + CsA					0		20	17/03/98
137	M	25	F	28	AA	12/03/98	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	1	3	1	2	0		21	06/02/99
138	M	16	M	18	LLA	19/03/98	MO	Cy + ICT	CsA + Cort.	0	0	0	0	0			04/09/02
139	M	20	M	24	LLA	02/04/98	MO	Cy + ICT	CsA	0	0	0	0	0		21	05/08/98
140	M	12	M	24	LLA	30/04/98	MO	Cy + ICT	CsA + Cort.	0	0	0	0	1		70	22/11/99
143	F	39	M	52	LMC	14/05/98	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0		39	01/05/99
144	F	41	M	42	LMC	04/06/98	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	1	1	14/08/02		15/08/02

UPN	Receptor		Doador		Transplante			GVHD							Reinfusão	Óbito	Seguimento
Paciente	sexo	Idade	sexo	Idade	Diagnóstico	Data	Tipo	Condicionamento	Profilaxia	Aguda	grau	Crônica	grau	Rejeição	Data	Causa	Data
145	M	7	F	17	LLA	18/06/98	CPP	Cy + ICT	CsA + Cort.	0	0	0	0	0			03/12/01
146	M	7	F	4	AA	25/06/98	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	0			23/01/02
147	M	17	F	20	LMMC	16/07/98	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	1		50	12/01/99
148	F	38	F	35	LMC	24/07/98	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	1	0			14/03/02
149	M	28	F	21	AA	30/07/98	MO	Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	1			17/06/02
150	F	21	F	17	LMA	07/08/98	MO	Cy + ICT	MTX + CsA	0	0	0	0	1		70	05/02/99
151	M	21	F	30	LMC	13/08/98	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	1		70	20/06/99
152	F	43	M	35	LMC	27/08/98	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0			08/03/02
153	F	44	M	58	LMC	03/09/98	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	1	2	1	2	0			23/09/02
154	M	14	M	5	LMC	17/09/98	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0			20/05/02
156	M	29	M	20	AA	29/10/98	MO	Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	0			04/02/02
157	F	18	F	19	LMC	12/11/98	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	0			05/03/02
158	M	53	M	58	AA	19/11/98	MO	Bus + Cy	MTX + CsA					0		10	12/02/99
161	F	12	F	20	LMC	28/01/99	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0			06/03/02
169	M	48	M	57	LMC	18/02/99	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	0			08/01/02
173	M	59	M	49	SMD	25/03/99	MO	Bus + Cy	MTX + CsA					0		21	10/04/99
175	M	30	F	20	LMC	15/04/99	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0			20/05/02
177	F	25	M	23	LMC	06/05/99	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0			24/09/02
179	M	36	M	38	LMA	13/05/99	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	0			15/03/02
180	M	24	F	33	LMC	20/05/99	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0			17/04/02
181	M	39	M	29	LMA	27/05/99	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA					0		20	16/07/99
185	M	28	F	24	LMC	24/06/99	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	0			04/03/02
186	M	22	M	27	LLA	01/07/99	MO	Cy + ICT	MTX + CsA					0		34	16/07/99
189	M	31	F	40	LLA	08/07/99	CPP	Bus + Cy + VP	CsA + Cort.	0	0	0	0	1		70	27/03/00
190	M	19	F	22	LMA	15/07/99	MO	Bus + Cy	MTX + CsA					0		83	27/07/99
191	F	32	M	37	AA	05/08/99	MO	Cy	MTX + CsA	1	3	1	1	0			22/07/02
193	M	44	M	56	LMC	12/08/99	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	1	10/04/01		16/07/02
196	M	22	M	19	LMC	26/08/99	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0			01/08/01
199	M	14	M	8	LMC	09/09/99	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	1	0			26/03/02
203	M	54	M	34	LMC	14/10/99	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0		102	16/07/02
204	F	16	F	11	LMC	18/10/99	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	1		70	15/03/00
208	M	34	M	30	LMC	11/11/99	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0		84	19/11/00
209	M	41	M	38	LMC	18/11/99	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	1	0			13/05/02

UPN	Receptor		Doador		Transplante			GVHD							Reinfusão	Óbito	Seguimento
Paciente	sexo	Idade	sexo	Idade	Diagnóstico	Data	Tipo	Condicionamento	Profilaxia	Aguda	grau	Crônica	grau	Rejeição	Data	Causa	Data
210	M	17	M	13	LMC	18/11/99	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0			27/02/02
212	M	32	F	39	LMC	25/11/99	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	1	3	1	2	0		21	20/06/00
214	M	52	F	39	LMA	13/01/00	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	1	0			04/02/02
217	M	24	F	27	LMC	20/01/00	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0			15/05/02
218	M	32	M	37	LMC	04/02/00	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0			10/05/02
220	M	33	F	32	LMA	10/02/00	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0		60	06/02/02
221	M	21	M	13	LMA	17/02/00	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	1	0			12/12/01
222	M	30	M	13	LMA	24/02/00	MO	Bus + Cy	MTX + CsA					0		81	17/04/00
225	F	34	M	38	LMC	09/03/00	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA					0		40	18/04/00
228	M	29	M	25	LMC	23/03/00	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	0			18/12/01
230	F	44	M	50	LMC	20/04/00	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	1	4			0		50	23/08/00
232	F	32	M	22	LMC	05/05/00	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	1	3	0	0	0			13/03/02
233	M	25	M	16	AA	05/05/00	MO	Cy + ICT	MTX + CsA	0	0	0	0	0			23/07/02
235	M	37	M	35	LMC	01/06/00	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	1	0			19/05/02
237	M	37	F	35	AA	08/06/00	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	0		21	01/10/00
238	M	42	F	53	LMC	08/06/00	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	1	2			0		88	17/07/00
239	M	39	M	36	LMC	29/06/00	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0			0		88	18/09/00
240	M	29	M	37	LMA	13/07/00	CPP	Cy + ICT	MTX + CsA					0		88	23/07/00
244	M	32	F	29	LMC	10/08/00	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0			13/05/02
245	M	43	F	33	LMC	17/08/00	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0		60	10/05/01
246	F	22	M	21	AA	31/08/00	MO	Bus + Cy	MTX + CsA					0		88	24/09/00
248	F	30	M	57	LMC	14/09/00	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0			22/02/02
252	M	30	M	33	LMC	05/10/00	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	1	4			0		50	17/01/01
253	M	20	M	18	LMA	05/10/00	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	1	06/09/01		25/09/02
255	M	30	M	27	LMA	19/10/00	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	1	01/03/01	70	20/06/01
257	M	26	M	20	AA	09/11/00	MO	Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	1	03/05/01		07/05/02
258	M	44	F	43	LMC	23/11/00	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0			20/08/02
259	F	45	F	37	LMC	30/11/00	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA					0		80	22/12/00
260	M	23	M	22	LMC	30/11/00	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	1	0			27/05/02
263	F	42	F	30	AA	21/12/00	MO	Cy	MTX + CsA	1	2			0		31	01/03/01
265	M	23	M	22	SMD	11/01/01	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	0			10/04/02
267	F	25	F	17	AA	18/01/01	MO	Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0			29/06/02
271	F	45	F	40	AA	08/02/01	MO	Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	1			26/09/02

UPN	Receptor		Doador		Transplante			GVHD							Reinfusão	Óbito	Seguimento
Paciente	sexo	Idade	sexo	Idade	Diagnóstico	Data	Tipo	Condicionamento	Profilaxia	Aguda	grau	Crônica	grau	Rejeição	Data	Causa	Data
272	F	15	M	31	LLA	15/02/01	CPP	Cy + ICT	CsA + Cort.	0	0	1	2	0		60	27/10/01
273	M	4	F	4	LLA	22/02/01	MO	Cy + ICT	CsA	0	0	0	0	1		70	28/06/01
277	F	13	M	7	SMD	08/03/01	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	0		31	03/09/01
279	M	18	M	16	SMD	15/03/01	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	0			02/04/02
283	M	41	F	37	LMC	19/04/01	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	1	2	1	2	0			11/05/02
285	M	31	M	33	LMC	26/04/01	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	0			04/07/02
293	M	40	M	45	LMA	31/05/01	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	1		70	02/09/02
294	F	6	F	39	LMA	07/06/01	MO	Cy + ICT	MTX + CsA	0	0			0		121	10/06/01
297	F	50	F	52	AA	21/06/01	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	0			11/03/02
299	M	16	M	30	LMA	05/07/01	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	0			07/05/02
303	F	38	M	21	SMD	26/07/01	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	0		21	16/11/01
304	M	36	M	32	LMC	16/08/01	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	1	2	0			09/05/02
305	M	26	F	14	AA	30/08/01	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	1	3			0		101	23/10/01
306	M	43	F	48	LMA	24/09/01	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	0			03/05/02
307	F	47	M	51	LMA	27/09/01	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	0			09/05/02
310	M	14	F	15	LMA	19/11/01	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	1	2	0	0	0			22/04/02
313	F	26	M	23	AA	06/12/01	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	0			27/05/02
315	M	29	F	28	AA	17/01/02	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	0			18/07/02
317	M	43	F	35	LMC	24/01/02	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0			0		30	14/04/02
318	M	36	F	48	LMA	24/01/02	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	0			12/07/02
320	M	42	M	36	LMC	18/02/02	CPP	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	0			22/07/02
321	F	45	M	42	LMC	28/02/02	MO	Bus + Cy	MTX + CsA	0	0	0	0	0			26/06/02

MO= medula óssea; CPP= células progenitoras periféricas; AA= anemia aplástica grave; LMA= leucemia mielóide aguda; LMC= leucemia mielóide crônica; SMD= síndrome mielodisplástica ; MM= mieloma múltipla; ADC= anemia diseritropoiética congênita; HPN= hemoglobinúria paroxística noturna; Bus= Busulfan; ICT= Irradiação Corporal Total; Cy= Ciclofosfamida; MTX= Metotrexato; CsA= Ciclosporina; Cort.= Corticosteróides; VP= Etoposide.

Termo de Consentimento Informado

**HEMOCENTRO UNICAMP
DIVISÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA
UNIDADE DE TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA**

Projeto: “Análise da compatibilidade no processo de seleção de doadores de medula óssea e do perfil de produção de citocinas de pacientes e doadores submetidos ao transplante alogênico no Centro de Transplante de Medula Óssea do HEMOCENTRO – UNICAMP”

Responsável: Prof^a Jeane Eliete Laguila Visentainer

Equipe: Dr^a Sofia Rocha Lieber e Dr Cármino Antônio de Souza

Nome completo:.....

Data de nascimento:.....Idade:.....RG:.....

Endereço:.....Fone:.....
.....

Cidade:.....Estado:.....CEP:.....
.....

Nome completo do responsável:.....

Data de
nascimento:.....Idade:.....RG:.....
Endereço:.....Fone:.....
.....
Cidade:.....Estado:.....CEP:.....
.....
Parentesco:.....
.....

Justificativas e objetivos do estudo

O desenvolvimento de técnicas laboratoriais que possam prever o aparecimento de GVHD e rejeição, após o transplante de medula óssea, é de extremo valor na área médica. Desta forma, o objetivo deste estudo é definir o procedimento que, isoladamente, ou em conjunto, se mostre ao mesmo tempo sensível, passível de rotina, economicamente viável e capaz de prever reações de rejeição e/ou GVHD pós-transplante de medula óssea, através da definição de um perfil da produção de citocinas dos pacientes e doadores.

Procedimentos a que serão submetidos os pacientes e seus doadores

Para a realização deste estudo, uma amostra de sangue de 08 mL será coletada no momento da realização de exames de rotina pré-transplante do doador e paciente. Após a realização do transplante, a coleta será semanal no paciente durante o período de internação e, quando o mesmo voltar às consultas. Não será necessário comparecer ao laboratório somente para a realização destes exames. A coleta cessará ao final de 2 anos.

Os resultados dos testes não serão considerados como critérios para a realização do transplante.

Será mantido o caráter confidencial das informações e a identificação dos pacientes e doadores não será exposta nas conclusões ou publicações.

Os indivíduos envolvidos na pesquisa poderão desistir deste estudo a qualquer hora, sem prejuízo no tratamento.

**EXTRAÇÃO DE DNA COM O REAGENTE DNazol (Life Technologies[®],
Grand Island, NY, USA)**

I. Obtenção do botão de células

1. Após a coleta de sangue desprezar o plasma.
2. Acrescentar 5v (volumes) de tampão de lise (ver preparo abaixo) para 1v de precipitado.
3. Agitar por inversão 5 min., centrifugar 10 min. a 2.500 rpm, desprezar o sobrenadante.
4. Repetir novamente a lavagem com tampão de lise.

Tampão de lise: misturar o cloreto de amônia (NH₄Cl)5v + bicarbonato de amônia (NH₄HCO₃)1v

II. Extração do DNA

1. Acrescentar, por gotejamento, 1 mL de DNazol ao botão de células numa capela de exaustão.
2. Dissolver com uma pipeta e deixar repousar por uma hora ou por uma noite na capela, conforme o tamanho do botão de células.
3. Para a precipitação do DNA, acrescentar 0,5 mL de etanol absoluto gelado (-20°C), para cada 1,0 mL de DNazol.
4. Misturar cuidadosamente por inversão até o aparecimento do filamento de DNA.
5. Transferir o DNA precipitado para um frasco tipo “eppendorf” com 1 mL de etanol a 70% gelado (-20°C).
6. Centrifugar 1 min. a 12.000 rpm em microcentrífuga.
7. Desprezar o sobrenadante e deixar secar o DNA em temperatura ambiente (5 a 10 min.).
8. Acrescentar 200 µL de água estéril. Deixar em BM a 37°C (por uma noite).
9. Conservar o DNA em freezer a -20°C ou menos.

**KIT PUREGENE DE EXTRAÇÃO DE DNA (GENTRA SYSTEMS[®],
Minneapolis, MN)**

I. Lise das hemácias:

1. Adicionar 300 µL de sangue total a um frasco tipo “eppendorf” (1,5 mL) contendo 900 µL de Solução de Lise (RBC). Misture e incube por 10 min. à temperatura ambiente. Inverta pelo menos uma vez durante a incubação.
2. Centrifugar por 20 segundos a 13.000 rpm. Remover o sobrenadante com uma pipeta, deixando o botão de células brancas no fundo do “eppendorf” (10-20 µL de líquido residual).
3. Agitar o tubo vigorosamente com o vórtex para ressuspender as células no líquido residual; isso facilitará a lise no passo posterior.
4. Adicionar 300 µL de Solução de Lise de Células às células ressuspensas e pipetar e soltar várias vezes essa suspensão. Usualmente não é necessária incubação, mas se grumos se formarem após a mistura, incubar a 37°C ou à temperatura ambiente até a solução estar homogênea. Amostras são estáveis nesta Solução de Lise por pelo menos 18 meses à temperatura ambiente.

II. Tratamento com RNase (opcional)

1. Adicionar 1,5 µL de solução RNase ao lisado de células.
2. Misturar a amostra por inversão 25 vezes e incubar por 15 a 60 min.

III. Precipitação de proteínas

1. Os reagentes devem ser mantidos à temperatura ambiente.
2. Adicionar 100 µL de Solução de Precipitação de Proteína ao lisado.
3. Misturar a solução com o lisado vigorosamente, usando o vórtex por 20 segundos.

5. Centrifugar a 13.000 rpm por 3 min. Deverá se formar uma camada fina marrom escura no fundo do tubo. Se o botão não aparecer, repetir o passo anterior, seguido pela incubação em gelo por 5 min. e novamente o passo 4.

IV. Precipitação de DNA

1. Transferir o sobrenadante contendo o DNA para um “eppendorf” limpo (1,5 μ L), já contendo 300 μ L de Isopropanol 100%.
2. Misturar a amostra por inversão delicadamente por 50 vezes.
3. Centrifugar a 13.000 rpm por 1 min. O DNA será visível como um pequeno botão branco.
4. Desprezar o sobrenadante e inverter o tubo sobre papel absorvente. A seguir, adicionar 300 μ L de etanol 70%. Inverter o tubo várias vezes para lavar bem o DNA.
5. Centrifugar a 13.000 rpm por 1 min. e remover o etanol por inversão, cuidadosamente para não perder o botão.
6. Inverter o tubo sobre papel absorvente e secar por 10 a 15 min.

V. Hidratação do DNA

1. Adicionar 100 μ L de Solução de Hidratação (concentração do DNA = 10 μ g/mL).
2. Reidratar o DNA incubando a amostra por uma hora a 65°C ou por uma noite à temperatura ambiente. Se possível, homogeneizar o DNA periodicamente.
3. Manter o DNA a 4°C até o momento do uso. Para um tempo longo de armazenamento, congelar a -20°C ou -80°C.

KIT PCR-SSP PARA GENOTIPAGEM DOS ALELOS HLA-DRB1 E DQB1
(DYNAL LTD.[®], BROMBOROUGH, WIRRAL, UK)

Tipagem HLA-DRB1

1. Remover os “Kits” contendo os “primers”, os frascos com a solução “master mix” (DYNAL ALLSet+™ SSP) e as amostras de DNA do freezer. Esperar que os reagentes atinjam a temperatura ambiente. Agitar as amostras de DNA com o vórtex.
2. Remover a Taq polimerase do freezer (-20°C) e manter em gelo.
3. Em um “ependorf”, adicionar 224 µL da solução “master mix”, 53,2 µL da amostra de DNA e 2,24 µL da Taq polimerase.
4. Misturar bem usando o vórtex.
5. Centrifugar o tubo da mistura PCR para que todo líquido vá para o fundo.
6. Dispensar 10 µL da mistura PCR em cada poço da placa contendo os “primers”.
7. Selar bem a placa, para que não evapore material.
8. Colocar a placa de tipagem no termociclador (Perkin-Elmer 9600 ou 9700) ou modelo similar.
9. Entrar com o programa:

Número de	Passo	Temp. (° C)	Tempo (s)
1	1	94	120
10	1	94	45
	2	64	75
20	1	94	45
	2	61	60
	3	72	45
Final	1	4	---

10. Remover os tubos do termociclador. As amostras podem ser congeladas a -20°C ou usadas imediatamente na corrida de eletroforese em gel.
11. Transferir 10 μL de cada tubo da reação em seqüência ao gel de agarose 2,5% (Sigma, ST Louis, USA), usando uma micropipeta P8 ou P10.
12. Executar o processo de eletroforese (140-150 volts) por 10 a 15 min.
13. Fotografar o gel em um transiluminador dentro de 5 min. após a eletroforese.
14. Interpretar os resultados de acordo com a tabela de interpretação fornecida com o “Kit”.

Tipagem HLA-DQB1

1. Remover os “Kits” contendo os “primers”, os frascos com a solução “master mix” (DynaL ALLSet+™ SSP) e as amostras de DNA do freezer. Esperar que os reagentes atinjam a temperatura ambiente. Agitar as amostras de DNA com o “Vórtex”.
2. Remover a Taq polimerase do freezer (-20°C) e manter em gelo.
3. Em um “ependorf”, adicionar 80 μL da solução “master mix”, 19 μL da amostra de DNA e 0,8 μL da Taq polimerase.
4. Misturar bem usando o vórtex.
5. Centrifugar o tubo da mistura PCR para que todo líquido vá para o fundo.
6. Dispensar 10 μL da mistura PCR em cada poço da placa contendo os “primers”.
7. Selar bem a placa, para que não evapore material.
8. Coloque a placa de tipagem no termociclador (Perkin-Elmer 9600 ou 9700) ou modelo similar.
9. Entrar com o programa:

Número de	Passo	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (s)
1	1	94	120
10	1	94	45
	2	64	75
20	1	94	45
	2	61	60

	3	72	45
Final	1	4	---

10. Remover os tubos do termociclador. As amostras podem ser armazenadas a -20°C ou usadas imediatamente na corrida de eletroforese em gel.
11. Transferir 10 μL de cada tubo da reação em seqüência ao gel de agarose 2,5% (Sigma, ST Louis, USA), usando uma micropipeta P8 ou P10.
12. Executar o processo de eletroforese (140-150 volts) por 3 a 5 min. ou 100 volts por 10 a 15 min.
13. Fotografar o gel em um transiluminador dentro de 5 min. após a eletroforese.
14. Interpretar os resultados de acordo com a tabela de interpretação fornecida com o "Kit".

**KIT PCR-SSP DE GENOTIPAGEM DE CITOCINAS (One Lambda[®],
Canoga Park, CA, USA)**

Dispensação dos “primers”

1. Remover o conjunto de “primers” do freezer (-65° C) e deixar descongelar à temperatura ambiente (20-25° C). Aliquotar dentro de uma hora após o descongelamento. Você pode aliquotar e recongelar se não desejar dispensar toda a quantidade. O recongelamento deve ser limitado a 1 ou 2 vezes.
2. Misturar o conteúdo de cada frasco de “primer” usando o vórtex.
3. Cuidadosamente remover a tampa dos tubos.
4. Usando uma pipeta multicanal, de preferência, dispensar 2,0 µL de cada “primer” ao poço ou tubo de parede fina correspondente.
5. Após dispensar todos os “primers”, fechar bem os tubos e organizar em fileiras de 1 a 16. Cada grupo de 16 “primers” será usado em cada tipagem.
6. Guardar os “Kits” de tipagem contendo os “primers” a -65° C ou menos.

Aliquotagem da solução D-mix

1. Usando uma pipeta, aliquotar 140 µL de solução D-mix em tubos.
2. Fechar os tubos e congelar a -65° C até o uso.

Procedimento da técnica de tipagem

1. Remover os tubos contendo os “primers”, os frascos com D-mix e as amostras de DNA do freezer. Esperar que os reagentes atinjam a temperatura ambiente. Agitar as amostras de DNA com o Vórtex.
2. Remover a Taq polimerase do freezer (-20° C) e manter em gelo.
3. Usando uma pipeta P20, adicionar 1 µL do diluente do DNA ao controle negativo da reação.
4. Usando uma pipeta P20, adicionar o volume requerido de Taq polimerase (5 unidades/ µL) ao tubo de D-mix.

5. Fechar o tubo e agitar em Vórtex por 5 segundos.
6. Centrifugar o tubo de D-mix em uma microcentrífuga para que todo líquido vá para o fundo do tubo.
7. Usando uma pipeta P20, pipetar 7 μL de D-mix ao controle negativo.
8. Usando uma pipeta P200, adicionar 19 μL de DNA ao tubo com D-mix.
9. Misturar por 5 segundos em Vórtex e centrifugar.
10. Usando uma pipeta P20, aliquotar 8 μL da mistura em cada tubo, exceto no tubo do controle negativo.
11. Selar bem os tubos da reação, para que não evapore material.
12. Colocar os tubos de tipagem no termociclador (Perkin-Elmer 9600 ou 9700) ou modelo similar.
13. Entrar com o programa:

Número de	Passo	Temp. (° C)	Tempo (s)
1	1	96	130
	2	63	60
9	1	96	10
	2	63	60
20	1	96	10
	2	59	50
	3	72	30
Final	1	4	---

14. Remover os tubos do termociclador. As amostras podem ser armazenadas a -20°C ou usadas imediatamente na corrida de eletroforese em gel.
15. Transferir 10 μL de cada tubo da reação em seqüência ao gel de agarose 2,5%, usando uma micropipeta P8 ou P10.
16. Executar o processo de eletroforese (140-150 volts) por 3 a 5 min. ou 100 volts por 10 a 15 min.
17. Fotografar o gel em um transiluminador dentro de 5 min. após a eletroforese.
18. Interpretar os resultados de acordo com a tabela de interpretação fornecida com o “Kit”.

**KIT ELISA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE sIL-2R HUMANO
(BIOSOURCE[®], Nivelles, Belgium, Europe)**

Preparação dos reagentes e estocagem

Reconstituição e diluição do padrão de sIL-2R

Nota: tubos plásticos ou de vidro podem ser usados para a diluição do padrão.

1. Reconstituir o padrão a 8000 µg/mL com o tampão diluente do padrão. Ler a bula. Misturar delicadamente e esperar 10 min. para a completa dissolução. Usar o padrão até uma hora após a reconstituição.
2. Adicionar 0,125 mL de tampão diluente do padrão a cada um dos 6 tubos marcados: 4000/ 2000/ 1000/ 500/ 250 e 125 µg/mL sIL-2R.
3. Fazer diluições seriadas do padrão como descrito abaixo. Misturar entre os passos.

Diluição do padrão de sIL-2R

PADRÃO (µg/mL)	ADICIONAR	ADICIONAR ANTES
8000	Prepare como descrito no passo 1	
4000	0,125 mL do 8000	0,125 mL do Tampão Diluente
2000	0,125 mL do 4000	0,125 mL do Tampão Diluente
1000	0,125 mL do 2000	0,125 mL do Tampão Diluente
500	0,125 mL do 1000	0,125 mL do Tampão Diluente
250	0,125 mL do 500	0,125 mL do Tampão Diluente
125	0,125 mL do 250	0,125 mL do Tampão

		Diluyente
0	0,125 mL do Tampão Diluyente	Um tubo vazio

4. Descartar todos os padrões diluídos e reagentes reconstituídos. Retornar o tampão ao refrigerador.

Estocagem e diluição final da estreptividina-HRP

Nota: A Estreptividina-HRP 100x concentrada está em 50% de glicerol.

Deixar a solução atingir a temperatura ambiente. Misturar cuidadosamente. Pipetar a solução devagar. Remover o excesso da pipeta limpando a ponteira com papel absorvente.

Diluir 10 µL desta solução concentrada com 1 mL de diluyente de Estreptividina-HRP para cada tira (8 poços) usada no ensaio. Marcar como solução de trabalho de Estreptividina-HRP.

Tiras de 8 poços	Volume de Estreptividina-HRP concentrada (µL)	Volume de Diluyente (mL)
2	20	2
4	40	4
6	60	6
8	80	8
10	100	10
12	120	12

Retornar o concentrado de Estreptividina-HRP ao refrigerador.

Diluição do tampão de lavagem

1. Deixar o concentrado 25x alcançar a temperatura ambiente e misturar até que todo precipitado se dissolva. Diluir um volume de 25x de tampão de lavagem concentrado com 24 volumes de água deionizada (ex. 50 mL podem ser diluídos a

1,25 L, 100 mL podem ser diluídos a 2,5 L). Marcar como solução de trabalho do tampão de lavagem.

2. Guardar ambos, o concentrado e a solução de trabalho, no refrigerador. O tampão diluído pode ser usado dentro de 14 dias.

Método: procedimentos e cálculos

Deixar todos os reagentes à temperatura ambiente antes do uso.

Nota: Uma curva padrão deve ser corrida em cada ensaio.

1. Determinar o número de tiras (8 poços) necessárias ao ensaio. Inserir estas na placa apropriada. Guardar as outras, fechadas, no refrigerador.
2. Adicionar 50 μL do tampão diluente do padrão aos tubos zero. Os poços reservados para o branco do cromógeno devem ficar vazios.
3. Adicionar 50 μL dos padrões, amostras ou controles aos poços apropriados.
4. Pipetar 50 μL do conjugado (anti-sIL-2R biotilado) em cada poço, exceto no branco do cromógeno. Bater cuidadosamente do lado da placa para misturar.
5. Cobrir a placa com o papel adesivo adequado e incubar por 2 horas à temperatura ambiente.
6. Aspirar ou decantar a solução dos poços e descartar o líquido. Lavar os poços 4x.
7. Adicionar 100 μL da solução de trabalho de Estreptavidina-HRP a cada poço, exceto no branco do cromógeno.
8. Cobrir a placa com o papel adesivo adequado e incubar por 30 min. à temperatura ambiente.
9. Aspirar ou decantar a solução dos poços e descarte o líquido. Lavar os poços 4x.

10. Adicionar 100 μL de cromógeno estabilizado a cada poço. O líquido do poço começará a ficar azul.
11. Incubar por 30 min. à temperatura ambiente e no escuro. Nota: não cobrir a placa com papel alumínio. O tempo de incubação do substrato cromógeno é sempre determinado pelo leitor usado. Muitos leitores têm a capacidade de ler até a DO de 2,0. Os valores devem ser monitorados e a reação do substrato parada antes dos poços positivos atingirem os limites do aparelho. Os valores de DO a 450 nm podem ser lidos após adicionar a solução de “stop” a cada poço. Se usar um leitor que lê somente até 2,0 DO, parar o ensaio após 20 a 25 min. (sugestão).
12. Adicionar 100 μL de solução “stop” a cada poço. Bater com cuidado do lado da placa para misturar. A solução nos poços mudará de azul para amarela.
13. Ler as absorbâncias de cada poço a 450 nm, zerando com o branco do cromógeno, composto de 100 μL de cromógeno estabilizado e solução “stop”. Ler as placas dentro de 2 horas após a adição da solução “stop”.
14. Plotar num gráfico as absorbâncias dos padrões contra as suas concentrações. Desenhar a melhor curva usando estes pontos.
15. Ler as concentrações de sIL-2R para as amostras desconhecidas e controles da curva plotada. Amostras que produzirem resultados maiores que 8000 $\rho\text{g/mL}$ devem ser diluídas em tampão diluente de padrão e reanalisadas, multiplicando-se a concentração encontrada pelo fator de diluição.

**KIT ENZYME AMPLIFIED SENSITIVITY IMMUNOASSAY (EASIA)
PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE TNF- α HUMANO
(BIOSOURCE[®], Nivelles, Belgium, Europe)**

Preparação dos reagentes

Padrões e controles: Reconstituir os padrões liofilizados e controles ao volume especificado com água destilada. Esperar a completa dissolução e então misturar delicadamente.

Solução do conjugado: De acordo com o número de poços utilizados, diluir o conjugado concentrado com o tampão do conjugado em tubo de vidro limpo: ver volume a ser pipetado.

Nº poços	Conjugado concentrado (μL)	Tampão conjugado (μL)	Volume de trabalho (μL)
8	50	500	550
16	100	1000	1100
24	150	1500	1650
32	200	2000	2200
48	300	3000	3300
96	600	6000	6600

Solução de lavagem: Diluir 2 mL de solução de lavagem concentrada em 400 mL de água destilada ou todo o conteúdo da solução em 2000 mL de água destilada (usar um homogeneizador magnético).

Solução cromogênica: Pipetar 0,2 mL da solução cromogênica concentrada (TMB) em um dos tubos de tampão do substrato (H₂O₂ em tampão acetato/citrato). Preparação extemporânea é necessária. Usar somente à temperatura ambiente. A solução cromogênica é estável por no máximo 15 min.. Evitar exposição direta à luz.

Estocagem e tempo de vida dos reagentes

1. O conjugado deve ser estocado de 2 a 8°C.
2. Os padrões, controles e a solução A são estáveis por 4 dias a 2-8°C. Alíquotas devem ser congeladas por longos períodos de tempo, no máximo por 2 meses a -20°C ou a -70°C até a data de expiração.
3. Guardar as tiras a 2-8°C no pacote fechado contendo o dessecante.
4. A solução concentrada de lavagem é estável à temperatura ambiente até a data de expiração. É recomendado que se prepare uma solução fresca no dia de uso.
5. A solução cromogênica preparada na hora é estável por no máximo 15 min. à temperatura ambiente.

Procedimento

1. Deixar as amostras e reagentes alcançarem a temperatura ambiente (18 a 25°C) antes do ensaio. Misturar os reagentes e amostras antes do uso.
2. A curva padrão deve ser corrida em cada ensaio ou placa corrida.
3. Selecionar o número de tiras para a corrida.
4. Pipetar 50 µL de tampão de incubação em todos os poços.
5. Pipetar 200 µL de cada padrão, controle ou amostra nos poços apropriados.
6. Incubar por 2 horas à temperatura ambiente em um agitador horizontal (700 rpm).
7. Aspirar o líquido de cada poço.

8. Lavar a placa três vezes:
 - Adicionar 0,4 mL de solução de lavagem a cada poço;
 - Aspirar o conteúdo do poço.
9. Pipetar 100 μ L de padrão 0 em todos os poços.
10. Pipetar 50 μ L de conjugado anti-TNF- α em todos os poços.
11. Incubar por 2 horas à temperatura ambiente em um agitador horizontal (700 rpm).
12. Aspirar o líquido de cada poço.
13. Lavar a placa três vezes:
 - Adicionar 0,4 mL de solução de lavagem a cada poço;
 - Aspirar o conteúdo do poço.
14. Pipetar 200 μ L de solução cromogênica, preparada no momento do uso, em cada poço dentro de 15 min. seguindo o passo de lavagem.
15. Incubar a placa por 30 min. à temperatura ambiente em um agitador horizontal (700 rpm), evitando exposição direta à luz.
16. Pipetar 50 μ L de solução “stop” em cada poço.
17. Ler as absorvâncias a 450 nm e 490 nm (filtro de referência: 630 ou 650 nm) dentro de três horas e calcular os resultados.

**KIT ELISA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE IFN- γ HUMANO
(BIOSOURCE[®], Nivelles, Belgium, Europe)**

Preparação dos reagentes e estocagem

Reconstituição e diluição do padrão de IFN- γ :

Nota: tubos plásticos ou de vidro podem ser usados para a diluição do padrão.

1. Reconstituir o padrão a 5000 $\mu\text{g/mL}$ com o tampão diluente do padrão. Ler a bula. Misturar delicadamente e esperar 10 min. para a completa dissolução. Usar o padrão até uma hora após a reconstituição.
2. Adicionar 0,100 mL do padrão reconstituído a um tubo contendo 0,400 mL de tampão diluente do padrão. Marcar como 1000 $\mu\text{g/mL}$ IFN- γ . Misturar.
3. Adicionar 0,150 mL de tampão diluente do padrão a cada um dos 6 tubos marcados: 500/ 250/ 125/ 62,5/ 31,2 e 15,6 $\mu\text{g/mL}$ IFN- γ .
4. Fazer diluições seriadas do padrão como descrito abaixo. Misturar entre os passos.

Diluição do padrão de IFN- γ

PADRÃO ($\mu\text{g/mL}$)	ADICIONAR	ADICIONAR ANTES
1000	Prepare como descrito no passo 2	
500	0,150 mL do 1000	0,150 mL do Tampão
250	0,150 mL do 500	0,150 mL do Tampão
125	0,150 mL do 125	0,150 mL do Tampão
62,5	0,150 mL do 125	0,150 mL do Tampão
31,2	0,150 mL do 62,5	0,150 mL do Tampão
15,6	0,150 mL do 31,2	0,150 mL do Tampão
0	0,150 mL do Tampão	Um tubo vazio

5. Descartar todos os padrões diluídos e reagentes reconstituídos. Retornar o tampão ao refrigerador.

Estocagem e diluição final da estreptividina-HRP

Nota: A Estreptividina-HRP 100x concentrada está em 50% de glicerol. Esta solução é viscosa.

Deixar a solução atingir a temperatura ambiente. Misturar cuidadosamente. Pipetar a solução devagar. Remover o excesso da pipeta limpando a ponteira num papel absorvente.

1. Diluir 10 μL desta solução concentrada com 1 mL de diluente de Estreptividina-HRP para cada tira (8 poços) usada no ensaio. Marcar como solução de trabalho de Estreptividina-HRP.

Tiras de 8 poços	Volume de Estreptividina-HRP concentrada (μL)	Volume de Diluente (mL)
2	20	2
4	40	4
6	60	6
8	80	8
10	100	10
12	120	12

2. Retornar o concentrado de Estreptividina-HRP ao refrigerador.

Diluição do tampão de lavagem

1. Deixar o concentrado 25x alcançar a temperatura ambiente e misturar até que todo precipitado se dissolva. Diluir um volume de 25x de tampão de lavagem concentrado com 24 volumes de água deionizada (ex. 50 mL podem ser diluídos a 1,25 L, 100 mL podem ser diluídos a 2,5 L). Marcar como solução de trabalho do tampão de lavagem.

2. Guardar ambos, o concentrado e a solução de trabalho, no refrigerador. O tampão diluído pode ser usado dentro de 14 dias.

Método: procedimentos e cálculos

Deixar todos os reagentes à temperatura ambiente antes do uso.

Nota: Uma curva padrão deve ser corrida com cada ensaio.

1. Determinar o número de tiras (8 poços) necessárias ao ensaio. Inserir estas na placa apropriada. Guardar as outras no refrigerador fechadas.
2. Adicionar 50 μL do tampão diluente do padrão aos tubos zero. Os poços reservados para o branco do cromógeno devem ficar vazios.
3. Adicionar 50 μL dos padrões, amostras ou controles aos poços apropriados.
4. Pipetar 50 μL do conjugado (anti-IFN- γ biotilado) em cada poço, exceto no branco do cromógeno. Bater cuidadosamente do lado da placa para misturar.
5. Cobrir a placa com o papel adesivo adequado e incubar por 1 hora e meia à temperatura ambiente.
6. Aspirar ou decantar a solução dos poços e descartar o líquido. Lavar os poços 4x.
7. Adicionar 100 μL da solução de trabalho de Estreptavidina-HRP a cada poço, exceto no branco do cromógeno.
8. Cobrir a placa com o papel adesivo adequado e incubar por 45 min. à temperatura ambiente.
9. Aspirar ou decantar a solução dos poços e descartar o líquido. Lavar os poços 4x.
10. Adicionar 100 μL de cromógeno estabilizado a cada poço. O líquido do poço começará a ficar azul.
11. Incubar por 30 min. à temperatura ambiente e no escuro. Nota: não cobrir a placa com papel alumínio. O tempo de incubação do substrato cromógeno é sempre determinado pelo leitor usado. Muitos leitores têm a capacidade de ler até a DO de 2,0. Os valores devem ser monitorados e a reação do substrato parada antes dos poços positivos atingirem os limites do aparelho. Os valores de DO a 450 nm podem ser lidos após adicionar a solução de “stop” a cada poço. Se usar um leitor que lê somente até 2,0 DO, parar o ensaio após 20 a 25 min. (sugestão).

12. Adicionar 100 μL de solução “stop” a cada poço. Bater com cuidado do lado da placa para misturar. A solução nos poços mudará de azul para amarela.
13. Ler as absorvâncias de cada poço a 450 nm , zerando com o branco do cromógeno, composto de 100 μL de cromógeno estabilizado e solução “stop”. Ler as placas dentro de 2 horas após a adição da solução “stop”.
14. Plotar num gráfico as absorvâncias dos padrões contra as suas concentrações. Desenhar a melhor curva usando estes pontos.
15. Ler as concentrações de IFN- γ para as amostras desconhecidas e controles da curva plotada. Amostras que produzirem resultados maiores que 1000 $\mu\text{g/mL}$ devem ser diluídas em tampão diluente de padrão e reanalisadas, multiplicando-se a concentração encontrada pelo fator de diluição.

KIT ELISA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE IL-6 HUMANA
(BIOSOURCE[®], Nivelles, Belgium, Europe)

Preparação dos reagentes e estocagem

Reconstituição e diluição do padrão de IL-6:

nota: tubos plásticos ou de vidro podem ser usados para a diluição do padrão.

1. Reconstituir o padrão a 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ com o tampão diluente do padrão. Ler a bula. Misturar delicadamente e esperar 10 min. para a completa dissolução. Usar o padrão até uma hora após a reconstituição.
2. Adicionar 0,200 mL do padrão reconstituído a um tubo contendo 0,800 mL do tampão diluente do padrão. Marcar como 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IL-6. Misturar.
3. Adicionar 0,300 mL de tampão diluente do padrão a cada um dos 6 tubos marcados: 250/ 125/ 62,5/ 31,2/ 15,6 e 7,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IL-6.
4. Fazer diluições seriadas do padrão como descrito abaixo. Misturar entre os passos.

Diluição do padrão de IL-6

PADRÃO ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	ADICIONAR	ADICIONAR ANTES
500	Prepare como descrito no passo 2	
250	0,300 mL do 500	0,300 mL do Tampão Diluente
125	0,300 mL do 250	0,300 mL do Tampão Diluente
62,5	0,300 mL do 125	0,300 mL do Tampão Diluente
31,2	0,300 mL do 62,5	0,300 mL do Tampão Diluente
15,6	0,300 mL do 31,2	0,300 mL do Tampão Diluente

7,8	0,300 mL do 15,6	0,300 mL do Tampão Diluente
0	0,300 mL do Tampão Diluente	Um tubo vazio

5. Descartar todos os padrões diluídos e reagentes reconstituídos. Retornar o tampão ao refrigerador.

Estocagem e diluição final da Estreptividina-HRP

Nota: A Estreptividina-HRP 100x concentrada está em 50% de glicerol. Esta solução é viscosa.

Deixar a solução atingir a temperatura ambiente. Misturar cuidadosamente. Pipetar a solução devagar. Remover o excesso da pipeta limpando a ponteira num papel absorvente.

1. Diluir 10 μ L desta solução concentrada com 1 mL de diluente de Estreptividina-HRP para cada tira (8 poços) usada no ensaio. Marcar como solução de trabalho de Estreptividina-HRP.

Tiras de 8 poços	Volume de Estreptividina-HRP concentrada (μL)	Volume de Diluente (mL)
2	20	2
4	40	4
6	60	6
8	80	8
10	100	10
12	120	12

2. Retornar o concentrado de Estreptividina-HRP ao refrigerador.

Diluição do tampão de lavagem

1. Deixar o concentrado 25x alcançar a temperatura ambiente e misturar até que todo precipitado se dissolva. Diluir um volume de 25x de tampão de lavagem concentrado com 24 volumes de água deionizada (ex. 50 mL podem ser diluídos a 1,25 L, 100 mL podem ser diluídos ba 2,5 L). Marcar como solução de trabalho do tampão de lavagem.
2. Guardar ambos, o concentrado e a solução de trabalho, no refrigerador. O tampão diluído pode ser usado dentro de 14 dias.

Método: procedimentos e cálculos

Deixar todos os reagentes à temperatura ambiente antes do uso.

Nota: Uma curva padrão deve ser construída em cada ensaio.

1. Determinar o número de tiras (8 poços) necessárias ao ensaio. Inserir estas na placa apropriada. Guardar as outras no refrigerador fechadas.
2. Adicionar 100 μL do tampão diluente do padrão aos tubos zero. Os poços reservados para branco do cromógeno devem ficar vazios.
3. Adicionar 100 μL dos padrões, amostras ou controles aos poços apropriados.
4. Pipetar 50 μL do conjugado (anti-IL-6 biotinilado) em cada poço, exceto no branco do cromógeno. Bater cuidadosamente do lado da placa para misturar.
5. Cobrir a placa com o papel adesivo adequado e incubar por 2 horas à temperatura ambiente.
6. Aspirar ou decantar a solução dos poços e descartar o líquido. Lavar os poços 4x.
7. Adicionar 100 μL da solução de trabalho de Estreptavidina-HRP a cada poço, exceto no branco do cromógeno.
8. Cobrir a placa com o papel adesivo adequado e incubar por 30 min. à temperatura ambiente.
9. Aspirar ou decantar a solução dos poços e descartar o líquido. Lavar os poços 4x.
10. Adicionar 100 μL de cromógeno estabilizado a cada poço. O líquido do poço começará a ficar azul.
11. Incubar por 30 min. à temperatura ambiente e no escuro. Nota: não cobrir a placa com papel alumínio. O tempo de incubação do substrato cromógeno é sempre determinado pelo leitor usado. Muitos leitores têm a capacidade de ler até a DO de 2,0. Os valores devem ser monitorados e a reação do substrato parada antes dos poços positivos atingirem os limites do aparelho. Os valores de DO a 450 nm podem ser lidos após adicionar a solução de “stop” a cada poço. Se usar um leitor que lê somente até 2,0 DO, parar o ensaio após 20 a 25 min. (sugestão).

12. Adicionar 100 μL de solução “stop” a cada poço. Bater com cuidado do lado da placa para misturar. A solução nos poços mudará de azul para amarela.
13. Ler as absorvâncias de cada poço a 450 nm, zerando com o branco do cromógeno, composto de 100 μL de cromógeno estabilizado e solução “stop”. Ler as placas dentro de 2 horas após a adição da solução “stop”.
14. Plotar num gráfico as absorvâncias dos padrões contra as suas concentrações. Desenhar a melhor curva usando estes pontos.
15. Ler as concentrações de IL-6 para as amostras desconhecidas e controles da curva plotada. Amostras que produzirem resultados maiores que 500 $\rho\text{g}/\text{mL}$ devem ser diluídas em tampão diluente de padrão e reanalisadas, multiplicando-se a concentração encontrada pelo fator de diluição.

**KIT ENZYME AMPLIFIED SENSITIVITY IMMUNOASSAY (EASIA)
PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE IL-10 HUMANA
(BIOSOURCE®,
Nivelles, Belgium, Europe)**

Preparação dos reagentes

Padrões, controles e solução A: Reconstituir os padrões liofilizados, controles e a solução A ao volume especificado com água destilada. Esperar a completa dissolução e então misturar delicadamente.

Solução de lavagem: Diluir 2 mL de solução de lavagem concentrada em 400 mL de água destilada ou todo o conteúdo da solução em 2000 mL de água destilada (usar um homogenizador magnético).

Solução cromogênica: Pipetar 0,2 mL da solução cromogênica concentrada (TMB) em um dos tubos de tampão do substrato (H₂O₂ em tampão acetato/citrato). Preparação extemporânea é necessária. Usar somente à temperatura ambiente. A solução cromogênica é estável por no máximo 15 min.. Evitar exposição direta à luz.

Estocagem e tempo de vida dos reagentes

1. O conjugado deve ser estocado de 2 a 8°C.
2. Os padrões, controles e a solução A são estáveis por 4 dias a 2-8°C. Alíquotas devem ser congeladas por longos períodos de tempo, no máximo por 2 meses a -20°C ou a -70°C até a data de expiração.
3. Guardar as tiras a 2-8°C no pacote fechado contendo o dessecante.
4. A solução concentrada de lavagem é estável à temperatura ambiente até a data de expiração. É recomendado que se prepare uma solução fresca no dia de uso.

5. A solução cromogênica preparada na hora é estável por no máximo 15 min. à temperatura ambiente.

Procedimento

1. Deixar as amostras e reagentes alcançarem a temperatura ambiente (18 a 25°C) antes do ensaio. Misturar os reagentes e amostras antes do uso.
2. A curva padrão deve ser corrida em cada ensaio ou placa corrida.
3. Selecionar o número de tiras para a corrida.
4. Pipetar 100 µL da solução B em todos os poços.
5. Pipetar 100 µL de cada padrão, controle ou amostra nos poços apropriados.
6. Incubar por 2 horas à temperatura ambiente (18 a 25°C) em um agitador horizontal (700 rpm).
7. Aspirar o líquido de cada poço.
8. Lavar a placa três vezes:
 - Adicionar 0,4 mL de solução de lavagem a cada poço;
 - Aspirar o conteúdo do poço.
9. Pipetar 100 µL da solução A, então 50 µL do conjugado anti- IL-10 em todos os poços.
10. Incubar por 2 horas à temperatura ambiente (18 a 25°C) em um agitador horizontal (700 rpm).
11. Aspirar o líquido de cada poço.
12. Lavar a placa três vezes:
 - Adicionar 0,4 mL de solução de lavagem a cada poço;
 - Aspirar o conteúdo do poço.
13. Pipetar 200 µL de solução cromogênica fresca em cada poço dentro de 15 min. seguindo a lavagem.
14. Incubar a placa por 30 min. à temperatura ambiente em um agitador horizontal (700 rpm), evitando exposição direta à luz.
15. Pipetar 50 µL de solução “stop” em cada poço.
16. Ler as absorvâncias a 450 nm e 490 nm (filtro de referência: 630 ou 650 nm) dentro de três horas e calcular os resultados.

**KIT ENZYME AMPLIFIED SENSITIVITY IMMUNOASSAY (EASIA)
PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE TGF- β 1 HUMANO
(BIOSOURCE[®], Nivelles, Belgium, Europe)**

Preparação de reagentes

Curva padrão para TGF- β 1: uma curva padrão deve ser incluída em cada corrida. Reconstituir um padrão liofilizado de TGF- β 1 com o tampão de diluição. Em tubos de polipropileno, fazer 5 diluições seriadas com o tampão de diluição, como descrito abaixo:

Diluições do padrão	Padrão	Volume do tampão de diluição adicionado
1/5	0,2 mL padrão	0,8 mL
1/25	0,2 mL padrão 1/5	0,8 mL
1/125	0,2 mL padrão 1/25	0,8 mL

Controles: Reconstituir os controles com 0,5 mL de água destilada.

Solução de lavagem: diluir o conteúdo da solução de lavagem em 2000 mL de água destilada.

Extração da amostra

Este passo é necessário para a liberação de TGF- β 1 dos complexos latentes, tornando-o acessível para a sua quantificação.

Amostras de soro devem ser depletadas de plaquetas antes deste passo. Em um tubo de polipropileno, adicionar:

- 0,1 mL de cada amostra e controle;
- 0,1 mL de ácido acético (2,5 M)
- Agitar no vórtex. Incubar 15 min., à temperatura ambiente.
- Diluir 20 μ L/ 500 μ L com o tampão de diluição, em tubos de polipropileno.
- Exemplo: 20 μ L em 0,5 mL de tampão de diluição.

- Após este passo da extração, as amostras são diluídas 1/52.

Procedimento

1. Deixar as amostras e reagentes alcançarem a temperatura ambiente (18 a 25° C) antes do ensaio. Misturar os reagentes e amostras antes do uso.
2. A curva padrão deve ser corrida em cada ensaio ou placa usada.
3. Selecionar o número de tiras para a corrida.
4. Pipetar 100 µL de cada padrão e amostra (após a extração) nos poços apropriados.
5. Pipetar 50 µL do conjugado anti-TGF-β1-HRP em todos os poços.
6. Incubar por 2 horas à temperatura ambiente (18 a 25° C) em um agitador horizontal (700 rpm).
7. Aspirar o líquido de cada poço.
8. Lavar a placa três vezes:
 - Adicionar 0,4 mL de solução de lavagem a cada poço;
 - Aspirar o conteúdo do poço.
9. Pipetar 100 µL da solução cromogênica em cada poço, dentro de 15 min. seguindo a lavagem.
10. Incubar a placa por 30 min. à temperatura ambiente em um agitador horizontal (700 rpm), evitando exposição direta à luz.
11. Pipetar 100 µL de solução “stop” em cada poço.
12. Ler as absorvâncias a 450 nm (filtro de referência: 650 nm) dentro de três horas e calcular os resultados. Para cada padrão ou amostra, calcular:

DO (padrão ou amostra) x 100/ DO padrão zero.

Obs: Os resultados devem ser multiplicados por 52 para se obter as concentrações de TGF-β1 nas amostras.