

**MARCELO ADDAS CARVALHO**

**EFEITO DE POLIMORFISMOS DO GENE DA  
INTERLEUCINA-1 (IL-1), IL-6, IL-10 E FATOR DE  
NECROSE TUMORAL NA OCORRÊNCIA DE REAÇÃO  
TRANSFUSIONAL FEBRIL NÃO HEMOLÍTICA**



**UNICAMP**

**Campinas  
2005**

**MARCELO ADDAS CARVALHO**

**EFEITO DE POLIMORFISMOS DO GENE DA  
INTERLEUCINA-1 (IL-1), IL-6, IL-10 E FATOR DE  
NECROSE TUMORAL NA OCORRÊNCIA DE REAÇÃO  
TRANSFUSIONAL FEBRIL NÃO HEMOLÍTICA**

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 Concentração Hematologia e Hemoterapia.

***Orientadora: Profa. Dra. Sara T. O. Saad***

**Campinas**

**2005**

*FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP  
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044*

C253e Carvalho, Marcelo Addas  
Efeito de polimorfismos do gene da interleucina-1(IL-1), IL-6,IL-10 e fator de necrose tumoral na ocorrência de reação transfusional febril não hemolítica / Marcelo Addas Carvalho. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador : Sara Teresinha Olalla Saad  
Tese ( Doutorado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Transfusão de sangue. 2. Citocinas. 3. Polimorfismo. 4. Gene. I. Saad, Sara Teresinha Olalla. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(slp/fcm)

---

**Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado**

---

---


**Orientador(a):** *Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad*


---

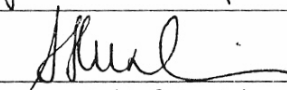
---

**Membros:**

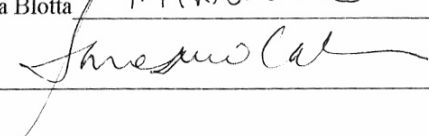
---

1. Prof(a). Dr(a). Dimas Tadeu Coyas 

2. Prof(a). Dr(a). José Orlando Bordin 

3. Prof(a). Dr(a). Simone Cristina Olenscki Gilli 

4. Prof(a). Dr(a). Maria Heloisa de Souza Lima Blotta 

5. Prof(a). Dr(a). Sara Teresinha Olalla Saad 

---

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

---

**Data: 23/11/2005**

---

## ***Dedicatória***

Dedico esta tese a meus pais, Edgard e Norma, que sempre me apóiam em todos os momentos difíceis e a minha sobrinha Victória – uma alegria nova na família.

## ***Agradecimentos***

Agradeço a toda equipe de médicos do Hemocentro da UNICAMP em especial a Dra. Simone e Dra. Maria de Lourdes, aos biólogos que apoiaram este trabalho e principalmente a Teresa e ao Paulo pela paciência e colaboração, a Maria Helena e Elizabeth pelo apoio no dia a dia e finalmente a Profa. Dra. Sara Saad pela confiança no início de minha carreira e pelo exemplo como pessoa, pesquisadora e profissional.

*O pensamento se manifesta como uma palavra;  
A palavra se transforma em uma ação;  
A ação se desenvolve como um hábito;  
E o hábito se cristaliza em um temperamento;  
Portanto, observe com cuidado os pensamentos e seus resultados;  
E faça com que eles brotem do amor  
E do respeito para com todos os seres...  
Da mesma forma que a sombra segue o corpo  
Nós nos tornamos aquilo que pensamos*

***DHAMMAPADA (As palavras do Buda)***

# SUMÁRIO

---

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
Reações Transfusionais .....	30
Reação hemolítica a transfusão .....	30
Reações alérgicas e anafiláticas.....	32
Reação Febril Não Hemolítica (RFNH).....	33
<b>INTERLEUCINAS.....</b>	<b>36</b>
IL-1.....	36
IL-6.....	38
IL-10.....	39
Fator de Necrose Tumoral (TNF).....	41
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
I. Pacientes e grupo controle .....	51
II. Métodos .....	51
Estudo do polimorfismo gênico .....	51
Seqüenciamento automatizado para identificação dos polimorfismos <i>IL10</i> -1082G/A e -819C/T .....	54
Seqüenciamento para confirmação do alelo <i>IL1RN</i> *0.....	55
Análise da expressão do gene <i>IL1RN</i> (alelo <i>IL1RN</i> *0) por método RT-PCR semiquantitativo .....	55
Dosagem de IL1- $\beta$ e TNF- $\alpha$ nos concentrado de plaquetas .....	57
Produção de Concentrado de Plaquetas de Plasma Rico em Plaquetas (CP-PRP) ou por Aférese (CP-AF) .....	57
Obtenção das amostras .....	57



Dosagem de citocinas por método imuno-enzimático (EIA): .....	58
Métodos estatísticos.....	58
Análise populacional.....	58
Análise das dosagens de IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ no CP .....	58
Análise genotípica da população de pacientes multitransfundidos.....	59
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
Análise Populacional .....	63
Polimorfismo do complexo do gene <i>IL1B</i> .....	63
Polimorfismo do gene <i>IL6</i> .....	64
Polimorfismo dos genes <i>TNF</i> e <i>LTA</i> .....	65
Expressão do gene <i>IL1RN</i> associado ao genótipo 1/0 (alelo <i>IL1RN*0</i> ) .....	65
Estudo do acúmulo de IL1 $\beta$ e TNF em Concentrado de plaquetas (CP-PRP) e os polimorfismos <i>IL1B</i> , <i>IL1RN</i> e <i>TNF</i> .....	66
Análise do concentrados de plaquetas (CP) .....	66
Dosagem de citocinas .....	66
Frequência dos polimorfismos gênicos dos doadores de CP-PRP .....	67
Correlação entre dosagem de citocinas e os polimorfismos gênicos .....	67
Estudo de grupo de pacientes multitransfundidos e ocorrência de reação febril não hemolítica precoce .....	68
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>87</b>
Análise Populacional .....	91
Polimorfismo <i>IL1RN*0</i> e expressão gênica .....	93
Acúmulo de citocinas e polimorfismo gênico nos CP .....	94
Ocorrência de RFNH e polimorfismo gênico .....	97
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>101</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>119</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

---

**BE** - brometo de etídio

**CP** - concentrado de plaquetas

**CP-RPP** – concentrado de plaquetas obtidos de plasma rico em plaquetas

**CP-AF** – concentrado de plaquetas obtidos por aférese

**DNA** – ácido desoxiribonucleico

**EH-W** – equilíbrio de Hardy-Weinberg

**EIA** – método imuno-enzimático

**HLA** – *human leukocyte antigen*

**HNA** – *human neutrophil antigen*

**HIV** – *human immunodeficiency vírus*

**LPS** – lipopolissacaride

**MBRI** – mediador biológico da resposta imune

**NFIL6** - *nuclear factor interleukin-6*

**NF $\kappa$ B** – *nuclear factor kappa B*

**RFNH** – reação febril não hemolítica

**RFNHP** – reação febril não hemolítica precoce

**RNA** – ácido ribonucleico

**RNA<sub>m</sub>** – RNA mensageiro

**ST** – sangue total

**VNTR** – *variable number of tander repeats*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

---

- Figura 1.** Gel de eletroforese demonstrando o polimorfismo do gene *IL1RN* intron 2, VNTR: genótipo 1/1 (posição 1), 1/2 (posição 2), 2/2 (posição 3), 2/4 (posição 4), 1/5 (posição 5), 2/3 (posição 6), 1/0 (posição 7). A seta identifica ao variante rara com 154-bp, contendo somente uma repetição do fragmento de 86-bp (*IL1RN\*0*, alelo 0). Posição M: marcador de DNA 100 bp ladder. .... 81
- Figura 2.** Efeito da estimulação com LPS na produção de *IL1RN* RNA em sangue total de doadores voluntários com diferentes genótipos do polimorfismo *IL1RN* intron 2 VNTR (A 1/1, B 2/2 e C 1/0). Demonstram-se os resultados como razão obtida pela normalização através da comparação com a expressão do gene da  $\beta$ -actina (razão *IL1RN*/ $\beta$ -actina). Reação em conjunto..... 82
- Figure 3.** Comparação dos níveis de IL-1 $\beta$  e TNF em CP-PRP durante o armazenamento (início no dia 3 – D3 e término no dia 7 – D7). Cada linha representa a dosagem de uma unidade de CP. Os valores inferiores à sensibilidade do teste não foram demonstrados. A) dosagens de IL-1 $\beta$  nos dias 3, 5 e 7, estes níveis de citocinas são maiores em cada amostra comparadas com a dosagem anterior e com o D3 ( $p < 0,05$ ). B) os mesmos resultados são observados na avaliação dos níveis de TNF- $\alpha$ . .... 83
- Figura 4.** Níveis de IL-1 beta (IL-1 $\beta$ ) no sobrenadante de CP-PRP durante o armazenamento associado como os polimorfismos do gene *IL1B* -511C/T (A e B) e +3953C/T (C). A análise estatística utilizando-se o teste de Wilcoxon ( $p < 0,05$ ) é demonstrada por \* $p < 0,05$  ou \*\* NS ( $p > 0,05$ ). .... 84
- Figura 5.** Níveis de TNF no sobrenadante de CP-PRP durante o armazenamento associado com o polimorfismo *TNF* -308G/A. A análise estatística utilizando-se o teste de Wilcoxon ( $p < 0,05$ ) é demonstrada por \* $p < 0,05$  ou \*\* NS ( $p > 0,05$ ). .... 85

# LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Frequência genotípica dos polimorfismos gênicos *IL1B* -511C/T e +3953C/T, *IL1RN* intron 2 VNTR, *IL6* -174G/C, *TNF* -308G/A e *LTA*+252G/A na população controle constituída por doadores voluntários de sangue da região de Campinas (sudeste do Estado de São Paulo) (GRUPO CONTROLE). Análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg da frequência gênica usando teste Chi-quadrado: DF=1, se  $p > 0,05$  em EH-W..... 70
- Tabela 2.** Comparação das frequências genotípicas dos polimorfismos *IL1B* -511C/T e +3953C/T, *IL1RN* intron 2 VNTR, *IL6* -174G/C, *TNF* -308G/A e *LTA*+252G/A entre diferentes populações e a população estudada. Os resultados em negrito assinalam diferenças significativas quando comparados com a população da região de Campinas (testes  $\chi^2$ , com  $p < 0,05$ )..... 72
- Tabela 3.** Tabela demonstrando resultados de contagem de leucócitos (Lo) e plaquetas (PLT), níveis de citocinas nos CP-PRP durante armazenamento e polimorfismos *IL1B*-511C/T e +3953C/T, *IL1RN* intron 2 e *TNF*-308G/A. \* Valores expressos em Média (Faixa) Mediana. § Valores expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão (Mediana). ..... 74
- Tabela 4.** Frequência genotípica dos polimorfismos *IL1B*-511C/T e +3953C/T, *IL1RN* intron 2 e *TNF*-308G/A nos doadores voluntários de sangue para obtenção dos CP-PRP estudados. Análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg da frequência gênica usando teste Chi-quadrado: \* DF=1,  $\chi^2=0,525$ ,  $p > 0,05$  (EH-W), \*\* DF=1,  $\chi^2=0,048$ ,  $p > 0,05$  (EH-W), § DF=3,  $\chi^2=0,830$ ,  $p > 0,05$  (EH-W) e §§ DF=1,  $\chi^2=0,133$ ,  $p > 0,05$  (EH-W). ..... 75
- Tabela 5.** Características básicas dos pacientes: idade (Média  $\pm$  DP (Faixa) Mediana em anos), sexo e diagnóstico..... 76
- Tabela 6.** Frequência genotípica dos polimorfismos dos genes *IL1B*-511C/T e +3953C/T, *IL1RN* intron 2, *IL6*-174G/C, *TNF*-308G/A, *LTA*+252G/A, *IL10*+1082G/A e *IL10*+819C/T em pacientes multitransfundidos. Testes estatísticos: Teste  $\chi^2$  ou Fisher Teste; Não significativo (NS) se  $p \geq 0,05$ . ..... 77
- Tabela 7.** Frequência genotípica dos polimorfismos gênicos *IL1B* -511C/T e +3953C/T, *IL1RN* intron 2, VNTR, *IL6* -174G/C, *TNF* -308G/A, *LTA*+252G/A, *IL10*+1082G/A e *IL10*+819C/T e os fenótipos prováveis associados nos pacientes multitransfundidos estudados. Análise estatística comparando grupo controle e de pacientes com antecedente de RFNH precoce (RFNHP) e sem RFNH (OR – Odds Ratio, 95% intervalo de confiança, Fteste - Fisher Teste e  $\chi^2$  - Teste Chi-quadrado). ..... 78

## RESUMO

---

Citocinas inflamatórias como IL-1 $\alpha$  e  $\beta$ , IL-1RA, IL-6, IL-10 e TNF estão envolvidas na resposta imune inclusive na ocorrência de reação febril não hemolítica. Podem acumular nos concentrados de plaquetas (CPs) durante o armazenamento ou serem liberadas por células do receptor de transfusão. Alguns polimorfismos dos genes destas citocinas interferem na produção frente a estímulos. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a importância dos polimorfismos *IL1B*-511C/T, *IL1*+3953C/T, *IL1RN* intron2 VNTR, *IL6*-174G/C, *IL10*-1082G/A, *IL10*-819C/T, *TNF*308G/A e *TNF*+252G/A em pacientes multitransfundidos e em doadores de sangue, utilizado para produção de CPs, através da avaliação da ocorrência precoce de RFNH associada a transfusão de concentrado de hemácias ou do acúmulo de IL-1 $\alpha$  e  $\beta$ , IL-1RA e TNF nos CPs. Utilizamos o método PCR e digestão com enzimas de restrição (PCR-RFLP) ou sequenciamento automatizado para identificações destes polimorfismos. Em nossa amostra de população da região de Campinas, São Paulo, encontramos frequências genotípicas comparáveis às populações européia e norte americana e diferenças significativas das populações asiática e de origem africana. O raro alelo *IL1RN*\*0 foi identificado em nosso grupo, não foi demonstrado interferência deste alelo, em heterozigose, na expressão do gene *IL1RN* em modelo *in vitro*. Nos CPs obtidos de plasma rico em plaquetas (CP-PRP) foi observado maior acúmulo de IL-1 $\beta$  nos doadores *IL1B*-511CC, evidenciado no D5 e D7 de armazenamento. Foi observada correlação inversa entre o conteúdo de plaquetas nos CP-PRP e o acúmulo de IL-1 $\beta$  e TNF, não havendo correlação com a contaminação leucocitária. Não houve acúmulo de IL-1 $\alpha$  e IL-1RA durante o armazenamento. No grupo de pacientes multitransfundidos, o alelo *IL1RN*\*2 e o genótipo *IL1RN*\*2.2 correlacionaram-se com a ocorrência de RFNH precoce. Concluímos que, o estudo de características genéticas dos doadores de sangue e pacientes pode ajudar a esclarecer as variações de ocorrência e gravidade dos efeitos adversos associados à transfusão de sangue, identificando grupos de maior risco e delinea uma nova linha de investigação.

## **ABSTRACT**

---

Inflammatory cytokines such as IL-1 $\alpha$  e  $\beta$ , IL-1RA, IL-6, IL-10 and TNF have been related with immune responses including febrile non-hemolytic reactions. These biological mediators may accumulate in platelet concentrates (PCs) during storage or be secreted by receptor immune cells. Many cytokine gene polymorphisms interfere in the production of cytokines after stimulus. The present study aims to value the significance of polymorphisms *IL1B*-511C/T, *IL1B*+3953C/T, *IL1RN* intron2 VNTR, *IL6*-174G/C, *IL10*-1082G/A, *IL10*-819C/T, *TNF*308G/A and *TNF*+252G/A in multitransfused patients and in PCs donors using the evaluation of precocious FNHTR occurrence associated with red blood cells (RBCs) transfusion or accumulations of IL-1 $\alpha$  e  $\beta$ , IL-1RA and TNF in PCs during storage. The methods used were based on PCR and restriction enzymes (PCR-RFLP) or automated DNA sequencing for polymorphism characterizations. In our population sample from Campinas, southeast Brazilian region, we detected similar genotype frequencies to European and North American populations and significant differences to the Asiatic and African ones. A rare allele *IL1RN*\*0 was detected in our control group, we did not demonstrate the interference of this allele in heterozygosity, in the *IL1RN* gene expression in the *in vitro* model. In PCs from plasma rich in platelet (PRP-PC), we observed increased IL-1 $\beta$  accumulation in PCs from *IL1B*-511CC blood donors on storage days 5 and 7 (D5 and D7). IL-1 $\beta$  and TNF levels were inversely correlated with platelet content in PRP-PCs and no correlation with leukocyte content. There was no increase in IL-1 $\alpha$  e IL-1RA levels during storage. In the multitransfused patients group, the *IL1RN*\*2 allele and *IL1RN*\*2.2 genotype were correlated with the occurrence of precocious FNHTR. We concluded that studies of genotypic characteristics of blood donors and patients might contribute to explain the variations in frequencies and gravity of side effects related with blood transfusion characterizing high risk groups and may outline a new and promising investigation field.

# ***INTRODUÇÃO***

---

A atividade hemoterápica vem, no decorrer das últimas décadas, se desenvolvendo de maneira significativa. A transfusão de sangue e hemocomponentes alogênicos resulta na infusão de grande quantidade de antígenos estranhos ao receptor, tanto solúveis como associados a células. Esta exposição a antígenos e a células imunocompetentes do doador pode induzir ativação imune e imunossupressão. A primeira é expressa pela indução da produção de anticorpos contra antígenos celulares e ativação de linfócitos T, enquanto que a última está associada ao aumento da sobrevida de transplantes e ocorrência de complicações como infecção e recidiva de doença neoplásica. Este efeito de imunossupressão foi identificado, inicialmente na década de 70, quando vários autores descreveram o aumento da sobrevida dos rins transplantados nos receptores que recebiam, precedendo o procedimento, transfusões de concentrado de hemácias de doadores não relacionados ou de alíquotas de sangue total do futuro doador do órgão. Esta diferença foi ainda percebida mesmo após introdução de potentes drogas imunossupressoras na profilaxia de rejeição de transplantes (OPELZ et al., 1997). Portanto, este efeito imunomodulador e às vezes imunossupressor, desencadeado pela transfusão de componentes celulares como concentrado de hemácias e plaquetas, vem chamando a atenção dos pesquisadores (VAMVAKAS e BLAJCHMAN, 2001; VAMVAKAS, 2003; VAMVAKAS, 2004).

Recentes estudos têm sido desenvolvidos para o conhecimento mais detalhado dos mecanismos imunes envolvidos na alo-imunização contra antígenos das células sanguíneas transfundidas como antígenos eritrocitários, leucocitários e plaquetários. A alo-imunização pode ser definida como a resposta imune do receptor contra tecidos de indivíduos ou doadores geneticamente diferentes, mas da mesma espécie (SEMPLE e FREEDMAN, 2002). Torna-se, deste modo, importante o conhecimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na alo-imunização, bem como os mecanismos fisiológicos envolvidos nas reações transfusionais, permitindo assim o desenvolvimento de métodos profiláticos e de tratamento mais adequados.



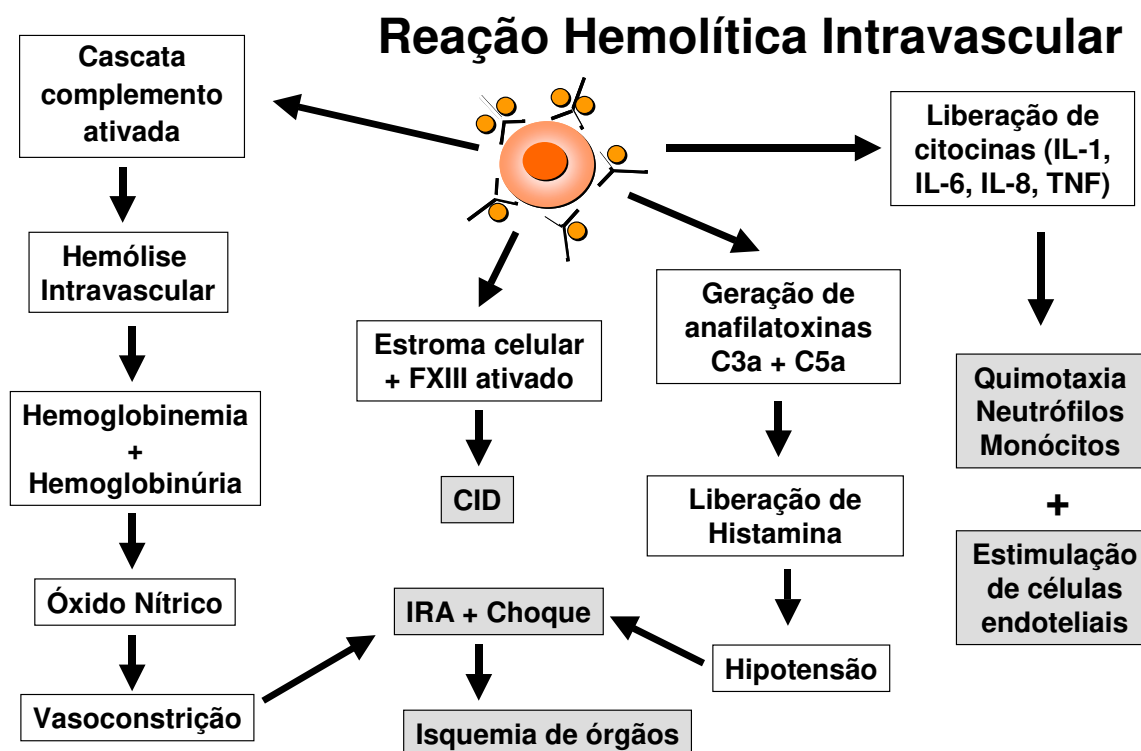
## **Reações Transfusionais**

As reações transfusionais podem ser classificadas didaticamente em:

### ***Reação hemolítica a transfusão***

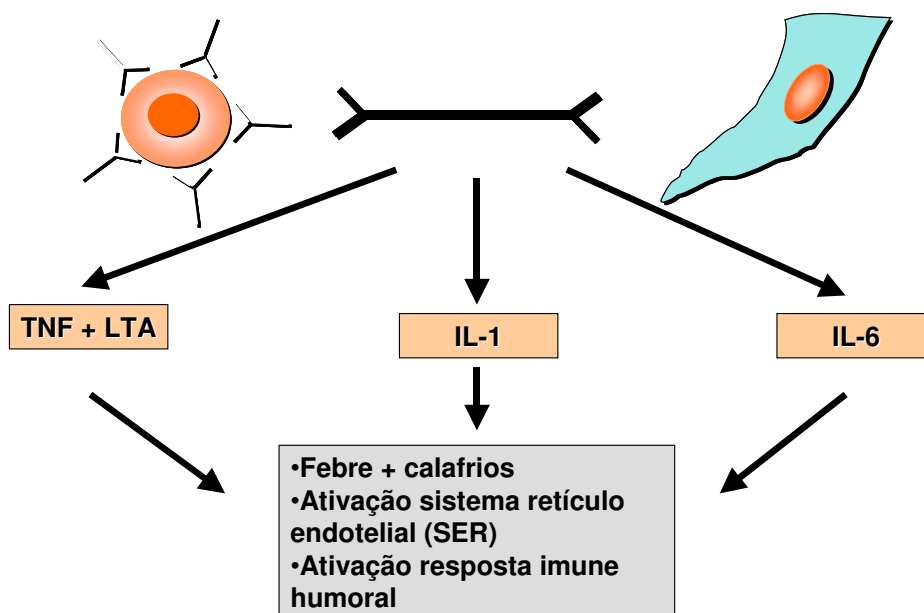
A reação hemolítica é a lise ou destruição acelerada das hemácias transfundidas devido à incompatibilidade imunológica entre o sangue transfundido e o receptor. Esta destruição está associada aos alo-anticorpos presentes no receptor contra antígenos eritrocitários do doador.

A reação hemolítica pode ser ***intravascular***, onde encontramos lise das hemácias transfundidas através da ativação da cascata do complemento levando a presença de hemoglobinemia e hemoglobinúria. Os sinais e sintomas mais freqüentes são febre, calafrios, taquicardia, dor lombar, hipotensão, pré-cordialgia e em casos graves podemos ter desenvolvimento de coagulopatia intravascular disseminada (CID) e insuficiência renal aguda (IRA). Estes sinais e sintomas são secundários ao aumento dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias principalmente interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF). A atividade pirogênica destes imunomoduladores são mediadas por prostaglandinas (PGs) liberadas ou por efeito direto da IL-6 no hipotálamo (SNC) (LUHESHI e ROTHWELL, 1996). Aparentemente esta elevação dos níveis séricos destas substâncias se deve ao aumento da expressão gênica secundária ao estímulo imune mediado pela atividade do sistema complemento (SCHINDLER et al., 1990). Algumas quimocinas, como IL-8 e proteína quimiotática de monócitos-1 (*Monocyte Chemoattractants Protein-1* - MCP-1), liberadas das células endoteliais, também podem estar envolvidas nos mecanismos fisiopatológicos das reações hemolíticas intravascular (RHI) (CAPON e GOLDFINGER, 1995).



A hemólise **extravascular** manifesta-se mais tardiamente e está associada à fagocitose das hemácias transfundidas pelos macrófagos e/ou monócitos do sistema retículo-endotelial, sem ocorrer ativação da cascata do complemento. Alguns sintomas e sinais são mediados também por citocinas liberadas por vários tipos celulares - monócitos/macrófagos, linfócitos, neutrófilos e células endoteliais. DAVENPORT et al. (1994) observaram um incremento dos níveis de IL-1 $\beta$  e IL-6 no sobrenadante de cultura de células mononucleares em resposta a presença de hemácias sensibilizadas por anticorpos anti-eritrocitários da classe IgG. Estes mediadores imunes seriam responsáveis por sintomas associados à reação hemolítica extravascular (RHE) como a febre, da mesma forma que nas RHIs (DAVENPORT et al., 1993; DAVENPORT et al., 1994; DAVENPORT, 1995).

## Reação Hemolítica Extravascular



### ***Reações alérgicas e anafiláticas***

Os mecanismos das reações alérgicas, anafilactóides ou anafiláticas baseiam-se na interação entre um alérgeno e um anticorpo pré-existente do paciente da classe IgE. O alérgeno é um antígeno presente no hemocomponente e o anticorpo permanece ligado à superfície dos mastócitos ou basófilos circulantes. A reação antígeno-anticorpo leva à liberação de vários mediadores anafiláticos responsáveis pelos sinais e sintomas associados à reação transfusional. Entre os mediadores podemos citar aminas biogênicas (histamina, adenosina), fator quimiotático de neutrófilos e eosinófilos, enzimas (proteases e hidrolases ácidas) e proteoglicanas (heparina), além de mediadores secundários como leucotrienos (B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, E<sub>4</sub>), prostaglandina D<sub>2</sub>, fator ativador de plaquetas e citocinas (TNF- $\alpha$ , interleucina (IL)-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF) (VANVAKAS e PINEDA, 1996). Outro mecanismo pode ser proposto para as reações alérgicas, FREWIN et al. (1984) observou um incremento dos níveis de histamina em unidades de concentrado de hemácias, porém a importância clínica deste mediador ou de outros no desencadeamento das reações alérgicas ainda precisa de confirmação.

A incidência destas reações pode variar de 1-3% nas transfusões de plasma com quadros de manifestação leve até formas graves como o choque anafilático que apresenta baixa incidência (1:20.000-47.000). Os casos mais graves estão relacionados à deficiência de IgA e à presença de anticorpos contra esta classe de imunoglobulina (VANVAKAS e PINEDA, 1996).

### ***Reação Febril Não Hemolítica (RFNH)***

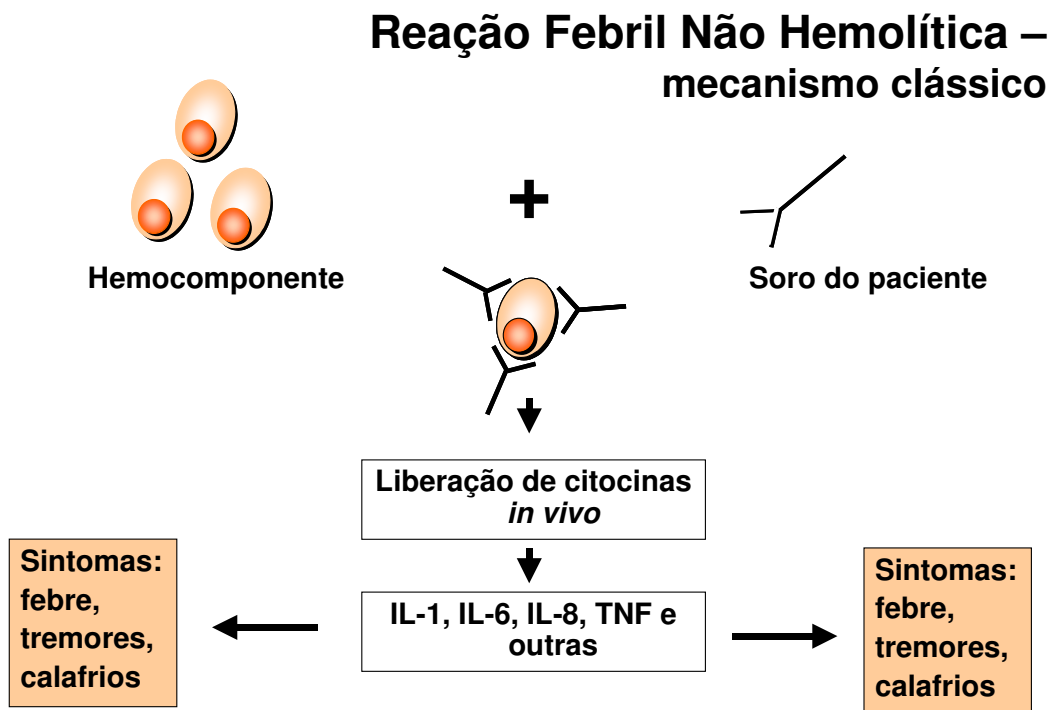
As reações febris não hemolíticas (RFNH) são freqüentes, ocorrendo em aproximadamente 1% das transfusões de concentrado de hemácias e em até 20-30% das transfusões de concentrado de plaquetas randômicas em pacientes submetidos a múltiplas transfusões (HEDDLE e KELTON, 1996). É definida como a ocorrência de febre (elevação superior a 1°C a partir da temperatura inicial), podendo estar associada a outras manifestações. Em alguns pacientes, a febre pode não aparecer, caracterizando-se a reação somente com a presença de tremores, calafrios e em alguns casos rigidez muscular.

Dois mecanismos estão associados ao aparecimento da RFNH:

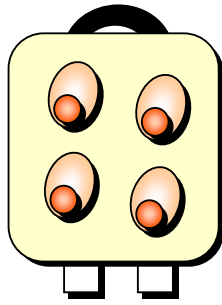
- reação mediada por anticorpos;
- reação mediada por mediadores biológicos da resposta inflamatória (MBRI) liberados no hemocomponente durante o armazenamento.

O primeiro mecanismo é o clássico, porém não explica todos os casos de RFNH. O receptor possui anticorpos, adquiridos por sensibilização prévia (gestações ou transfusões anteriores), contra antígenos leucocitários presentes no hemocomponente (sistema HLA ou HNA). A reação antígeno-anticorpo, com ou sem ativação do sistema complemento, leva à liberação de citocinas, que agem como substâncias pirogênicas endógenas, causando febre e sintomas associados. A origem destas citocinas ainda não está esclarecida, podem ser liberadas pelos leucócitos do hemocomponente ou por monócitos ou macrófagos do receptor. Porém, já se demonstrou que a liberação de TNF por estímulo de lipopolissacárides (LPS) é secundária ao aumento da tradução e não dependente do incremento da transcrição; o mesmo deve ocorrer na liberação de TNF associada a estímulos desencadeadores das RFNHs. Além disso, alguns polimorfismos dos genes das principais citocinas envolvidas nesta resposta inflamatória

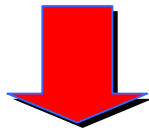
podem influenciar a capacidade de transcrição, desencadeando variações individuais na produção destas citocinas frente a estímulos semelhantes (DANIS et al., 1995; HURME e SANTILLA, 1998, WILSON et al., 1997).



O acúmulo de citocinas durante o armazenamento, principalmente IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF, e outros mediadores biológicos da resposta inflamatória (MBRI) como IL-8 e frações do complemento (C3a e C4a) nos hemocomponentes, predominantemente no concentrado de plaquetas, pode estar associado à ocorrência de RFNH (MUYLLE et al., 1993; STACK e BERKOWICZ, 1997). Esta liberação ocorre das células mononucleares e provavelmente está relacionada com a adesão das mesmas ao plástico das bolsas utilizadas para armazenamento (ELKATTAN et al., 1999). Ainda é necessário o esclarecimento se os níveis acumulados de MBRI são suficientes para desencadeamento de RFNH em todos os pacientes ou existe uma condição predisponente dos mesmos. Este mecanismo é considerado como o alternativo das RFNHs.



## Reação Febril Não Hemolítica mecanismo alternativo



Acúmulo  
de citocinas *in vitro*



**Sintomas:**  
febre + calafrios + tremores  
+hipotensão, etc.

### Armazenamento de CP

- Apoptose
- Adesão de células mononucleares ao plástico das bolsas
- Produção e liberação de citocinas
- Ativação do complemento
- Produção de histamina

Com base nestes achados, pode-se formular a hipótese de que a ocorrência das RFNHs em alguns pacientes pode estar associada a três grupos de fatores diferentes:

- **fatores associados ao componente** - observamos grandes variações dos níveis de citocinas acumuladas nos componentes mesmo que condições semelhantes sejam observadas como: tempo e condições de armazenamento, material da bolsa e características do componente; talvez esta diferença esteja relacionada com características do doador de sangue, p. ex. maior ou menor capacidade secretora de determinadas citocinas associada possivelmente às características genéticas (polimorfismos);
- **fatores associados ao estado clínico do paciente:** provavelmente níveis basais elevados de interleucinas e outros modificadores biológicos da resposta inflamatória (MBRI) (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF), predisporiam à ocorrência deste tipo de reação transfusional.

Corroborando esta hipótese, encontramos uma maior ocorrência de RFNH em pacientes graves, principalmente sépticos;

- **fatores associados as características genéticas do paciente:** vários trabalhos têm demonstrado que alguns polimorfismos dos genes de MBRI como IL-1, IL-6, IL-10 e TNF estão associados à capacidade secretora aumentada destas substâncias. Esta poderia estar relacionada com a resposta aumentada a estímulos externos como leucócitos presentes nos hemocomponentes ou outros antígenos, bem como um nível basal maior dos genes dos MBRI, desencadeando as manifestações clínicas associadas à secreção destes mediadores com maior facilidade e após estímulos de menor intensidade.

Um conhecimento dos mecanismos controladores da secreção de MBRI, principalmente das interleucinas, é importante para um melhor entendimento das reações transfusionais.

## ***INTERLEUCINAS***

### ***IL-1***

A interleucina 1 (IL-1) é uma citocina com grande atividade inflamatória e está envolvida em várias manifestações clínicas em humanos. Existem três membros da família da IL-1: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-1RA (antagonista do receptor). Dois tipos de receptores são encontrados nos humanos: tipo I (IL-1RI), que tem capacidade de tradução do sinal da IL-1, e tipo II (IL-1RII) que não traduz o sinal da ligação da IL-1, comportando-se como um “depósito” da IL-1 $\beta$  (DINARELLO, 1996; DINARELLO, 1997). A IL-1 apresenta um importante envolvimento na resposta imune inata que regula as funções do sistema imune adaptativo. O balaço entre a IL-1 e seu antagonista (IL-1RA) nos tecidos influencia o possível desenvolvimento de doenças inflamatórias resultando em lesão tecidual (AREND, 2002).

A IL-1 $\alpha$  e  $\beta$  atuam como pirógenos endógenos, juntamente com a IL-6 e TNF, agindo diretamente no hipotálamo ou indiretamente, levando o endotélio das regiões adjacentes ao centro regulador da temperatura no SNC a produzir PGE<sub>2</sub>, substância esta também desencadeadora de febre. Outros efeitos também estão relacionados com a IL-1 como:

adesão endotelial de neutrófilos e/ou monócitos e aumento da atividade pró-coagulante com ativação do fator VIII e da trombina (DINARELLO, 1996; DINARELLO, 1997).

A molécula da IL-1 $\beta$  é, contrariamente da forma  $\alpha$ , prontamente secretadas pelas células e seus níveis plasmáticos estão comumente associados a várias doenças imunes e/ou inflamatórias (DINARELLO e WOLFF, 1993). O acúmulo da IL-1 $\beta$  e de seu antagonista (IL-1RA) apresenta variações relativamente estáveis interindividuais definindo fenótipos de “altos” e “baixos” produtores. Estas variações podem depender de mecanismos de transcrição e/ou pós-transcrição; em ambos os casos polimorfismos dos genes da IL-1 $\beta$  (*IL1B*) e do IL1RA (*IL1RN*) podem estar envolvidos (POCIOT et al., 1992; DANIS et al., 1995; DINARELLO, 1997; SANTTILA et al., 1998; HURME e SANTTILA, 1998).

Existem dois polimorfismos bialélicos no *IL1B* que podem ser responsáveis pelas variações interindividuais descritas: na posição -511C/T da região promotora do gene (di GIOVINE et al., 1992) e na posição +3953C/T no quinto exon (POCIOT et al., 1992), renomeado por BENSEN et al. (2003) como 4336C/T. Em virtude desta última denominação ser pouco citada na literatura ela não será aqui utilizada. Estes polimorfismos têm sido associados com diferentes doenças imunes e infecciosas, bem como com o comportamento evolutivo diferenciado em doenças, onde o componente inflamatório é relevante (BIOQUE et al., 1995; EL-OMAR et al., 2000; GARCIA-GONZALEZ et al., 2001; AREND, 2002; MA et al., 2002).

O gene *IL1RN* possui um importante polimorfismo relacionado com o número de repetições de uma seqüência de 89 pares de bases (89bp) na região do intron 2. Seis padrões já foram definidos: alelo 1 (*IL1RN\*1*) com 4 repetições, alelo 2 (*IL1RN\*2*) com 2 repetições, alelo 3 (*ILRN\*3*) com 5 repetições, alelo 4 (*IL1RN\*4*) com 3 repetições, alelo 5 (*IL1RN\*5*) com 6 repetições e finalmente, um padrão descrito somente uma vez numa população caucasiana britânica, denominado alelo 0 (*IL1RN\*0*), com somente uma cópia do fragmento de repetição (TARLOW et al., 1993; VAMVAKOPOULOS et al., 2002). O alelo *IL1RN\*2* está relacionado com aumento da produção de IL-1 $\beta$  em modelos *in vitro* e em doenças auto-imunes e infecciosas (BLAKEMORE et al., 1994; RIDER et al., 2000; GARCIA-GONZALEZ et al., 2001; AREND, 2002; ARNALICH et al., 2002; MA et al., 2002).



## **IL-6**

A IL-6 foi assim denominada em 1993 (SHIZUO et al., 1993) e tem um efeito indutor do desenvolvimento da imunidade Th2: desencadeia a diferenciação terminal das células B em plasmócitos e aumenta a secreção de imunoglobulinas específicas pelos linfócitos B ativadas e a produção de imunoglobulinas policlonais pelos linfócitos B em repouso. Foi demonstrado também, que os plasmócitos continuam a proliferar se estimulados pela IL-6. Portanto, esta citocina está diretamente relacionada à produção de anticorpos e à resposta imune humoral (HUANG et al., 1999). Além da atividade relacionada com a diferenciação e estímulo de células B, a IL-6 possui atividade relacionada com a resposta da fase aguda, através de estimulação da resposta aguda hepática frente a infecções e/ou lesões, diferenciação e/ou ativação de macrófagos e células T, além de estímulo e suporte à hematopoiese (TERRY et al., 2000). Estes mesmos mecanismos de resposta inflamatória estão envolvidos no aumento da produção e/ou depósito na parede vascular de fibrinogênio (proteína de resposta da fase aguda), fato este relacionado com a ocorrência de doença aterosclerótica e trombo-embólica.

A regulação dos níveis séricos de IL-6 pode estar associada a estímulos indutores potentes desencadeados pelo TNF e IL-1. Além destes, outros controles genéticos podem estar envolvidos, principalmente através de polimorfismos em seqüências codificantes e/ou produtoras. OLOMOLAYAE et al. (1998) descreveu um polimorfismo na posição -174 da região promotora do gene *IL6* onde a troca de uma guanina (G) por uma citosina (C) está associada com uma redução dos níveis séricos de IL-6 em indivíduos saudáveis. Utilizando-se de um experimento de transfecção transitória em células HeLa com construção contendo os diferentes alelos na posição -174 da região 5', FISHERMAN et al. (1998) demonstraram que o polimorfismo -174G/C altera a resposta de transcrição frente a estímulos (LPS e IL-1) e que o alelo C representa a forma de baixa resposta.

Este polimorfismo localiza-se em região próxima ao receptor de glicocorticóide (região adjacente à posição -201), desta forma comprometendo a capacidade de supressão da ativação da transcrição. Outro mecanismo possível de regulação seria, com a troca na posição -174 de G por C, a criação de um sítio de ligação do fator de transcrição NF-1 que possui atividades variadas em diferentes tipos celulares (estimuladora ou

repressora). Além deste sítio, existem evidências experimentais que a ativação da transcrição do gene *IL6* envolve regiões relacionadas com os fatores de transcrição NFIL6 (-158 a -145) e NFκB (-73 a -64). Também, a posição -174 está localizada imediatamente “*upstream*” ao sítio de ligação do elemento multiresponsível (MRE) (-172 a -151) relacionado com o sítio de início da transcrição (TREVILATTO et al., 2003) e, portanto poderia ter papel relevante no efeito repressor desencadeado por hormônios esteróides (p Ex. glicocorticóides e estrógenos) por ação destes nos sítios de ligação dos fatores de transcrição. Deste modo, a transcrição do gene *IL6* é regulada por coordenação entre ligação de diferentes fatores em diferentes sítios da região promotora.

O polimorfismo do gene *IL6* está associado a algumas doenças como artrite reumatóide juvenil (ARJ), sarcoma de Kaposi em portadores da infecção pelo HIV, periodontites crônicas, diabetes mellitus tipo II, mieloma múltiplo, linfoma de Hodgkin, doença arterial obstrutiva crônica, carcinoma de mama, entre outras (FISHMAN et al., 1998; FOSTER et al., 2000; ZHENG et al. 2000; FLEX et al., 2002; KUBASZEK et al., 2003; TREVIALATTO et al., 2003; COZEN et al., 2004; IACOPETTA et al., 2004). Além da associação com doenças, alguns autores relacionam este polimorfismo com a ocorrência de doença transplante-versus-hospedeiro em pacientes submetidos a transplantes de medula óssea (CAVET et al., 2001) ou rejeição de órgãos sólidos transplantados (MARSHALL et al, 2001).

### ***IL-10***

Nos humanos, a interleucina-10 (IL-10) é produzida nos linfócitos B e nos T “*helper*” tipo 2 (Th2) e nos monócitos e possui uma função inibitória da proliferação dos linfócitos T “*helper*” tipo 1 (Th1) e da produção de interferon (IFN)- $\gamma$  e IL-2, bem como apresenta ação inibitória de interleucinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- $\alpha$  e da quimocina MIP-1 $\alpha$ . A função dos monócitos como células apresentadoras de antígenos, também é inibida pela IL-10 através da diminuição da expressão dos antígenos do complexo de histocompatibilidade classe II (HLA classe II), da molécula de adesão intercelular tipo 1 e da expressão do CD23. Contrariamente a esta ação anti-inflamatória, a IL-10 promove a resposta de células B em parte por funcionar como fator de crescimento destas células e em outra por inibição das células T *helper* (Th1).

Associado a estas ações, a IL-10 atua nas células B dos centros germinativos aumentando a expressão do gene *bcl-2*, prevenindo deste modo a apoptose de células B auto-reativas, portanto seria um facilitador das manifestações auto-imunes (LAZARUS et al., 1997; MOORE et al., 2001).

O gene *IL10* é codificado por 5 exons no cromossomo 1. A IL-10 pode ser expressa numa variedade grande de células, usualmente em resposta a estímulos (outras citocinas, por exemplo). A transcrição do gene *IL10* é regulada por fatores de transcrição Sp1 e Sp3, que são expressos continuamente, e que combinado com um controle da estabilidade do RNAm, sugere que o mecanismo de controle dos níveis de liberação desta citocina é predominantemente pós-transcrição, possibilitando uma liberação imediata e em grande quantidade frente a um estímulo. O efeito imunossupressor da IL-10 está associado à redução da síntese de algumas citocinas pró-inflamatórias como IL-2 e TNF e, também a um aumento da secreção do antagonista do receptor da IL-1 (IL-1RA), através da estabilização da transcrição do RNAm, que possui efeitos anti-inflamatórios (bloqueio dos receptores da IL-1) (BORISH et al., 1998; MOORE et al., 2001).

Vários polimorfismos têm sido descritos na região 5' do gene *IL10*, dentre estes, 3 mutações de ponto nas posições -1082G/A, -819C/T e -592C/A são as mais estudadas e determinam 3 possíveis haplótipos GCC (-1082G, -819C e -592C), ACC (-1082A, -819C e -592C) ou ATA (-1082A, -819T e -592A). TURNER et al. (1997) demonstraram que estes polimorfismos desencadeiam variável expressão do gene, determinada predominantemente pelo alelo -1082. Este controle deve ser provavelmente feito pela alteração de ligação dos fatores de transcrição AP1, PEA1 e elemento ETS-like (KUBE et al., 1995). O haplótipo GCC está associado com maior produção e o ATA com menor (SUÁREZ et al., 2003), determinando três fenótipos possíveis: baixo produtor - ATA/ATA, produtor intermediário - ACC/ATA, ACC/ACC, GCC/ATA ou GCC/ACC e alto produtor - GCC/GCC (CRAWLEY et al., 1999; MIYAZOE et al., 2002). De maneira simplista podemos definir os fenótipos identificando somente os polimorfismos nas posições -1082 e -819, onde teríamos: AT/AT - baixo produtor, AC/AT ou AC/AC ou GC/AT ou GC/AC – produtor intermediários e GC/GC – alto produtor. REES et al. (2002) demonstraram, utilizando linhagem de células B transformada, que a atividade de

transcrição do gene *IL10* é predominantemente regulada pelo polimorfismo na posição – 1082, onde a troca do nt G pelo A aumenta em 2 vezes a capacidade de transcrição frente a estímulo (PMA). Portanto, a grande variação interindividual identificada na produção de IL-10 em diferentes modelos experimentais é determinada por diferenças genéticas.

Estas diferenças e, portanto a capacidade de produção diferenciada, tem sido relacionada com a ocorrência de doenças como artrite reumatóide juvenil (ARJ), doença inflamatória intestinal (doença de Crohn e retocolite ulcerativa idiopática), gravidade e resposta à terapêutica de algumas doenças infecciosas como meningite meningocócica e hepatites B e C, gravidade de pneumonia comunitária, evolução clínica de doenças neoplásicas como linfomas não-Hodgkin (difuso de grandes células), ocorrência de aborto de repetição, etc. (WESTENDORP et al., 1997; CRAWLEY et al., 1999; EDWARDS-SMITH et al., 1999; TAGORE et al., 1999; HAANPÄÄ et al., 2002; MIYAZOE et al., 2002; DAHER et al, 2003; GALLAGHER et al., 2003; LECH-MARANDA et al, 2004).

### ***Fator de Necrose Tumoral (TNF)***

O locus do gene *TNF* está localizado junto à região de codificação do complexo de histocompatibilidade maior (MHC – região da classe III); este locus contém genes que codificam TNF (também denominado TNF- $\alpha$ ), linfotoxina A (LTA, previamente denominado TNF- $\beta$ ) e linfotoxina B (LTB).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF) e a LTA são mediadores primários da ativação e da resposta inflamatória e estão envolvidos na patogênese de condições como o choque séptico e doenças auto-imunes. Estas interleucinas são as primeiras a serem produzidas em processos inflamatórios e são responsáveis pelo desencadeamento da cascata de ativação de várias outras citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6, outros mediadores e as próprias TNF e LTA. Apresentam também ações regulatórias em vários tipos celulares como ativação de células endoteliais, estimulação de fibroblastos, agregação e adesão de neutrófilos e regulação da função de linfócitos T e B. Estes efeitos estão associados a determinadas doenças e seu prognóstico (MAKHATADZE, 1998). FLACH et al. (1999) demonstraram uma correlação da resposta de produção de TNF e LTA por células

sangüíneas aumentada frente a estímulo desencadeado por endotoxinas, com um pior prognóstico de pacientes sépticos. A LTA é produzida principalmente por linfócitos T ativados e está envolvida na maturação de células B. Associado a isto, é descrito que a LTA funciona como um fator de crescimento autócrino para células B, relacionando-se, portanto com o desencadeamento e a manutenção da resposta humoral.

Alguns polimorfismos são descritos nos genes destas interleucinas e estes podem estar relacionados com respostas aumentadas a estímulos *in vivo* e/ou *in vitro*. O polimorfismo localizado na região promotora do gene *TNF* na posição – 308 define dois alelos possíveis: *TNF-308A1* onde temos uma guanina (G), forma mais freqüente, e a presença de uma adenina (A), define o alelo *TNF-308A2*, forma menos freqüente. Este alelo menos freqüente (*TNF-308A*) parece estar relacionado com expressão aumentada do gene *TNF*, provavelmente relacionado com aumento da transcrição (WILSON et al., 1992; WILSON et al., 1997; LOUIS et al., 1998) levando a aumento dos níveis séricos de TNF frente a estímulos. Este incremento da transcrição está relacionado com interação com fatores de transcrição ainda não bem identificados e este efeito pode variar dependendo do tipo celular estudado. Aparentemente, linhagens celulares mais maduras respondem de maneira mais diferenciada dependendo do polimorfismo TNF-308 (ABRAHAM e KROEGER, 1999).

O gene do linfotóxina A (*LTA*) também apresenta alguns polimorfismos; o polimorfismo na região do intron 1 (*LTA+252G/A*) correlaciona-se com níveis aumentados de produção de LTA. Esta região polimórfica (nt +252) está localizada próxima a um elemento de DNA formol-éster responsável (TER) com grande afinidade para vários fatores de transcrição como: AP-1, jun e c-fos. A presença do alelo *LTA+252A* resulta em aumento significativo da produção de LTA frente a estímulos (MESSER et al., 1991; WARZOCHA et al., 1998). Este polimorfismo está em desequilíbrio de ligação com outro SNP, que resulta em mudança de um aminoácido na posição 26 da proteína - no caso do alelo G a presença de asparagina e para o alelo A, treonina (MESSER et al., 1991).

Como os polimorfismos *TNF-308G/A* e *LTA+252G/A* estão associados a aumentos da produção das proteínas, é plausível acreditar que exerçam influência na capacidade das células T e B de produzirem TNF e LTA, envolvendo-se, portanto com a produção de alo-anticorpos. Estes polimorfismos estão associados também com a ocorrência e/ou

predisposição de diferentes doenças como: asma, esclerose sistêmica, reinfecção por *Plasmodium falciparum*, sarcoidose, linfoma folicular, leucemia linfóide crônica, linfoma não-Hodgkin, lupus eritematoso sistêmico, entre outras (DEMETER et al., 1997; SCITZER et al., 1997; SULLIVAN et al., 1997; ALBUQUERQUE et al. 1998; FITZGIBBON et al., 1999; PANDEY e TAKEUCHI, 1999; HAJEER e HUTCHINSON, 2001; JUZCZYNSKI et al., 2002; MEYER et al., 2002).

Pode ser observado na tabela a seguir o resumo do exposto anteriormente identificando a localização nos cromossomos dos genes da citocinas estudadas, as células produtoras e seus principais efeitos.

<b>Citocinas pró e antiinflamatórias: localização cromossômica, células produtoras e principais efeitos.</b>			
<b>Citocina</b>	<b>Localização no cromossomo</b>	<b>Células produtoras</b>	<b>Efeitos principais</b>
<b>IL-1 (<math>\alpha</math> e <math>\beta</math>)</b>	2q13-21	Macrófago +++ Várias outras células +	Indução de febre, anorexia e sonolência Agonistas de células T e B Ativação de células sinoviais e endoteliais
<b>IL-1RA</b>	2q14.2	Macrófago +++ Células epiteliais+	Bloqueio da atividade da IL-1 (antagonista do receptor)
<b>IL-6</b>	7p21-p15	Macrófago +++ Várias outras células +	Indução de febre Ativação imunidade Th2 (humoral) Maturação de linfócitos B Hematopoiese
<b>IL-10</b>	1q31-q32	Macrófago +++ Linfócitos T	Inibição da produção de citocinas pelos macrófagos Maturação de Linfócitos T
<b>TNF e LTA</b>	6p21.3	Macrófagos +++ Linfócitos T +	Como IL-1 Ativação de linfócitos (proliferação) Estimulação produção de IL-6

Como relatado anteriormente, as citocinas são mediadores imunes envolvidos com ativação celular, proliferação, fagocitose, quimiotaxias de células inflamatórias e diferenciação celular. Estes mediadores são, na sua maioria, multifuncionais e podem exercer diferentes funções em diferentes tecidos ou situações, mantendo uma inter-

relação cujo controle de produção está submetido a mecanismos complexos incluindo efeitos sinérgicos e/ou antagonistas. A investigação da biologia da citocinas, bem como dos mecanismos controladores genéticos de sua produção, possibilitam o conhecimento e o melhor entendimento de suas funções em situações fisiológicas ou em doenças.

Os concentrados de plaquetas (CPs) são hemocomponentes muito utilizados na prática clínica, principalmente no suporte de pacientes graves e portadores de doenças onco-hematológicas. Estes componentes são os responsáveis pela maioria das reações transfusionais febris (RFNH). A desleucocitação pré-armazenamento é o método mais adequado para evitá-las, pois reduz as ocorrências associadas à presença de leucócitos contaminantes reagindo com anticorpos presentes no plasma dos receptores (mecanismo clássico) e ao acúmulo de citocinas durante o armazenamento. Este método é de difícil utilização em nossa realidade, pois utilizamos na rotina da maioria dos serviços de hemoterapia do Brasil, CPs obtidos de PRP (CP-PRP), não podendo estes serem desleucocitados imediatamente após a produção. Deste modo, o estudo dos mecanismos envolvidos no acúmulo de citocinas durante o armazenamento dos desencadeantes das RFNHs é importante e relevante na prática da medicina transfusional.

Em virtude do exposto, o presente trabalho teve como objetivo verificar a possibilidade de interferência dos polimorfismos dos genes *IL1B*, *IL1RN*, *IL6*, *IL10*, *TNF* e *LTA* no acúmulo de citocinas em concentrados de plaquetas (CPs) e na ocorrência de manifestações clínicas de reação febril não hemolíticas (RFNH) em paciente multitransfundidos.

## ***OBJETIVOS***

---



1. Determinar a frequência dos polimorfismos dos genes relacionados com a capacidade secretória de IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-6, TNF e LTA em indivíduos normais (doadores de sangue) de uma amostra populacional da região sudeste do Brasil;
2. Correlacionar os níveis de citocinas acumulados nos concentrado de plaquetas randômicas (CP-PRP) e obtidas por aférese (CP-AF), coletados de doadores voluntários e sua associação com os polimorfismos *IL1B*-511C/T, *IL1B*+3953C/T, *IL1RN* intron 2 VNTR e *TNF*-308G/A;
3. Comparar a frequência dos polimorfismos gênicos de citocinas inflamatórias (*IL1B*, *IL6*, *TNF* e *LTA*) ou com efeitos anti-inflamatórios (*IL1RN* e *IL10*) em dois grupos de pacientes multitransfundidos – com antecedente de RFNH precoce e sem antecedente de RFNH.

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

---

## ***I. Pacientes e grupo controle:***

O grupo controle foi constituído por doadores voluntários de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia da UNICAMP – Hemocentro da UNICAMP. A coleta de amostras para extração de DNA e genotipagem foi autorizada após esclarecimento e assinatura de termo de consentimento padrão para doadores voluntários desta instituição, que contempla autorização para coleta de amostras para estudos. A população controle foi de 100 doadores não relacionados, para os polimorfismos: *IL1B*-511C/T, *IL1B*+3953C/T, *IL1RN* intron 2 VNTR e *TNF*-308G/A, 60 doadores para o *LTA*+252G/A e 50 para o *IL6*-174G/C.

Foram estudados 40 pacientes atendidos no Complexo Hospitalar da UNICAMP, onde: 12 pacientes apresentavam antecedentes de duas ou mais reações febris não hemolíticas (RFNH) ocorridas antes de 20 transfusões de concentrado de hemácias (grupo denominado RFNH precoce) e 28 pacientes sem antecedentes de RFNH mesmo após 20 transfusões, porém que receberam mais de 10 transfusões de concentrado de hemácias num intervalo de tempo mínimo de 90 dias entre a primeira e a décima. Esta exigência teve como objetivo excluir pacientes politransfundidos agudos (politraumatizados, cirurgias de grande porte, etc.). As informações clínicas e de antecedentes relevantes foram obtidas no sistema informatizado do Hemocentro da UNICAMP que contempla todos os registros de procedimentos transfusionais e ocorrências associadas a estes. As ocorrências são registradas por profissionais de nível superior (médicos e biólogos) e sempre um único médico (M. A. C.) caracteriza as reações transfusionais, baseado na descrição dos sinais e sintomas e de resultados de exames laboratoriais.

## ***II. Métodos***

### ***Estudo do polimorfismo gênico***

O DNA genômico foi extraído de amostras de sangue periférico coletadas em tubos com anticoagulante EDTA utilizando-se reagentes comerciais para purificação de DNA (GFX, Amersham Pharmacia, Biotech, EUA). Os métodos utilizados para identificação dos polimorfismos foram:

**Polimorfismo do gene *IL1B* Aval - *IL1B*-511C/T:** Utilizando-se o seguinte par de iniciadores: 5'-TGGCATTGATCTGGTTCATC- 3' e 5'-GTTTAGGAATCTTCCCACTT- 3' e protocolo constituído por desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos (min), seguida de 35 ciclos: 94°C por 60 segundos (s), 55°C por 40s e 72°C por 40s, finalizando com uma incubação a 74°C por 7min e resfriamento a 4°C, amplifica-se um fragmento da região promotora do gene *IL1B* que contém um polimorfismo que pode ser evidenciado pela enzima de restrição *Aval*. O produto final da amplificação foi digerido com 6 unidades (U) da referida enzima de restrição a 37°C por 3 horas. Os fragmentos foram visualizados em gel de agarose a 4% corado com brometo de etídio (BE) (HURME et al.,1998; BIOQUE et al., 1995). Dois padrões podem ser observados: fragmentos de 190pb e 114pb que correspondem ao alelo 1 (-511C) ou fragmento único de 304pb que corresponde ao alelo 2 (-511T).

**Polimorfismo do gene *IL1B* *TaqI* - *IL1B*+3953C/T:** A região que contém o referido polimorfismo está localizada no exon 5 do gene da *IL-1β* na posição +3953 (C>T). O método de PCR foi utilizado para amplificação da referida região utilizando os seguintes iniciadores: 5' -GTTGTCATCAGACTTTGACC-3' e 5' -TTCAGTTCATATGGACCAGA- 3'. O protocolo utilizado foi constituído por um período inicial de desnaturação a 94°C por 5min, seguido de 35 ciclos: 94°C por 60s, 55°C por 40s e 74°C por 40s, finalizando com uma incubação a 72°C por 7min e resfriamento a 4°C. O produto final do PCR foi digerido utilizando-se 10 U de *TaqI* a 65°C por 3 horas. Os fragmentos foram visualizados em gel de agarose a 3% com BE. Esta digestão produz 2 fragmentos de 135pb e 114pb (alelo 1, +3953C) ou único fragmento de 249pb (alelo 2, +3953T) (HURME et al.,1998; BIOQUE et al., 1995).

**Polimorfismo do gene *IL1RN* Intron 2, VNTR:** A região do intron 2 do gene *IL1RN* foi amplificada utilizando o seguinte par de iniciadores: 5' -CTCAGCAACTCCTAT- 3' e 5' -TCCTGGTCTGCAGGTAA- 3' previamente descritos (TARLOW et al., 1993) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1min, 50°C por 40s e 72°C por 40s, e finalmente um período de extensão a 72°C por 7min. O produto da reação de amplificação foi evidenciado em gel de agarose a 3% com BE e apresentou 6 padrões denominados: alelo 0 (um fragmento de repetição) com 154bp, alelo 1 (4 repetições) com 410bp, alelo 2 (2 repetições) com 240bp, alelo 3 (5

repetições) com 500bp, alelo 4 (3 repetições) com 325bp e alelo 5 (6 repetições) com 595bp (TARLOW et al., 1993; VAMVAKOPOULOS et al., 2002).

**Polimorfismo do gene *IL6* *NlaIII* - *IL6*-174G/C:** Um par de iniciadores para amplificação de fragmento da região promotora do gene foi utilizado: 5' - **ACTTCGTGCATGACTTCAG-3'** e 5' - **TTCATAGCTGGGCTCCTG-3'**. A amplificação foi realizada com o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 94°C por 5min, seguido de 35 ciclos constituídos por desnaturação (94°C por 60s), anelamento (54°C por 60s) e extensão (72°C por 50s) além de uma extensão final a 72°C por 7min. O produto do PCR foi digerido utilizando a enzima de restrição *NlaIII* (4 UI) a 37°C "over night". A digestão foi evidenciada em gel de agarose a 3% com BE. A presença do alelo 1 (-174G) produz um fragmento de 208bp e do alelo 2 (-174C) dois fragmentos de 123 e 85bp cada.

**Polimorfismo do gene *TNF* *NcoI* - *TNF*-308G/A:** Foram utilizados dois iniciadores para amplificação de fragmento de 107 bp: 5' - **AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3'** e 5' - **TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'**, fragmento este que incorpora um sítio de restrição da enzima *NcoI* situado na posição -308 da região promotora do gene *TNF*. O protocolo constituiu-se de período de desnaturação inicial seguido de 35 ciclos: a 94°C por 1min, 56°C por 1min e 72°C por 30s e finalizando com extensão a 72°C por 7min. Após digestão com 5 UI de *NcoI* a 37°C por uma hora, o produto da digestão foi identificado em gel de agarose a 4% com BE. O alelo 1 - *TNF*-308G produz dois fragmentos de 87bp e 20bp e o alelo 2 - *TNF*-308A um fragmento único de 107bp.

**Polimorfismo do gene *Linfotoxina (LTA)* *NcoI* - *LTA*+252G/A:** A região de 372 bp que inclui o polimorfismo *LTA*+252G/A foi amplificada por reação de PCR utilizando como iniciadores: 5' - **TTCGTGCTTTGGACTACC-3'** e 5' - **AGAGAGAGACAGTGAGCG-3'**, esta região incorpora o sítio de restrição da enzima *NcoI* na posição da mutação. O protocolo utilizado para amplificação do fragmento foi: desnaturação inicial seguido de 35 ciclos de 1min a 94°C, 1min a 54°C e 50s a 72°C, finalmente período de extensão de 7min a 72°C. A digestão com *NcoI* foi realizada por um período de 1 hora a 37°C, o produto da digestão foi identificado em gel de agarose a 3% com BE. O alelo 1 - forma G do polimorfismo produz dois fragmentos de 182 e 190bp e o alelo 2 - forma A do polimorfismo produz um fragmento único de 372bp.

**Polimorfismo do gene *IL-10*-1082G/A:** A região -1082 do promotor do gene *IL10* foi amplificada utilizando um par de iniciadores: **5'-GGTAGAGCAACTCCTCG-3'** e **5'-CCTACTGTACACCATCTCCAG-3'**. Os parâmetros do ciclo foram: período de desnaturação a 94°C por 5min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 60s, anelamento a 60°C por 60s e extensão a 72°C por 50s e um período de extensão final a 72°C por 7min. O produto da amplificação (334 bp) foi avaliado em gel de agarose a 3% com BE. A identificação dos alelos foi feita utilizando-se o método de seqüenciamento em equipamento automatizado (descrição detalhada a seguir). Foi denominado alelo 1 o polimorfismo com guanina (G) e alelo 2 com adenina (A) na posição -1082.

**Polimorfismo do gene *IL-10*-819C/T:** A região promotora do gene *IL10* que inclui a posição -819 foi amplificada utilizando-se os iniciadores: **5'-ACTTTAGACTCCAGCCAACG-3'** e **5'-TCAGGCACATGTTTCCAC-3'** e os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 94°C por 5min, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 60s, anelamento a 57°C por 60s e extensão a 72°C por 50s, seguido de uma extensão final por 7min. O produto da amplificação com 324bp e foi avaliado em gel de agarose a 3% com BE. O polimorfismo foi identificado utilizando-se a mesma metodologia que para o *IL10*-1082G/A sendo definido como alelo 1 a presença de citosina (C) e alelo 2 de timidina (T).

### ***Seqüenciamento automatizado para identificação dos polimorfismos *IL10*-1082G/A e -819C/T***

A amplificação para seqüenciamento automático foi realizada com o BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para esta reação utilizou-se 10ng do produto de PCR purificado, 1,6pmol de iniciador sense e anti-sense (em reações separadas) (mesmos *iniciadores* utilizados para amplificação), 1,5µL da solução Terminator Ready Reaction Mix do BigDye e água destilada estéril (volume final 10µl). Em termociclador automático (GeneAmp® PCR System 9700 – Applied Biosystems, EUA) as amostras foram submetidas desnaturação inicial (96°C por 1min) e 30 ciclos: desnaturação a 96°C por 10s, anelamento a 57°C por 5s e extensão a 60°C por 4min.

O produto desta nova reação de PCR foi então submetido à purificação utilizando-se acetato de amônio e etanol. O produto da purificação foi armazenado a -20°C até a eletroforese. Para a eletroforese, adicionou-se 2,0µL de *loading buffer*, uma mistura de formamida deionizada, 25mM EDTA (pH 8,0) com *blue dextran* (50mg/mL) na proporção de 5:1 em cada “*well*”. As amostras foram homogeneizadas, desnaturadas a 95°C por 5min e aplicadas em gel de poliacrilamida 2mm de espessura e separados por eletroforese em seqüenciador automático (ABI Prism 377 DNA Sequencer, Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA). A análise foi feita pelo autor (M. A. C.)

### ***Seqüenciamento para confirmação do alelo IL1RN\*0***

A confirmação do alelo *IL1RN\*0* identificado em um indivíduo do grupo controle foi realizada utilizando-se método clonagem e seqüenciamento manual. Inicialmente 1µL do produto de PCR obtido do DNA genômico do portador do alelo *IL1RN\*0* foi ligado a um vetor pCRII usando *Original TA Cloning®* kit (Invitrogen, Gronirigen, Holanda). Este então foi utilizado para transformar *Escherichia coli* (Efficiently DH5α Competent cells – GIBCO-BRL®, Rockville, MD, EUA). O DNA do plasmídeo foi preparado utilizando-se *QIAprep® Spin Miniprep* kit (QIAGEN, Hiden, Alemanha), o seqüenciamento foi realizado utilizando-se o mesmo par de *iniciadores* da amplificação e o método de término de síntese de cadeia por incorporação de dideoxinucleotídeos (SANGER, 1981). A reação de seqüenciamento foi analisada através de eletroforese em gel de poliacrilamida seguido de autoradiografia.

### ***Análise da expressão do gene IL1RN (alelo IL1RN\*0) por método RT-PCR semiquantitativo***

Para a análise da expressão *in vitro* do polimorfismo *IL1RN\*0* foram selecionados, utilizando a técnica descrita anteriormente, três indivíduos do grupo controle cujos padrões de polimorfismo eram *IL1RN* 1.1, 2.2 e 1.0, respectivamente (TARLOW et al., 1993; VAMVAKOPOULOS et al., 2002). Estes indivíduos não apresentavam queixas clínicas ou sintomas, nem possuíam antecedentes patológicos relevantes. O hemograma na ocasião da coleta era normal. Não apresentavam também nenhum

genótipo do gene *IL1B* associado à expressão aumentada, como descrito anteriormente, *IL1B*-511TT e *IL1B*+3953TT.

Amostras de sangue foram coletadas destes indivíduos, em jejum, em seringas plásticas com heparina (0,1mL em 20mL de sangue), 3mL desta coleta foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5%CO<sub>2</sub> e humidificação, em concentração final de LPS 1mg/mL (*E. coli* subtype 0127:B8), em placas plásticas apirogênicas. Amostras foram colhidas em diferentes tempos: 2 horas (hs), 6hs e 12hs de incubação.

O RNA total foi isolado das amostras de sangue incubadas com LPS usando *TRIzol Reagent* (Gibco, BRL Life Technologies, Rockville, MD, EUA), de acordo com instruções do fabricante. O RNA isolado foi quantificado em 260nm e o cDNA foi obtido em 30µL de reação contendo 5µg de RNA total, 2mM de cada dNTP, 15U de transcriptase reversa, 500ng de oligo (dT) iniciador e tampão. A reação de transcriptase reversa (RT) foi realizada em termociclador (DNA Thermal Cycler 480, Perkin-Elmer Corp. GeneAmp, PCR Instrument System, Branchburg, NJ, EUA) usando programa constituído por ciclo de RT de 15min a 42°C, seguido de 5min de desnaturação a 99°C e resfriamento em gelo. O produto foi armazenado a -80°C até a subsequente reação de PCR.

A reação de PCR utilizou como controle a amplificação do gene da β-actina, em experimento em mesmo tubo, e foi realizada com 1µL de cDNA em volume total de reação de 50µL. O número de ciclos de amplificação do PCR foi baseado em resultados de amplificações anteriores utilizando-se testes de diferentes números de ciclos (20, 25, 30 e 35). O protocolo de amplificação foi constituído por pré-desnaturação a 94°C por 5min, seguido de 25 ciclos de 94°C por 1min, 50°C por 40s e 72°C por 40s, e finalmente um período de extensão a 72°C por 7min.

Alíquotas (25µL) de cada produto deste PCR foram aplicadas em gel de agarose a 2% com BE e a corrida de eletroforese foi realizada. As bandas evidenciadas no gel foram escaneadas utilizando-se de equipamento e programa EagleSight Stratagene versão 3.2 (La Jolla, CA, EUA). Todos os níveis de expressão foram avaliados utilizando as bandas de amplificação do gene da β-actina como referência (normalização). As seqüências dos iniciadores utilizados para amplificação do cDNA foram para amplificação de região do exon 5 o gene *IL1RN*: **5'-TAACATCACTGACCTGAGCGAGA-3'** e



5'-CCATCGCTGTGCAGAGGAA-3' e para a  $\beta$ -actina: 5'-AAGAGATGGCCACGGCTGCT-3' e 5'-TCGCTCCAACCGACTGCTGT-3'. Os fragmentos obtidos foram para *IL1RN* de 150bp e para a  $\beta$ -actina de 280bp.

### ***Dosagem de IL1- $\beta$ e TNF- $\alpha$ nos concentrado de plaquetas***

#### ***Produção de Concentrado de Plaquetas de Plasma Rico em Plaquetas (CP-PRP) ou por Aférese (CP-AF)***

Foram obtidas 20 unidades de concentrado de plaquetas por aférese sem filtro “*in-line*” (CP-AF) (sistema AS-104, Fresenius, Alemanha) e 30 unidades produzidas a partir de doações de sangue total (CP-PRP), em ambas as situações os doadores foram informados e consentiram em termo específico. Para produção destas unidades foram utilizadas padronizações pré-definidas na seção de Processamento e Distribuição do Hemocentro da UNICAMP, resumidamente: sangue total (ST) de doadores voluntários foi coletado em bolsas triplas contendo CPDA-1 na bolsa primária (PL-146, ASEM-NPBI, São Paulo, Brasil), a centrifugação inicial do ST foi a 2.600 x g por 5min, o sobrenadante contendo o plasma rico em plaquetas (PRP) foi transferido para bolsas satélites e centrifugado a 3.000 x g por 12min, resultando em um “*pelle*” de plaquetas que permaneceu em repouso por 1 hora e a seguir sendo armazenado em condições ideais (20 a 24°C, em agitação horizontal contínua) por 7 dias.

#### ***Obtenção das amostras***

Amostras foram coletadas nos dias 3, 5 e 7 de armazenamento, 2mL foram removidos utilizando técnica estéril por sistema de “*couplers*” e seringas plásticas com agulhas. As amostras foram imediatamente centrifugadas em temperatura ambiente a 5.000 x g por 15min e tubos plásticos apirogênicos. O sobrenadante plasmático foi congelado imediatamente em tubos plásticos a -30°C por período máximo de 3 meses até análise. No momento da primeira coleta (dia 3), um volume adicional de 2mL foi retirado para determinar as contagens celulares (leucócitos, linfócitos, neutrófilos e plaquetas) em sistema automatizado (Cell-Dyn 1700, UNIPATH, Abbott Diagnostics, CA, EUA) e o volume foi calculado levando em consideração o peso das bolsas. A contagem de leucócitos das unidades de CP-AF foi realizada em câmaras de Nageotte utilizando

método padronizado no laboratório de Controle de Qualidade do Hemocentro da UNICAMP. Foram realizadas culturas em meio aeróbio de amostras no D7 de armazenamento de todas as unidades de concentrado de plaquetas (CP-AF e CP-PRP) utilizando sistema automatizado BactAlert®, estas sempre foram negativas após incubação de 7 dias.

### ***Dosagem de citocinas por método imuno-enzimático (EIA):***

Alíquotas de plasma obtidas de unidades de concentrado de plaquetas (CP-PRP e CP-AF) foram descongeladas em banho-maria a 37°C imediatamente antes do ensaio e então centrifugadas a 5.000 g por 10min. As dosagens de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA e TNF (alfa) foram realizadas em duplicata utilizando-se reagentes comerciais pelo método imuno-enzimático (EIA) (Quantikine®, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) seguindo orientações do fabricante. A sensibilidade dos ensaios eram 1,0 pg/ml para IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , 22,0 pg/ml para IL-1RA e 4,4 pg/ml para TNF (alfa). O coeficiente de variação (CV) aceito intra-ensaio foi sempre inferior a 10%.

### ***Métodos estatísticos***

#### ***Análise populacional***

A frequência genotípica e alélica foi determinada por contagem direta. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado calculando-se as frequências esperadas de todos os genótipos e comparando-as com as observadas. O teste Chi-quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizado para determinar o significado das diferenças entre estes valores. As diferenças entre as frequências genotípicas da população controle estudada (região Sudeste do Brasil) e outras populações foram avaliadas utilizando-se o teste  $\chi^2$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se programas: WinSTAT<sup>R</sup> versão 3.1 (Whitehall, Pensilvânia, EUA), MedCalc (Versão 7.4, Mariakerke, Bélgica) e EH (disponível no [site ftp://likage.rockefeller.edu/software/eh](ftp://likage.rockefeller.edu/software/eh)).

#### ***Análise das dosagens de IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ no CP***

Para a avaliação estatística dos resultados, o programa WinSTAT<sup>R</sup> versão 3.1 (Whitehall, Pensilvânia, EUA) foi utilizado. Para comparar os resultados pareados das avaliações das amostras de CP durante o armazenamento foi utilizado o teste de

Wilcoxon para as comparações não paramétricas de dosagens de interleucinas. O teste de correlação de Person foi utilizado para avaliar o efeito do tempo de armazenamento e das contagens de plaquetas e leucócitos no acúmulo de citocinas. A associação entre os polimorfismos gênicos estudados e o acúmulo de interleucinas durante o armazenamento dos CP foi avaliado utilizando-se os testes de Kruskal-Wallis e U-teste (Mann-Whitney). O valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

### ***Análise genotípica da população de pacientes multitransfundidos***

O estudo estatístico do grupo de pacientes (sem RFNH e com RFNH precoce) foi realizado utilizando-se o programa disponível no *site* <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html> e/ou o MedCalc (Versão 7.4, Mariakerke, Bélgica), comparando-os com o grupo controle e entre si. Os métodos utilizados foram o teste Chi-quadrado ou Fisher quando aplicável, além do cálculo do Odds Ratio (OR) para a análise fenotípica de alto ou baixo produtor. O valor inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

## ***RESULTADOS***

---

## **Análise Populacional**

### **Polimorfismo do complexo do gene *IL1B***

A frequência genotípica e dos alelos do polimorfismo do gene *IL1B* nas posições -511 e +3953 e do gene *IL1RN* no intron 2 dos 100 doadores estudados estão demonstradas na **tabela 1**. Nossa população, caracterizada como da região sudeste do Brasil, apresenta uma frequência dos genótipos C/C, C/T e T/T de 43%, 38% e 19% para o polimorfismo *IL1B*-511 e 62%, 31% e 7% para o polimorfismo *IL1B*+3953, respectivamente. As frequências dos alelos -511C, -511T, +3953C e +3953T encontradas foram 0,620, 0,380, 0,775 e 0,225, respectivamente. A análise do polimorfismo do gene *IL1RN* relacionado com o número de repetições de um fragmento de 86bp (VNTR) no intron 2 resultou numa frequência do alelo 1 (410 bp, 4 repetições) de 0,730, do alelo 2 (240 bp, 2 repetições) de 0,235 e de outros alelos 0,035. Todas as frequências genotípicas dos genes *IL1B* e *IL1RN* observadas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

Diferenças significativas foram observadas na distribuição dos genótipos *IL1B*-511 entre nossa população e as populações Chinesa-Tailandesa ( $\chi^2=10,610$ , DF=2,  $p=0,005$ ) e Afro-Americana ( $\chi^2=30,398$ , DF=2,  $p<0,0001$ ) com maior frequência dos genótipos T/T e C/T. Estes achados se devem a maior frequência do alelo T nas populações Chinesa-Tailandesa e Afro-Americana, com diferenças estatisticamente demonstradas. Com relação ao polimorfismo *IL1B*+3953, detectamos diferenças significativas somente comparando nossa população com a Chinesa/Tailandesa, com predominância nesta dos genótipos CC e do alelo C ( $\chi^2=56,235$ , DF=2,  $p<0,0001$  e  $\chi^2=60,397$ , DF=1,  $p<0,0001$ , respectivamente). Portanto, observamos frequência menor dos genótipos com o alelo *IL1B*-511T (alelo 2) nas populações do sudeste do Brasil e Euro-Americana quando comparadas com as Asiáticas ou Africanas, mas resultado inverso ocorre para o alelo *IL1B*+3953T (alelo 2) comparando-se com a população Tailandesa/Chinesa. Diferenças também foram detectadas no polimorfismo do gene *IL1RN* intron 2 VNTR com uma frequência maior dos genótipos 1.2 e 2.2 na população Asiática e Afro-Americana comparando-as com a população em estudo ( $\chi^2=33,188$ , DF=3,  $p<0,0001$  e  $\chi^2=18,756$ , DF=3,  $p=0,0003$ , respectivamente). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi

encontrada na comparação entre freqüências encontradas em nossa população e por outros autores em populações caucasianas (européias e norte-americanas) para os polimorfismos *IL1B*-511 e +3953 e *IL1RN* intron 2 VNTR (**tabela 2**).

Uma rara variação alélica do gene *IL1RN* foi detectada, contendo somente uma repetição do segmento de 86bp, denominado alelo *IL1RN*\*0 (**figura 1**). Utilizando-se do sequenciamento direto como método para confirmação deste polimorfismo, encontramos duas substituições de nucleotídeos (*nt*) no alelo *IL1RN*\*0: a primeira no 29*nt* (substituição C>A) na região de repetição de 86bp e uma segunda substituição 16*nt* após o término desta região de repetição no sentido 3' (substituição A>G). Este padrão polimórfico, com as mesmas substituições de *nt*, já havia sido descrito por VAMVAKOPOULUS et al. (2002) estudando uma população de origem européia. A transmissão hereditária do alelo *IL1RN*\*0 não foi possível de ser demonstrada no presente caso, pois este padrão não foi encontrado na análise do pai, irmãos ou descendentes do referido doador. O estudo da mãe não foi possível, pois a mesma já é falecida, porém foi identificada a descendência européia dos ancestrais da referida progenitora.

### ***Polimorfismo do gene IL6***

Nossa população apresenta uma freqüência dos genótipos G/G, G/C e C/C para o polimorfismo *IL6*-174G/C de 62%, 32% e 6% e as freqüências dos alelos -174G e -174C encontradas foram 0,780 e 0,220. O estudo comparativo entre outras populações demonstrou uma semelhança das freqüências genotípicas e alélica de nossa população e a população Italiana e Alemã ( $\chi^2=2,964$ , DF=2, p=0,227 e  $\chi^2=5,300$ , DF=2, p=0,070, respectivamente). Diferenças foram evidenciadas entre a população estudada e as Inglesa, Afro-Americana, Caucasiana da América do Norte e Chinesa, porém, o comportamento foi diferente; nas populações Inglesa e de caucasianos da América do Norte (de origem anglo-saxônica) observa-se uma freqüência menor do alelo G, já nas populações Afro-Americana (origem africana) e asiática (Chinesa), este alelo é quase que exclusivo. Na população brasileira estudada obtivemos um freqüência alélica intermediária (freqG=0,78 e freqC=0,22) produzindo um padrão também intermediário na freqüência genotípica (**tabela 2**). As freqüências genotípica e alélica do polimorfismo do gene *IL6* observadas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

### **Polimorfismo dos genes *TNF* e *LTA***

A frequência genotípica e dos alelos do polimorfismo dos genes *TNF* e *LTA* nas posições -308 e +252, respectivamente, estão demonstradas na **tabela 1**. A frequência dos genótipos do polimorfismo *TNF*-308 foi GG 66%, GA 27% e AA 7% e de *LTA*+252 GG 6,7%, GA 41,7% e AA 51,6%. O estudo comparativo do polimorfismo *TNF*-308G/A, entre nossa população e outras (européias, afro-americana e oriental), demonstrou somente diferença estatisticamente significativa na frequência genotípica e alélica entre esta e a população Italiana ( $\chi^2=14,456$ , DF=2,  $p=0,0007$  e  $\chi^2=4,583$ , DF=1,  $p=0,032$ , na avaliação dos genótipos e dos alelos, respectivamente). A população italiana apresenta uma frequência maior que a nossa do alelo G com frequência menos que 1% do genótipo *TNF*-308A/A no estudo utilizado como comparação. A frequência do polimorfismo *LTA*+252G/A apresentou resultado semelhante entre a população brasileira da região sudeste estudada e as populações de origem européia (inglesa, alemã e francesa), porém diferenças significativas entre as populações afro-americana, caucasiana da América do Norte e Chinesa. Observou-se uma frequência maior dos genótipos *LTA*+252GG e GA ( $\chi^2=13,652$ , DF=2,  $p=0,001$ ,  $\chi^2=60,670$ , DF=2,  $p<0,0001$  e  $\chi^2=14,741$ , DF=2,  $p=0,0006$ , respectivamente) quando comparada a população brasileira estudada (**tabela 2**). As frequências genotípica e alélica dos polimorfismos *TNF*-308G/A e *LTA*+252G/A observadas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

### **Expressão do gene *IL1RN* associado ao genótipo 1/0 (alelo *IL1RN*\*0)**

Este estudo foi realizado com o objetivo de investigar a influência do alelo *IL1RN*\*0 na expressão do gene *IL1RN* utilizando um modelo *in vitro* com sangue total e estímulo das células com LPS, e comparando os resultados com outros genótipos (1/1 e 2/2). Foram selecionados do grupo de doadores de sangue três indivíduos, sem alterações clínicas evidentes ou antecedentes patológicos relevantes, com os genótipos *IL1RN* 1.1, 2.2 e 1.0. Nenhum dos genótipos do gene *IL1B* associados à alta expressão gênica (*IL1B*-511TT e +3953TT) foi identificado nos doadores estudados. A reação foi realizada como descrito anteriormente e a corrida do produto do PCR foi realizada em gel de agarose a 3% com brometo de etídio. A avaliação densitométrica das bandas coradas foi realizada e normalizada comparando-se com a expressão do gene da  $\beta$ -actina (**figura 2a e b**) com reações realizada conjuntamente. Comparando-se os resultados observados, não

evidenciamos diferenças relevantes entre os diferentes genótipos, exceto uma redução da expressão no genótipo *IL1RN* 2.2 após 12 horas do estímulo quando comparado com os outros, porém esta análise é sujeita a críticas devido à limitação da sensibilidade da metodologia utilizada e do pequeno número de análises, devido a grande raridade do genótipo *IL1RN* 1.0.

### ***Estudo do acúmulo de IL1 $\beta$ e TNF em Concentrado de plaquetas (CP-PRP) e os polimorfismos IL1B, IL1RN e TNF***

#### ***Análise do concentrados de plaquetas (CP)***

Nos concentrados de plaquetas frescos obtidos a partir de plasma rico em plaquetas (CP-PRP), a média do conteúdo de plaquetas nas unidades foi de  $8,0 \times 10^{10}$  (desvio padrão,  $DP=1,6 \times 10^{10}$ ; mediana,  $M=7,9 \times 10^{10}$ ) e da contaminação leucocitária de  $1,82 \times 10^8$  ( $DP=0,4 \times 10^8$  e  $M=1,3 \times 10^8$ ). A média da concentração de leucócitos contaminantes e de plaquetas nas unidades de CP-PRP foi de  $2,74 \times 10^9/L$  ( $DP=3,37 \times 10^9/L$  e  $M=2,10 \times 10^9/L$ ) e  $13,59 \times 10^{11}/L$  ( $DP=13,59 \times 10^{11}/L$  e  $M=13,78 \times 10^{11}/L$ ), respectivamente. A demonstração das concentrações de leucócitos e de plaquetas nos diferentes grupos genotípicos está demonstrada na **tabela 3**. A concentração de leucócitos foi sempre superior a  $0,5 \times 10^9/L$  e de granulócitos (GRAM) e linfócitos (LINF) superior a  $0,1 \times 10^9/L$ , estes eram os limite inferiores de acurácia do equipamento utilizado para estas contagens. Os concentrados de plaquetas obtidos por aférese (CP-AF) apresentaram contaminação inferior a  $10^7$  leucócitos e conteúdo de plaquetas superior a  $3,0 \times 10^{11}$  por unidade em todas as bolsas estudadas.

#### ***Dosagem de citocinas***

As concentrações de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA e TNF foram indetectáveis (abaixo da sensibilidade do teste) em todas as unidades de CP-AF durante todo o período de armazenamento estudado (7 dias) e estes componentes não foram utilizados para análises seguintes, somente para os estudos de freqüências dos polimorfismos na população controle. Os resultados das dosagens de IL-1 $\alpha$  e IL-1RA permaneceram sempre abaixo do limite de detecção do método em todas as unidades de CP-PRP. As médias das dosagens de IL-1 $\beta$  foram de 4,4 pg/ml (mediana,  $M=0,0$  pg/ml; faixa, 0-79,68 pg/ml), 34,57 pg/ml ( $M=1,81$  pg/ml; range, 0-364,38 pg/ml) e 100,55 pg/ml ( $M=10,46$



pg/ml; faixa, 0-543,98 pg/ml) nos dias 3, 5 e 7 de armazenamento, respectivamente, mostrando um aumento significativo e progressivo ( $p < 0.05$ , teste de Wilcoxon). O mesmo aumento foi observado para o TNF, a média foi de 5,68 pg/ml no dia 3 (M=0,0 pg/ml; faixa, 0-164,89 pg/ml), 8,62 pg/ml no dia 5 (M=0,0 pg/ml; faixa 0-204,08 pg/ml) e 48,84 pg/ml no dia 7 (M=0,0 pg/ml; faixa, 0-834,91 pg/ml) ( $p < 0,05$ , teste de Wilcoxon). Estes resultados estão demonstrados na **tabela 3** e na **figura 3**.

Uma correlação direta (teste de Pearson) foi observada entre os níveis de IL-1 $\beta$  nos dias 3, 5 e 7 quando comparamos o D3 (dia 3) com o D5, D3 com D7 e D5 com D7 (D3 x D5  $R = +0,877$ , D3 x D7  $R = +0,525$  e D5 x D7  $R = +0,610$ , sempre com significado estatístico,  $p < 0,001$ ). Para as dosagens de TNF, somente foi detectada uma correlação entre os D3 e D5 ( $R = +0,986$ ,  $p < 0,001$ ) mas não entre D5 e D7 ( $R = +0,125$ ,  $p = 0,25$ , NS) nem entre D3 e D7 ( $R = +0,126$ ,  $p = 0,25$ , NS).

Foi identificado uma correlação inversa entre o acúmulo de IL-1 $\beta$  e o conteúdo de plaquetas das bolsas de CP-PRP durante o armazenamento nos dias 3 (teste de Pearson,  $R = -0,468$ ,  $p = 0,004$ ) e 5 ( $R = -0,378$ ,  $p = 0,019$ ), mas não no dia 7 ( $R = -0,125$ ,  $p = 0,25$ , NS). O mesmo achado foi demonstrado com o TNF (dia 3  $R = -0,437$ ,  $p = 0,009$ , dia 5  $R = -0,453$ ,  $p = 0,005$  e dia 7  $R = +0,047$ ,  $p = 0,22$ , NS). A contagem leucocitária total ou a concentração de leucócitos não mostraram correlação com as dosagens de IL-1 $\beta$  e TNF nestes componentes, nem quando analisamos individualmente as contagens de GRAN ou LINF.

#### ***Freqüência dos polimorfismos gênicos dos doadores de CP-PRP***

A distribuição dos genótipos e alelos dos polimorfismos dos genes *IL1B*-511C/T e +3953C/T, *IL1RN* intron 2 e *TNF*-308G/A estão resumidas na **tabela 4**. As freqüências gênicas não apresentam desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

#### ***Correlação entre dosagem de citocinas e os polimorfismos gênicos***

A análise da correlação entre os genótipos do polimorfismo *IL1B*-511C/T demonstrou que existe uma correlação entre o aumento da citocina IL-1 $\beta$  quando o CP-PRP é coletado de doadores com o alelo 2 (-511T) e esta diferença pode ser observada no dia 5 (D5) de armazenamento (teste de Kruskal-Wallis,  $p = 0,063$ ), sem significado estatístico, mas é significativa no dia 7 (D7) ( $p = 0,038$ ). Esta diferença é mais evidente quando

agrupamos os doadores em 2 grupos: um com genótipos -511CC ou CT (n=22) e outro com homozigose para o alelo T, -511T/T (n= 8). Este último grupo apresenta um aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  durante o período de armazenamento superior ao outro grupo (U-test, Mann-Whitney, p=0,018 para D5 e p=0,010 para D7) com significado estatístico já no D5 (**tabela 3 e figura 4**).

Detectamos um predomínio do genótipo *IL1B*-511C/C nas bolsas de CP-PRP com dosagens de IL-1 $\beta$  indetectáveis pelo método utilizado, durante todo o período de armazenamento (CC:CT+TT, 4:4), por outro lado nas bolsas com maiores níveis de acúmulo de IL-1 $\beta$  observamos a predominância do genótipo *IL1B*-511T/T (TT: CC+CT, 6:3). Não foi observado a associação das dosagens de IL-1 $\beta$  durante o armazenamento dos CP-PRP e o polimorfismos *IL1B*+3953C/T e *IL1RN* intron 2. Nenhuma correlação também foi detectada entre o polimorfismo *TNF*-308G/A e as dosagens desta citocina nos CP-PRP estudados, analisando os três grupos separadamente (-308GG, -308GA e -308AA) ou dividindo em somente dois grupos (-308GG ou GA e -308AA) (**tabela 3 e figura 5**), não sendo observado também nenhuma predominância de genótipos *TNF*-308G/A entre amostras indetectáveis ou com altos níveis acumulados de TNF durante o armazenamento.

### ***Estudo de grupo de pacientes multitransfundidos e ocorrência de reação febril não hemolítica precoce***

Foram identificados dois grupos de pacientes multitransfundidos (mais que 20 transfusões de concentrado de hemácias): um sem ocorrência de reação febril não hemolítica (RFNH) mesmo após 20 transfusões de concentrado de hemácias, com 28 pacientes, e outro, com RFNH precoce (antes de 20 transfusões de CH) com 12 indivíduos. Os diagnósticos dos pacientes variam, porém predominam doenças onco-hematológicas. Observa-se um predomínio de pacientes do sexo masculino em ambos os grupos (M:F, 24:14) e nenhuma diferença foi detectada na análise da idade, do sexo e do diagnóstico comparando-se os dois grupos (**tabela 5**). A frequência dos genótipos dos polimorfismos *IL1B*-511C/T e +3953C/T, *IL1RN* intron 2, VNTR, *IL6*-174G/C, *IL10*-1082G/A e -819C/T, *TNF*-308G/A e *LTA*+252G/A está apresentada na **tabela 6**, comparando grupo controle e pacientes e os dois grupos de pacientes (sem RFNH e

com RFNH precoce). Todos os genótipos e os alelos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg na população global (pacientes) e nos dois grupos distintos de pacientes.

Comparando o grupo de pacientes multitransfundidos (n=40, exceto para o polimorfismo *IL6-174G/C* cujo grupo foi constituído de 30 pacientes) com o grupo controle, observamos diferença significativa nas freqüências genótípicas dos polimorfismos *IL1B-511C/T* e *+3953C/T*, com aumento da freqüência do alelo 2 (T) e do *LTA+252G/A*, com aumento da freqüência do alelo G, no grupo constituído por pacientes multitransfundidos. Este achado pode ser explicado pela inclusão, neste grupo, de indivíduos portadores de doenças associadas a estes alelos. Por outro lado, não encontramos diferença na freqüência dos polimorfismos *IL1RN VNTR* intron 2, *IL6-174G/C*, *TNF-308G/A*, *IL10-1082G/A* e *IL10-819C/T* entre estes dois grupos.

Foi demonstrada associação entre *IL1RN* alelo 2 e a ocorrência de RFNH precoce quando analisamos a presença ou ausência do alelo 2 em ambos os grupos de pacientes, isto é, grupo RFNH precoce e sem RFNH (freqüência de 0,542 vs 0,286, teste de Fisher  $p=0,042$ ). Resultado semelhante foi detectado analisando-se os diferentes genótipos ( $\chi^2=9,719$ ,  $DF=3$ ,  $p=0,021$ ). Agrupando-se os genótipos encontrados em 2 grupos: *IL1RN\*2.2* e outros, observamos uma freqüência significativamente maior do genótipo *IL1RN\*2.2* no grupo com RFNH precoce (teste de Fisher  $p=0,022$ ) (**tabela 7**). Tanto alelo *IL1RN\*2* quanto o genótipo *IL1RN\*2.2* têm sido descritos como associados à ocorrência de níveis mais elevados de IL-1 $\beta$  em pacientes e em modelos *in vitro* após estímulo. Nenhuma outra associação foi encontrada analisando-se os outros polimorfismos: *IL1B-511C/T* e *+3953C/T*, *IL6-174G/C*, *IL10-1082G/A* e *-819C/T*, *TNF-308G/A* e *LTA+252G/A*.

**Tabela 1.** Frequência genotípica dos polimorfismos gênicos *IL1B* -511C/T e +3953C/T, *IL1RN* intron 2 VNTR, *IL6* -174G/C, *TNF* -308G/A e *LTA*+252G/A na população controle constituída por doadores voluntários de sangue da região de Campinas (sudeste do Estado de São Paulo) (GRUPO CONTROLE). Análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg da frequência gênica usando teste Chi-quadrado: DF=1, se  $p > 0,05$  em EH-W.

	Número observado (%)	Número esperado
<b>Polimorfismo <i>IL1B</i> -511C/T n=100</b>		
1.1 (CC)	43 (43,0)	38,4400
1.2 (CT)	38 (38,0)	47,1199
2.2 (TT)	19 (19,0)	14,4399
Alelo 1 (C)	0,6200	$\chi^2=3,7460$
Alelo 2 (T)	0,3800	DF=1, $p > 0,05$
<b>Polimorfismo <i>IL1B</i> +3953C/T n=100</b>		
1.1 (CC)	62 (62,0)	60,0625
1.2 (CT)	31 (31,0)	34,8750
2.2 (TT)	07 (7,0)	5,0625
Alelo 1 (C)	0,7750	$\chi^2=1,2345$
Alelo 2 (T)	0,2250	DF=1, $p > 0,05$
<b>Polimorfismo <i>IL1RN</i> intron 2 n=100</b>		
1.1	55 (55,0)	53,2899
1.2	30 (30,0)	34,3099
2.2	08 (8,0)	5,5224
outros	07 (7,0)	6,8778
Alelo 1 (410bp)	0,730	$\chi^2=2,2381$
Alelo 2 (240bp)	0,235	DF=3, $p > 0,05$
Outros (alelos 3, 4, 5 ou 0)	0,035	

**Tabela 1. CONTINUAÇÃO.**

	<b>Número observado (%)</b>	<b>Número esperado</b>
<b>Polimorfismo <i>IL6-174G/C</i></b>		
<b>n=50</b>		
1.1 (GG)	31 (62,0)	30,4200
1.2 (GC)	16 (32,0)	17,1600
2.2 (CC)	03 (6,0)	2,4199
Alelo 1 (G)	0,780	$\chi^2=0,2284$
Alelo 2 (A)	0,220	DF=1, p>0,05
<b>Polimorfismo <i>TNF-308G/A</i></b>		
<b>n=100</b>		
1.1 (GG)	66 (66,0)	63,2025
1.2 (GA)	27 (27,0)	32,5949
2.2 (AA)	07 (7,0)	4,2024
Alelo 1 (G)	0,7950	$\chi^2=2,9464$
Alelo 2 (A)	0,2049	DF=1, p>0,05
<b>Polimorfismo <i>LTA+252G/A</i></b>		
<b>n=60</b>		
1.1 (GG)	04 (6,7%)	4,5375
1.2 (GA)	25 (41,7%)	23,9250
2.2 (AA)	31 (51,6%)	31,5375
Alelo 1 (A)	0,275	$\chi^2=0,1211$
Alelo 2 (G)	0,725	DF=1, p>0,05

**Tabela 2.** Comparação das freqüências genóticas dos polimorfismos *IL1B* -511C/T e +3953C/T, *IL1RN* intron 2 VNTR, *IL6* -174G/C, *TNF* -308G/A e *LTA*+252G/A entre diferentes populações e a população estudada. Os resultados em negrito assinalam diferenças significativas quando comparados com a população da região de Campinas (testes  $\chi^2$ , com  $p < 0,05$ ).

<i>IL1 gene</i>	Posição gênica e genótipos	Populações e freqüências genóticas							
		População do sudeste do Brasil – Estudo atual (%)	Italiana (1) (n=140) (%)	Inglês (2) (n=145) (%)	Caucasiano da América do Norte (3) (n=200) (%)	Chineses-Tailandeses (3) (n=145) (%)	Finlandeses (doadores de sangue) (4) (n=200) (%)	Afro-Americanos (5, 6) (%)	
<i>IL1B</i>	-511	C/C	<b>43 (43,0)</b>	70 (50,0)	61 (42,0)	81 (40,0)	<b>34 (23,0)</b>	68 (34)	<b>31 (17,4)</b> <sup>5</sup>
		C/T	<b>38 (38,0)</b>	57 (41,0)	67 (46,0)	93 (47,0)	<b>71 (49,0)</b>	92 (46)	<b>115 (52,5)</b>
		T/T	<b>19 (19,0)</b>	13 (9,0)	17 (12,0)	26 (13,0)	<b>40 (28,0)</b>	40 (20)	<b>66 (30,1)</b>
<i>IL1B</i>	+3953	C/C	<b>62 (62,0)</b>	76 (54)	87 (60)	114 (57)	<b>143 (99)</b>	108 (54)	154 (70,3) <sup>5</sup>
		C/T	<b>31 (31,0)</b>	58 (40)	49 (34)	75 (38)	<b>02 (01)</b>	76 (38)	58 (26,5)
		T/T	<b>07 (7,0)</b>	08 (06)	09 (06)	11 (06)	-	16 (08)	07 (3,2)
<i>IL1RN</i>	Intron 2	1/1	<b>55 (55,0)</b>	-	-	108 (54)	<b>126 (87)</b>	104 (52)	<b>140 (79,6)</b> <sup>6</sup>
		1/2	<b>30 (30,0)</b>	-	-	72 (36)	<b>16 (11)</b>	74 (37)	<b>23 (13,1)</b>
		2/2	<b>08 (8,0)</b>	-	-	09 (05)	<b>01 (01)</b>	18 (09)	<b>06 (3,4)</b>
		1/3	<b>04 (4,0)</b>	-	-	07 (04)	<b>01 (01)</b>	04 (02)	<b>02 (1,1)</b>
		Outros	<b>03 (3,0)</b>	-	-	04 (02)	<b>01 (01)</b>	-	<b>05 (2,8)</b>

Fonte: (1) UBOLDI DE CAPEI et al., 2003; (2) MARSHALL et al., 2001; (3) TSENG et al., 2001; (4) HURME et al., 1998; (5) PANDEY et al., 2002; (6) RIDER et al., 2000.

**Tabela 2. CONTINUAÇÃO.**

		População do sudeste do Brasil - Estudo Atual (%)	Italiana (1) (%)	Inglesa (2, 3) (%)	Alemã (4, 5) (%)	Francesa (6)	Afro- Americanos (2, 7) (%)	Caucasiano da América do Norte (7, 8) (%)	Chineses (9) (%)	
<b>IL6</b>	<b>-174</b>	<b>G/G</b>	<b>31 (62,0)</b>	180 (49,7)	<b>144 (37,6)</b> <sup>2</sup>	43 (38,7) <sup>4</sup>	<b>92 (91,1)</b> <sup>2</sup>	<b>25 (32,0)</b> <sup>7</sup>	<b>83 (100)</b>	
		<b>G/C</b>	<b>16 (32,0)</b>	142 (39,3)	<b>169 (44,1)</b>	49 (44,1)	<b>9 (8,9)</b>	<b>39 (50,0)</b>	<b>0 (0)</b>	
		<b>C/C</b>	<b>03 (6,0)</b>	40 (11,0)	<b>70 (18,3)</b>	10 (17,1)	<b>0 (0)</b>	<b>14 (18,0)</b>	<b>0 (0)</b>	
<b>TNF</b>	<b>-308</b>	<b>G/G</b>	<b>66 (66,0)</b>	<b>277 (76,9)</b>	64 (72,7) <sup>3</sup>	143 (66,2) <sup>5</sup>	69 (71,9)	52 (71,2) <sup>7</sup>	140 (69,0) <sup>8</sup>	64 (77,1)
		<b>G/A</b>	<b>27 (27,0)</b>	<b>80 (22,2)</b>	22(25,0)	63 (29,2)	24 (25,0)	20 (27,4)	59 (29,1)	18 (21,7)
		<b>A/A</b>	<b>07 (7,0)</b>	<b>03 (0,8)</b>	02 (2,3)	10 (4,6)	03 (3,1)	01 (1,4)	04 (1,9)	01 (1,2)
<b>LTA</b>	<b>+252</b>	<b>G/G</b>	<b>04 (6,7)</b>		15 (17,0) <sup>3</sup>	23 (12,0) <sup>5</sup>	10 (10,4)	<b>21 (28,8)</b> <sup>7</sup>	<b>98 (48,3)</b> <sup>8</sup>	<b>25 (30,1)</b>
		<b>G/A</b>	<b>25 (41,7)</b>		37 (42,0)	90 (46,9)	38 (39,6)	<b>32 (43,8)</b>	<b>84 (41,4)</b>	<b>35 (42,2)</b>
		<b>A/A</b>	<b>31 (51,6)</b>		36 (41,0)	79 (41,1)	48 (50,0)	<b>20 (27,4)</b>	<b>21 (10,3)</b>	<b>23 (27,7)</b>

Fonte: (1) POLI et al, 2002; (2) FISHMAN et al., 1998; (3) FITZGIBBON et al, 1999; (4) NIETERS et al, 2001; (5) SCITZER et al, 1997; (6) WARZOPCHA et al, 1998; (7) COZEN et al, 2004; (8) PARKS et al, 2004; (9) MEENAGH et al, 2002

**Tabela 3.** Tabela demonstrando resultados de contagem de leucócitos (Lo) e plaquetas (PLT), níveis de citocinas nos CP-PRP durante armazenamento e polimorfismos *IL1B*-511C/T e +3953C/T, *IL1RN* intron 2 e *TNF*-308G/A. \* Valores expressos em Média (Faixa) Mediana. § Valores expressos em Média ± Desvio Padrão (Mediana).

<b><i>L1B-511C/T – Níveis de IL-1B (pg/ml) durante o armazenamento</i></b>						
<b>Genótipos</b>	<b>Lo (x10<sup>9</sup>/L) *</b>	<b>PLT (x10<sup>11</sup>/L) *</b>	<b>Dia 3 §</b>	<b>Dia 5 §</b>	<b>Dia 7 §</b>	
<b>1.1 (CC) (n=9)</b>	1,73 (0,7-3,1) 1,80	1,44 (1,16-1,85) 1,32	0,69±1,42 (0,0)	22,10±41,90 (0,0)	41,98±69,68 (10,29)	
<b>1.2 (CT) (n=13)</b>	3,60 (0,9-18,8) 2,30	1,32 (0,92-1,8) 1,28	2,99±8,06 (0,0)	13,82±40,66 (1,21)	64,74±144,39 (5,08)	
<b>2.2 (TT) (n=8)</b>	2,21 (0,6-4,4) 2,15	1,29 (0,78-1,55) 1,39	10,93±27,91 (0,0)	82,30±127,75 (26,9)	224,64±185,89 (175,5)	
<b><i>IL1B+3953C/T - Níveis de IL-1β (pg/ml) durante o armazenamento</i></b>						
<b>1.1 (CC) (n=21)</b>	2,82 (0,6-18,2) 2,10	1,33 (0,92-1,8) 1,32	2,40±6,52 (0,0)	25,69±52,14 (0,76)	108,91±165,48 (10,64)	
<b>1.2 (CT) (n=9)</b>	2,51 (0,7-7,1) 2,00	1,38 (0,78-1,85) 1,37	10,28±28,05 (0,0)	62,17±125,37 (5,41)	91,18±142,28 (28,35)	
<b>2.2 (TT) (n=0)</b>	-	-	-	-	-	
<b><i>ILRN intron 2 - Níveis de IL-1β (pg/ml) durante o armazenamento</i></b>						
<b>1.1+1.4 (n=17)</b>	3,31 (0,7-18,8) 2,30	1,29 (0,78-1,85) 1,29	5,57±19,21 (0,0)	34,75±89,85 (0,76)	63,88±116,67 (10,29)	
<b>1.2+2.2 (n=13)</b>	1,83 (0,6-4,4) 1,60	1,42 (0,92-1,81) 1,42	2,91±8,06 (0,0)	34,33±60,68 (2,26)	148,50±189,54 (46,33)	
<b><i>TNF-308G/A – Níveis de TNF-α (pg/ml) durante o armazenamento</i></b>						
<b>1.1 (GG) (n=19)</b>	3,09 (0,6-18,8) 2,00	1,25 (0,78-1,68) 1,28	10,29±38,0 (0,0)	15,17±47,09 (0,0)	82,57±195,15 (0,0)	
<b>1.2 (GA) (n=8)</b>	1,86 (0,7-3,1) 1,75	1,51 (1,11-1,85) 1,50	0,71±2,01 (0,0)	1,07±3,05 (0,0)	6,73±17,10 (0,0)	
<b>2.2 (AA) (n=3)</b>	2,43 (1,8-2,9) 2,60	1,55 (1,29-1,81) 1,56	0,0	0,0	0,98±1,69 (0,0)	
<b>1.2/2.2 (GG/GA) (n=11)</b>	1,91 (0,7-3,1) 2,05	1,53 (1,11-1,85) 1,56	0,57±1,79 (0,0)	0,86±2,72 (0,0)	5,68±15,26 (0,0)	



**Tabela 4.** Frequência genotípica dos polimorfismos *IL1B*-511C/T e +3953C/T, *IL1RN* intron 2 e *TNF*-308G/A nos doadores voluntários de sangue para obtenção dos CP-PRP estudados. Análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg da frequência gênica usando teste Chi-quadrado: \* DF=1,  $\chi^2=0,525$ ,  $p>0,05$  (EH-W), \*\* DF=1,  $\chi^2=0,048$ ,  $p>0,05$  (EH-W), § DF=3,  $\chi^2=0,830$ ,  $p>0,05$  (EH-W) e §§ DF=1,  $\chi^2=0,133$ ,  $p>0,05$  (EH-W).

<b>Polimorfismo <i>IL1B</i>-511C/T n=30</b>	<b>Frequência (%) *</b>
1.1 (CC)	09 (30,0%)
1.2 (CT)	13 (43,3%)
2.2 (TT)	08 (26,7%)
Alelo 1 (C)	0,52
Alelo 2 (T)	0,48
<b>Polimorfismo <i>IL1B</i>+3953C/T n=30</b>	<b>Frequência (%) **</b>
1.1 (CC)	21 (70,0%)
1.2 (CT)	08 (26,7%)
2.2 (TT)	01 (3,3%)
Alelo 1 (C)	0,83
Alelo 2 (T)	0,17
<b>Polimorfismo <i>IL1RN</i> intron 2 n=30</b>	<b>Frequência (%) §</b>
1.1	16 (53,3%)
1.2	12 (40,0%)
2.2	01 (3,3%)
Outros	01 (3,3%)
Alelo 1 (410bp)	0,75
Alelo 2 (240bp)	0,23
Outros	0,02
<b>Polimorfismo <i>TNF</i>-308G/A n=30</b>	<b>Frequência (%) §§</b>
1.1 (GG)	21 (70,0%)
1.2 (GA)	07 (23,0%)
2.2 (AA)	02 (7,0%)
Alelo 1 (G)	0,81
Alelo 2 (A)	0,19

**Tabela 5.** Características básicas dos pacientes: idade (Média ± DP (Faixa) Mediana em anos), sexo e diagnóstico.

\* Valores de P do teste T não pareado para idade e teste  $\chi^2$  para sexo. NS – Não significativo estatisticamente. DP – Desvio Padrão.

	Com RFNH precoce	Sem RFNH	Total	Valor P*
<b>Idade* (anos)</b>	49,2 ± 14,5 (24-73) 50,0	45,3 ± 19,0 (11-82) 41,5	46,5 ± 17,7 (11-82) 44,5	0,35 (NS)
<b>Sexo (%)</b>				
Masculino	7 (58%)	17 (60%)	24 (60%)	0,83 (NS)
Feminino	5 (42%)	11 (40%)	16 (40%)	
<b>Diagnóstico</b>				
Linfoma Não Hodgkin	2	6	8	0,83 (NS)
Síndrome Mielodisplásica /	3	6	9	
Anemia aplástica Grave	2	3	5	
Outras doenças neoplásicas	2	2	4	
Doença Hepática	1	3	4	
Talassemia ou doença	-	3	3	
Leucemia mielóide crônica	-	2	2	
Outras	2	3	5	

**Tabela 6.** Frequência genotípica dos polimorfismos dos genes *IL1B*-511C/T e +3953C/T, *IL1RN* intron 2, *IL6*-174G/C, *TNF*-308G/A, *LTA*+252G/A, *IL10*+1082G/A e *IL10*+819C/T em pacientes multitransfundidos. Testes estatísticos: Teste  $\chi^2$  ou Fisher Teste; Não significativo (NS) se  $p \geq 0,05$ .

Polimorfismos gênicos	Genótipos	Grupo controle (%)	Pacientes (total) (%)	Pacientes com RFNH precoce (%)	Pacientes Sem RFNH (%)	Teste $\chi^2$ (p)	
						Controle X pacientes	Pacientes com X sem RFNH precoce
<b><i>IL1B</i>-511C/T</b>	CC	43 (43,0)	07 (17,5)	02 (16,7)	05 (17,9)	$\chi^2=9,79$ DF=2 p=0,007	$\chi^2=0,02$ DF=2 p=0,99 (NS)
	CT	38 (38,0)	26 (65,0)	08 (66,6)	18 (64,2)		
	TT	19 (19,0)	07 (17,5)	02 (16,7)	05 (17,9)		
<b><i>IL1B</i>+3953C/T</b>	CC	62 (62,0)	15 (37,5)	04 (33,3)	11 (39,3)	$\chi^2=7,87$ DF=2 p=0,019	$\chi^2=0,67$ DF=2 p=0,715 (NS)
	CT	31 (31,0)	18 (45,0)	05 (41,7)	13 (46,4)		
	TT	07 (7,0)	07 (17,5)	03 (25,0)	04 (14,3)		
<b><i>IL1RN</i> VNTR, intron 2</b>	1.1	55 (55,0)	13 (32,5)	02 (16,7)	11 (39,3)	$\chi^2=6,968$ DF=3 p=0,073 (NS)	<b><math>\chi^2=9,719</math></b> <b>DF=3</b> <b>p=0,021</b>
	1.2	30 (30,0)	21 (52,5)	07 (58,3)	14 (50,0)		
	2.2	08 (8,0)	03 (7,5)	03 (25,0)	0		
	Outros	07 (7,0)	03 (7,5)	0	03 (10,7)		
<b><i>IL6</i>-174G/C</b>	GG	31 (62,0)	17 (56,7)	09 (75,0)	08 (44,4)	$\chi^2=0,5$ DF=2 p=0,779 (NS)	$\chi^2=2,91$ DF=2 p=0,233 (NS)
	GC	16 (32,0)	10 (33,3)	02 (16,7)	08 (44,4)		
	CC	03 (6,0)	03 (10,0)	01 (8,3)	02 (11,2)		
<b><i>TNF</i>-308G/A</b>	GG	66 (66,0)	25 (62,5)	06 (50,0)	19 (67,8)	$\chi^2=0,15$ DF=2 p=0,925 (NS)	$\chi^2=4,0$ DF=2 p=0,135 (NS)
	GA	27 (27,0)	12 (30,0)	06 (50,0)	06 (21,4)		
	AA	07 (7,0)	03 (7,5)	0	03 (10,8)		
<b><i>LTA</i>+252G/A</b>	GG	04 (6,7)	14 (35,0)	03 (25,0)	11 (39,3)	$\chi^2=19,795$ DF=2 p=0,0001	$\chi^2=1,63$ DF=2 p=0,443 (NS)
	GA	25 (41,7)	20 (50,0)	06 (50,0)	14 (50,0)		
	AA	31 (51,6)	06 (15,0)	03 (25,0)	03 (10,7)		

**Tabela 7.** Frequência genotípica dos polimorfismos gênicos *IL1B* -511C/T e +3953C/T, *IL1RN* intron 2, VNTR, *IL6* -174G/C, *TNF* -308G/A, *LTA*+252G/A, *IL10*+1082G/A e *IL10*+819C/T e os fenótipos prováveis associados nos pacientes multitransfundidos estudados. Análise estatística comparando grupo controle e de pacientes com antecedente de RFNH precoce (RFNH<sub>P</sub>) e sem RFNH (OR – Odds Ratio, 95% intervalo de confiança, Fteste - Fisher Teste e  $\chi^2$  - Teste Chi-quadrado).

Polimorfismo genes	Genótipo	Fenótipo provável associado	Pacientes com RFNH Precoce (%)*	Pacientes sem RFNH (%)**	Teste Estatístico
<b><i>IL1B</i> -511C/T</b>	CC		02 (16,7)	05 (17,9)	$\chi^2= 0,02$ DF=2 p=0,99 (NS)
	CT		08 (66,6)	18 (64,2)	
	TT		02 (16,7)	05 (17,9)	
	CC	Baixo produtor	02 (16,7)	05 (17,8)	OR=1,087 (0,179 – 6,576)
	CT +TT	Alto produtor	10 (83,3)	23 (82,2)	Fteste p=0,654 (NS)
<b><i>IL1B</i> +3953C/T</b>	CC		04 (33,3)	11 (39,3)	$\chi^2= 0,67$ DF=2 p=0,715 (NS)
	CT		05 (41,7)	13 (46,4)	
	TT		03 (25,0)	04 (14,3)	
	CC	Baixo produtor	04 (33,3)	11 (39,3)	OR=1,2941 (0,313 – 5,353)
	CT + TT	Alto produtor	08 (66,7)	17 (60,7)	Fteste p =0,505 (NS)
<b><i>IL1RN</i> VNTR, intron 2</b>	1.1		02 (16,7)	11 (39,3)	$\chi^2= 9,719$ DF=3 p=0,021
	1.2		07 (58,3)	14 (50,0)	
	2.2		03 (25,0)	0	
	1.3		0	0	
	outros		0	03 (10,7)	
	1.1 + 1.3 + 1.4 + 1.5 + 1.2 + 2.3	Baixo produtor	09 (75,0)	28 (100,0)	Fteste=0,0223
	2.2	Alto produtor	03 (25,0)	0	

**Tabela 7. CONTINUAÇÃO.**

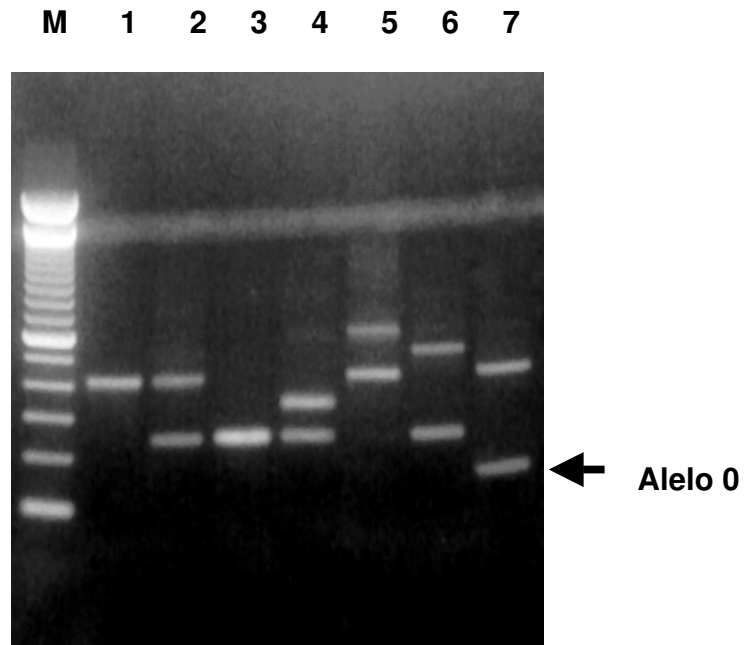
Polimorfismo genes	Genótipo	Fenótipo provável associado	Pacientes com RFNH Precoce (%)*	Pacientes sem RFNH (%)**	Teste Estatístico
<b>IL6 -174G/C</b>	GG		09 (75,0)	08 (44,4)	$\chi^2= 2,91$ DF=2 p=0,233 (NS)
	GC		02 (16,7)	08 (44,4)	
	CC		01 (8,3)	02 (11,2)	
	GG	Alto produtor	09 (75,0)	08 (44,4)	OR=3,750 (0,754 – 18,642)
	GC + CC	Baixo produtor	03 (25,0)	10 (55,6)	Fteste p=0,099 (NS)
	GG + GC	Alto produtor	11 (91,7)	16 (88,8)	OR=1,375 (0,111 – 17,094)
	CC	Baixo produtor	01 (8,3)	02 (11,2)	Fteste p=0,653 (NS)
	<b>TNF -308G/A</b>	GG		06 (50,0)	19 (67,8)
GA			06 (50,0)	06 (21,4)	
AA			0	03 (10,8)	
GG		Baixo produtor	06 (50,0)	19 (67,8)	OR=2,111 (0,530 – 8,407)
GA + AA		Alto produtor	06 (50,0)	09 (32,2)	Fteste p=0,237 (NS)
<b>LTA +252G/A</b>	GG		03 (25,0)	03 (10,7)	$\chi^2= 1,63$ DF=2 p=0,4426 (NS)
	GA		06 (50,0)	14 (50,0)	
	AA		03 (25,0)	11 (39,3)	
	GG + GA	Baixo produtor	09 (75,0)	17 (60,7)	OR=0,515 (0,114 – 2,334)
	AA	Alto produtor	03 (25,0)	11 (39,3)	Fteste p=0,311 (NS)
	GG	Baixo produtor	03 (25,0)	03 (10,7)	OR=0,36 (0,061 – 2,119)
	GA + AA	Alto produtor	09 (75,0)	25 (89,3)	Fteste p=0,242 (NS)

Tabela 7. CONTINUAÇÃO.

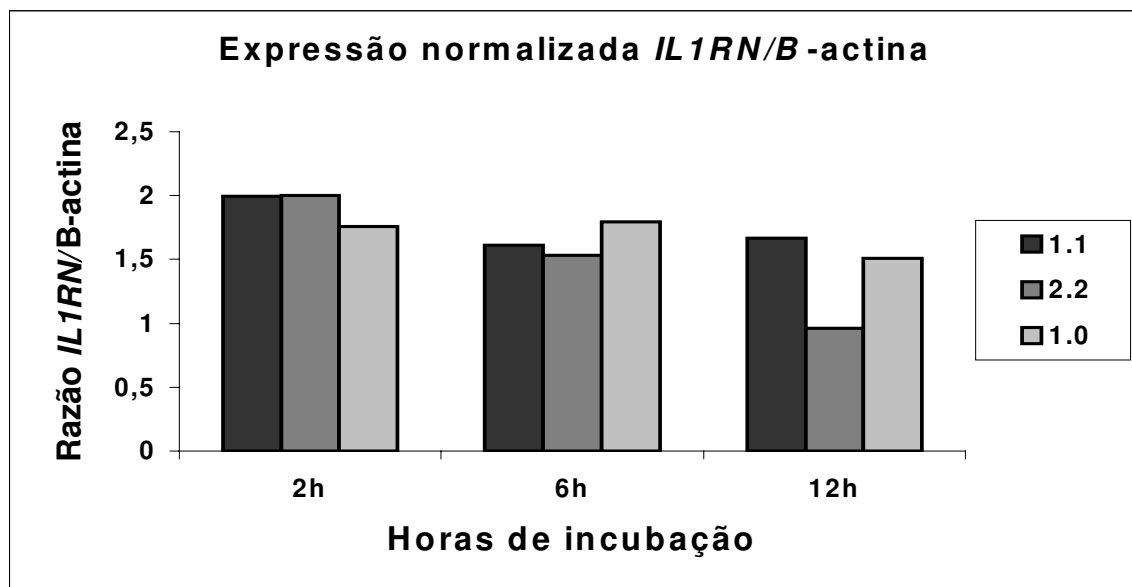
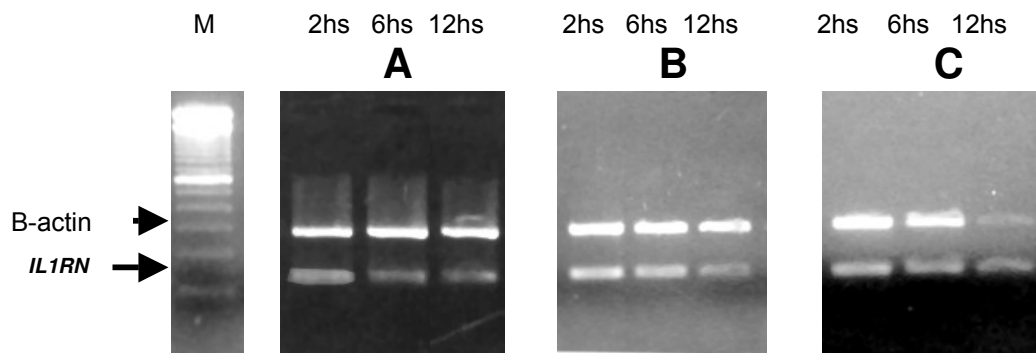
Polimorfismo genes	Genótipo	Fenótipo provável associado	Pacientes com RFNH Precoce (%)*	Pacientes sem RFNH (%)**	Teste Estatístico	
<b>IL10 -1082G/A</b>	GG		02 (16,7)	02 (7,2)	$\chi^2= 1,12$ DF=2 p=0,5712 (NS)	
	GA		06 (50,0)	13 (46,4)		
	AA		04 (33,3)	13 (46,4)		
		GG/GA		08 (66,7)	15 (53,6)	OR=1,733 (0,423 – 7,110) Fteste=0,340 (NS)
		AA		04 (33,3)	13 (46,4)	
		GG		02 (16,7)	02 (7,1)	OR=2,600 (0,321 – 21,048) Fteste p=0,346 (NS)
		GA/AA		10 (83,3)	26 (92,9)	
<b>IL10 -819C/T</b>	CC		05 (41,7)	13 (46,4)	$\chi^2= 0,51$ DF=2 p=0,7749 (NS)	
	CT		06 (50,0)	11 (39,3)		
	TT		01 (8,3)	04 (14,3)		
		CC		05 (41,7)	13 (46,4)	OR=0,824 (0,210 – 3,234) Fteste p=0,529 (NS)
		CT/TT		07 (58,3)	15 (53,6)	
<b>IL10 -1082/-819</b>	AC/AC, AC/AT, AT/AT	Baixo produtor	04 (33,7)	13 (46,4)	$\chi^2= 1,12$ DF=2 p=0,571 (NS)	
	GC/AT, GC/AC	Intermediário	06 (50,0)	13 (46,4)		
	GC/GC	Alto produtor	02 (16,3)	02 (7,2)		
	AC/AC, AC/AT, AT/AT	Baixo produtor	04 (33,7)	13 (46,4)	OR=1,733 (0,423 - 7,110) Fteste p=0,340 (NS)	
	GC/AT, GC/AC, GC/GC	Intermediário + Alto produtor	08 (66,3)	15 (53,6)		
	AC/AC, AC/AT, AT/AT, GC/AT, GC/AC	Baixo + Intermediário produtor	10 (83,3)	26 (92,9)	OR=2,6 (0,321 – 21,048) Fteste p=0,346 (NS)	
	GC/GC	Alto produtor	02 (16,7)	02 (7,1)		

**Resultado**

**Figura 1.** Gel de eletroforese demonstrando o polimorfismo do gene *IL1RN* intron 2, VNTR: genótipo 1/1 (posição 1), 1/2 (posição 2), 2/2 (posição 3), 2/4 (posição 4), 1/5 (posição 5), 2/3 (posição 6), 1/0 (posição 7). A seta identifica ao variante rara com 154-bp, contendo somente uma repetição do fragmento de 86-bp (*IL1RN\*0*, alelo 0). Posição M: marcador de DNA 100 bp ladder.

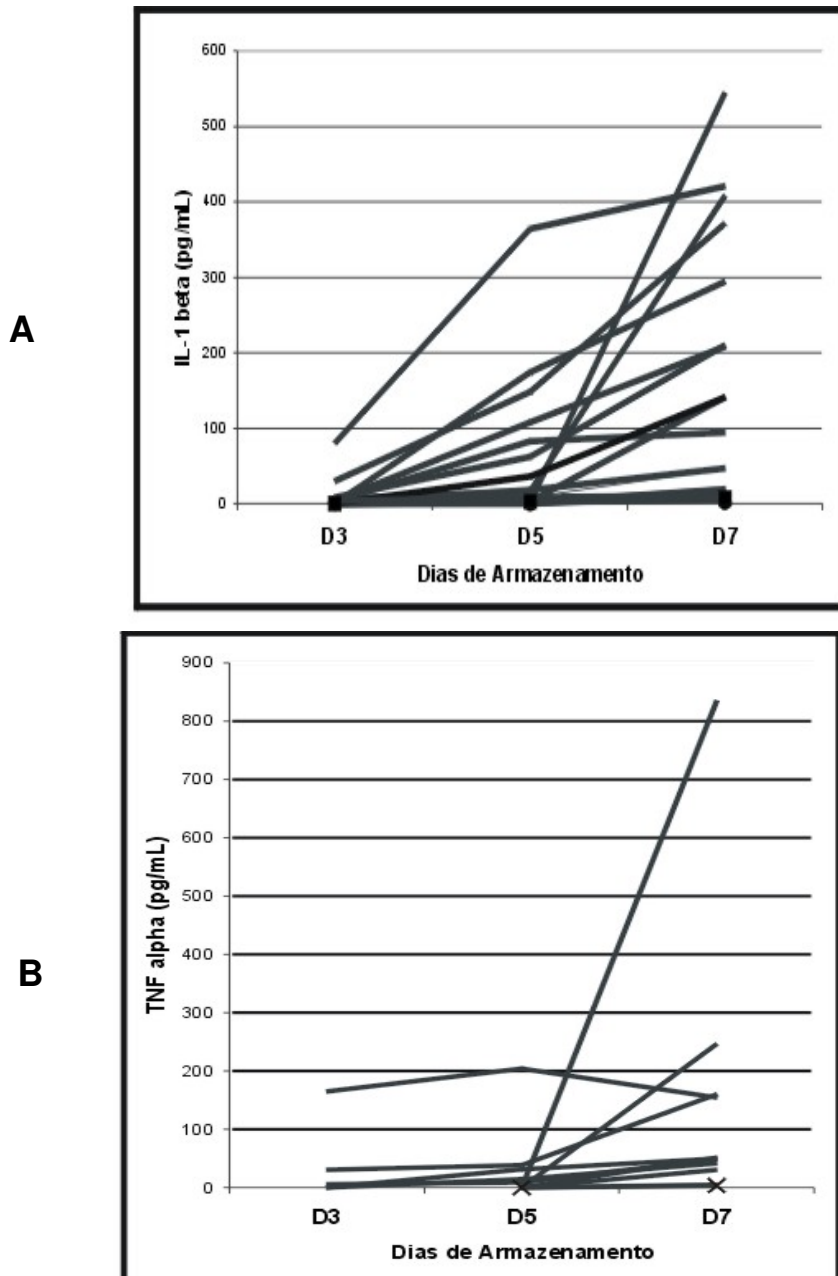


**Figura 2.** Efeito da estimulação com LPS na produção de *IL1RN* RNA em sangue total de doadores voluntários com diferentes genótipos do polimorfismo *IL1RN* intron 2 VNTR (A 1/1, B 2/2 e C 1/0). Demonstram-se os resultados como razão obtida pela normalização através da comparação com a expressão do gene da  $\beta$ -actina (razão *IL1RN*/ $\beta$ -actina). Reação em conjunto.

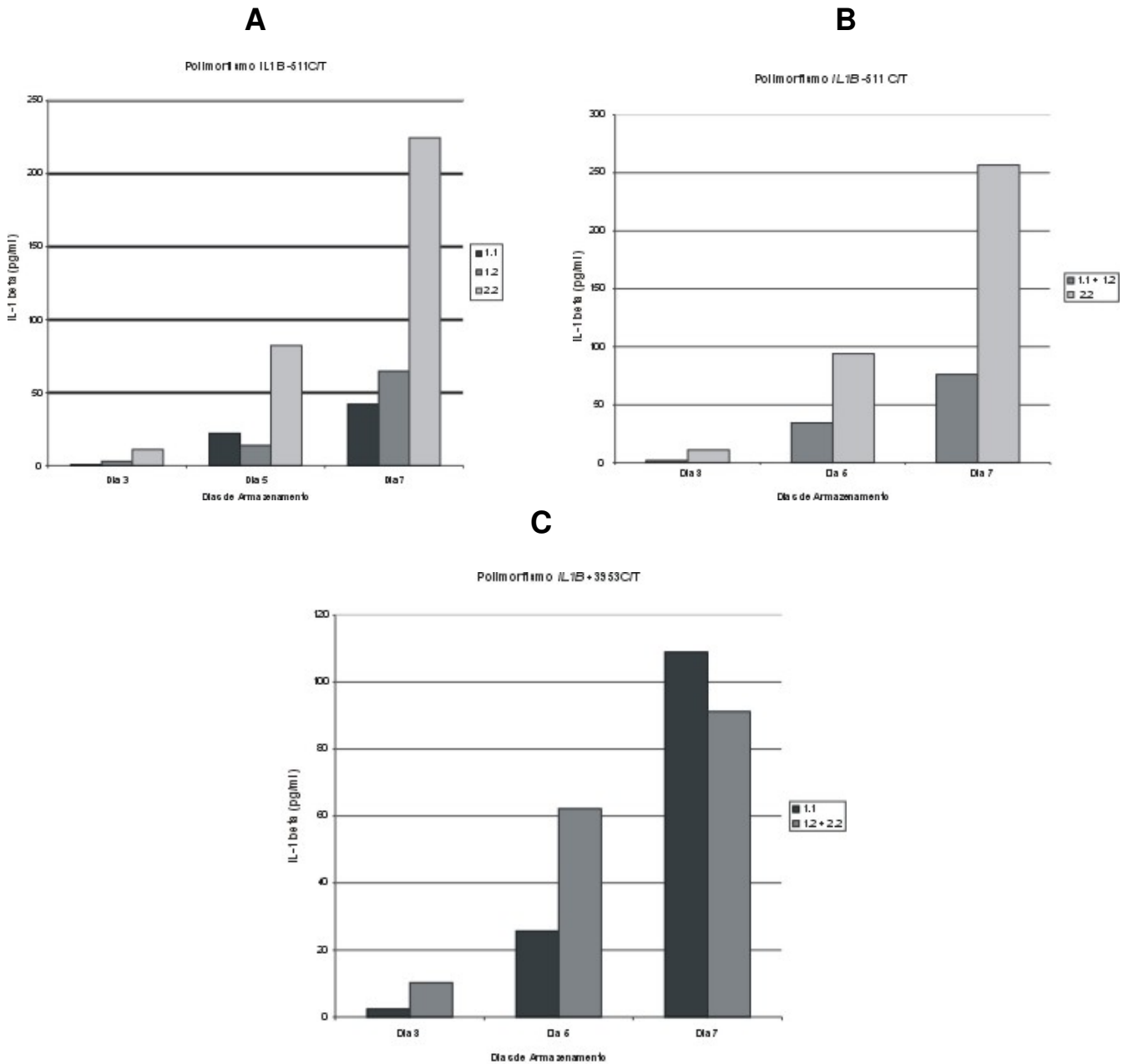




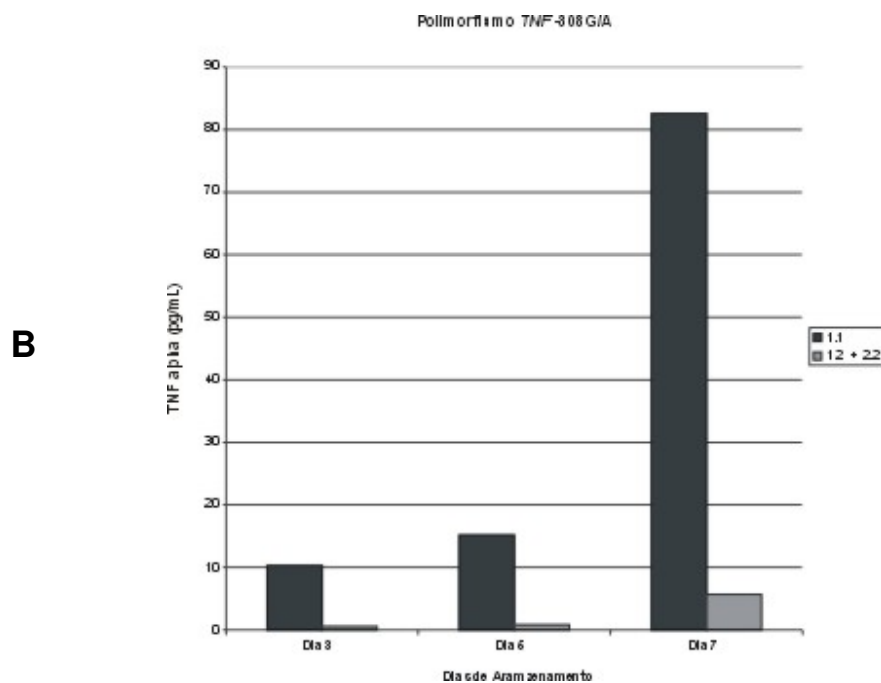
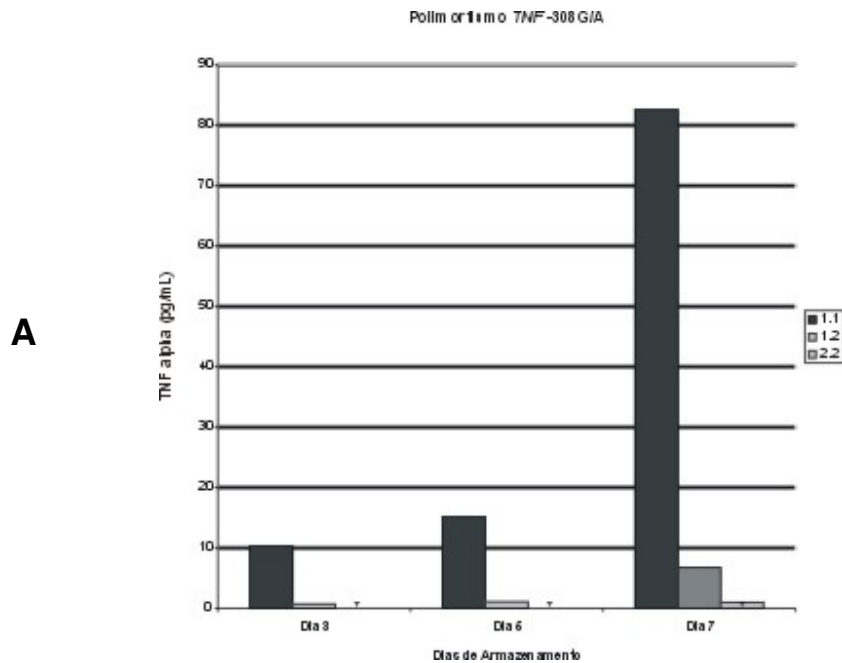
**Figure 3.** Comparação dos níveis de IL-1 $\beta$  e TNF em CP-PRP durante o armazenamento (início no dia 3 – D3 e término no dia 7 – D7). Cada linha representa a dosagem de uma unidade de CP. Os valores inferiores à sensibilidade do teste não foram demonstrados. A) dosagens de IL-1 $\beta$  nos dias 3, 5 e 7, estes níveis de citocinas são maiores em cada amostra comparadas com a dosagem anterior e com o D3 ( $p < 0,05$ ). B) os mesmos resultados são observados na avaliação dos níveis de TNF- $\alpha$ .



**Figura 4.** Níveis de IL-1 beta (IL-1 $\beta$ ) no sobrenadante de CP-PRP durante o armazenamento associado como os polimorfismos do gene IL1B -511C/T (A e B) e +3953C/T (C). A análise estatística utilizando-se o teste de Wilcoxon ( $p < 0,05$ ) é demonstrada por \* $p < 0,05$  ou \*\* NS ( $p > 0,05$ ).



**Figura 5.** Níveis de TNF alfa no sobrenadante de CP-PRP durante o armazenamento associado com o polimorfismo *TNF* -308G/A. A análise estatística utilizando-se o teste de Wilcoxon ( $p < 0,05$ ) é demonstrada por \* $p < 0,05$  ou \*\* NS ( $p > 0,05$ ).





## ***DISCUSSÃO***

---



Citocinas são proteínas ou glicoproteínas solúveis secretadas que controlam ou modulam as atividades de células alvos através da ligação com receptores específicos, iniciando um sinal de transdução e desencadeando uma cadeia de mensageiros secundários. As citocinas são um grupo extremamente pleomórfico, afetando vários órgãos e sistemas do organismo. Existe considerável interação entre diferentes citocinas desencadeando a ativação ou supressão de diversos genes. Este grupo de substâncias inclui as interleucinas, os interferons e a família do fator de necrose tumoral. A classificação mais comumente utilizada divide as citocinas em 2 grupos: Th1 – citocinas pró-inflamatórias como o TNF e a IL-1, e Th2 – citocinas anti-inflamatórias com a IL-10 e IL-4. Esta classificação é genérica, pois algumas citocinas podem ser pró- ou anti-inflamatórias de acordo com o sistema celular envolvido.

Atualmente, existe um grande interesse científico em estudar os polimorfismos dos genes que codificam as citocinas e seus receptores e como afetam o controle destes genes. Os polimorfismos podem ser de três formas principais: polimorfismos de troca de nucleotídeo único (“single nucleotide polymorphism” - SNPs), número variável de repetições (“variable number of tandem repeats” – VNTRs) ou microsátélites. Alguns destes polimorfismos levam à substituição de um aminoácido na cadeia protéica, porém a maioria, no caso das citocinas e de seus receptores, encontram-se na região promotora do gene, na região intrônica ou na região 3’, regiões estas não traduzidas; porém mesmo assim podem influenciar na expressão ou na função do gene. Polimorfismos da região promotora podem perturbar ou abolir a atividade de elementos reguladores da transcrição comprometendo os sinais de transdução. As variações da região intrônica podem afetar seqüências de estímulo ou silenciadoras e, em alguns casos, alterar a arquitetura dos elementos de ligação dos fatores de transcrição. Mesmo sendo bastante freqüente, a maioria dos polimorfismos encontrados no gene das citocinas parece ter pequena ou nenhuma influência na produção ou expressão gênica, mas em alguns casos, têm sido observadas associações com determinadas doenças. Nestes casos, pode existir uma correlação direta com a expressão dos genes das citocinas ou uma ligação com outros polimorfismos.

O mecanismo de aumento de temperatura corporal em geral, e presumivelmente na RFNH, parece ser uma regulação mediada pelas citocinas que agem na área de controle

termostático da temperatura corporal localizado na área pré-óptica do hipotálamo anterior. Citocinas que funcionam como pirógenos endógenos, como IL-1, IL-6 e TNF, parecem desencadear efeitos termoreguladores através do desencadeamento da síntese de prostaglandina (PG) E<sub>2</sub> no hipotálamo anterior, e são extremamente importantes na patogênese da febre. Os sintomas associados, de tremores e calafrios, normalmente aparecem antes da febre, e participam do aparecimento desta por produção de calor pelas contrações musculares e vasoconstrição periférica (STACK & BERKOWICZ, 1997).

Como descrito acima, as citocinas são substâncias envolvidas no mecanismo de aparecimento de febre e, portanto nas manifestações clínicas das reações transfusionais principalmente das reações febris não-hemolíticas (RFNHs). As RFNHs são efeitos adversos relacionados com a transfusão de componentes sanguíneos alogênicos, caracterizados por aumento da temperatura corporal superior a 1°C a partir da temperatura inicial, sem outra causa associada, e podendo ser acompanhada de outros sintomas ou sinais como tremores, calafrios, etc. A frequência deste tipo de reação transfusional depende do tipo de componente e de características dos pacientes como sexo, paridade, número de transfusões anteriores e quadro clínico. Dois mecanismos estão envolvidos: o primeiro, associado à presença de anticorpos contra antígenos leucocitários no receptor que reagem com os leucócitos contaminantes dos hemocomponentes, levando a estímulo de produção e liberação de citocinas (mecanismo clássico), e o segundo, relacionado com o acúmulo de citocinas durante o armazenamento dos CPs (mecanismo alternativo). Em ambos, as citocinas estão envolvidas e, portanto o estudo destes mecanismos poderá trazer informações relevantes para proposição de condutas para tratamento e/ou profilaxia.

No presente estudo, procuramos avaliar a relação de características genéticas – polimorfismos dos genes das citocinas – dos doadores de sangue utilizados para produção de CPs e de pacientes multitransfundidos, tentando evidenciar fatores de risco relacionados com a ocorrência de RFNHs.



## **Análise Populacional**

A frequência dos alelos *IL1B*-511C (alelo 1) e +3953C (alelo 1) entre a população de doadores de sangue da região de Campinas, sudeste do Brasil (0,620 e 0,775, respectivamente) está em acordo com os resultados publicados anteriormente de estudos em populações caucasianas (cerca de 0,60 e 0,75, respectivamente) (BIOQUE et al., 1995; HURME et al., 1998b; MORSE et al., 1999; PILLAY et al., 2000; TSENG et al., 2001; SCIACCA et al., 2002). Por outro lado, na comparação feita entre a nossa população e a população asiática (chinesa-tailandesa), observamos que esta apresenta frequências do alelo +3953T menores e do alelo -511T maiores (TSENG et al., 2001) que a nossa. A população constituída por americanos afro-descendentes, estudada por PANDEY et al (2002) mostra frequência menor do alelo -511C (alelo 1) quando comparada com a da região sudeste do Brasil, porém frequência semelhante dos genótipos e alelos dos polimorfismos *IL1B*+3953C/T.

As frequências dos alelos polimórficos do gene *IL1RN*, observadas em nosso estudo, foram semelhantes às encontradas por PILLAY et al (2000) e por outros autores em população controle caucasiana (TARLOW et al., 1993; HURME et al., 1998a; HURME et al., 1998b; TSENG et al., 2001). PILLAY et al. (2000) and TSENG et al. (2001) detectaram baixas frequências do alelo *IL1RN*\*2 em africanos e asiáticos (chineses-tailandeses). RIDER et al. (2000) observaram frequência semelhante do alelo *IL1RN*\*2 (9,94%) em grupo controle constituído por africanos. Comparando estes achados com os nossos, observamos que nossa população apresenta frequências mais elevadas de genótipos com o alelo *IL1RN*\*2 (genótipos 1/2 e 2/2).

A origem étnica da população brasileira é heterogênea e irregularmente distribuída em um país de dimensões continentais. Além da população indígena nativa, o Brasil recebeu imigrantes de vários países da Europa como Portugal, Itália, Espanha e Alemanha, do Oriente como Japão, dos países árabes e da África. Porém, observamos intensa mistura, o que faz da população brasileira única nas suas características étnicas e de miscigenação. Por outro lado, as frequências dos genótipos *IL1B* e *IL1RN* estudados mostram resultados semelhantes às populações caucasianas da Europa e da América do Norte; este fato pode ser devido ao predomínio da origem europeia na população do sudeste do Brasil (estado de São Paulo e região de Campinas) e à

provável influência da população caucasiana no sub-grupo de negróides (mulatos) presente na população estudada. As diferenças entre as populações asiática e africana e a nossa eram esperadas, pois as frequências alélicas dos polimorfismos *IL1B* e *IL1RN* diferem entre os europeus, orientais e africanos da região sub-Saara. Este fato se deve à ausência de doadores de sangue de origem oriental e ao pequeno número de descendentes de africanos em nosso grupo.

Estudando a frequência dos genótipos do polimorfismo *IL6-174G/C* de nossa população controle, evidenciamos frequência mais elevada dos genótipos GG e GC e do alelo *IL6-174G* que a população inglesa e da América do Norte constituídas por caucasianos (descendência predominantemente inglesa). A análise comparativa com afro-descendentes dos EUA e de asiáticos (chineses) mostra o oposto, isto, uma frequência muito superior do alelo *IL6-174G* e do genótipo *IL6-174GG*. Estes resultados demonstram claramente a composição de nossa população ficando, no que se refere à frequência destes polimorfismos, entre a de descendência inglesa e africana/asiática. Nossos resultados são comparáveis com os observados na população italiana e alemã, característica esta relacionada com o padrão de colonização da região sudeste do Brasil.

Surpreendentemente, em relação ao polimorfismo *TNF-308G/A*, a nossa população diferencia significativamente da italiana, com frequência maior do genótipo *TNF-308GG* e do alelo *TNF-308G* que a nossa. Ainda em relação a este polimorfismos, resultados semelhantes foram obtidos analisando-se nossa amostra e outras populações (européias, americana e asiática). Este resultado precisa de confirmação e vem em desencontro com os demais obtidos, onde podemos observar semelhanças entre a composição genética de nossa região e de populações italianas. Este achado pode significar a existência em nosso meio de algum fator seletivo associado ao alelo *TNF-308A*, aumentando sua frequência em nosso meio ou ainda uma característica específica da população italiana estudada por POLI et al. (2002).

A avaliação do polimorfismo *LTA+252G/A* continua demonstrando resultados semelhantes aos anteriores, onde temos uma frequência comparável entre nossa população e as de origem européia e diferenças entre esta e as constituídas por asiáticos e afro-descendentes.

Estes resultados são concordantes com as evidências históricas e dados genéticos que indicam que a população brasileira da região sudeste possui, predominantemente, ancestrais europeus e estes dados devem servir como base para estudos clínicos e imunológicos envolvendo os genes *IL1B*, *IL1RN*, *IL6*, *TNF* e *LTA*, bem como os estudos que avaliam o comportamento destas citocinas inflamatórias.

### ***Polimorfismo IL1RN\*0 e expressão gênica***

Detectamos em nossa população controle, constituída por doadores voluntários de sangue não relacionados, um raro alelo do polimorfismo no intron 2 do gene *IL1RN* contendo somente uma repetição do segmento de 86 bp (alelo *IL1RN\*0*). Esta variante alélica foi descrita por VAMVAKOPOULOS et al (2002). O alelo encontrado nos dois estudos pode possuir origens ancestrais semelhantes, pois nós também observamos 2 polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no fragmento de 86bp descrito anteriormente, preservando a seqüência do segmento de repetição bem como as regiões flangeadoras (3' e 5'). Este alelo parece ser raro em nossa população, como descrito anteriormente para a população européia, pois não foi encontrado em nenhum dos indivíduos estudados neste trabalho (controle ou pacientes multitransfundidos).

A análise da expressão do gene *IL1RN* nas células mononucleares estimuladas do indivíduo com genótipo *IL1RN* 1.0 não demonstrou diferença com os demais padrões (1.1 e 2.2). A única diferença observada foi uma redução da expressão do gene *IL1RN*, após 12 horas do estímulo, nas células obtidas de doadores com genótipo *IL1RN\*2.2*. Este achado é discrepante do descrito por DANIS et al. (1995), porém significativas diferenças entre os estudos podem ser identificadas: (1) DANIS et al. (1995) estudaram o acúmulo das proteínas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-1RA e nós a expressão gênica através da síntese de RNAm, (2) utilizamos estímulo com LPS, diferentemente do referido trabalho que utilizou GM-CSF e (3) nosso teste foi realizado com sangue total fresco, enquanto que aqueles autores utilizaram monócitos em cultura, talvez estas diferenças metodológicas justifiquem a discordância dos resultados.

A variação da expressão gênica pode ser influenciada por diferentes padrões de polimorfismo, neste caso como se trata de uma variação da região intrônica,

provavelmente esta se deve a alterações da conformação do gene, interferindo da transcrição.

### ***Acúmulo de citocinas e polimorfismo gênico nos CP***

As reações transfusionais associadas à transfusão de concentrado de plaquetas (CPs) devem-se à presença de anticorpos contra leucócitos contaminantes destes componentes ou ao acúmulo de citocinas inflamatórias ou outros mediadores imunes da resposta inflamatória acumulados durante o armazenamento como: IL-1, IL-6, IL-8 e TNF. Estas citocinas são produzidas pelas células mononucleares contaminantes que são ativadas pelas condições de armazenamento e este acúmulo está relacionado com a ocorrência e gravidade das reações febris não-hemolíticas (RFNH). A leucorredução dos CPs, utilizando filtros de leucócitos de terceira geração antes do armazenamento (pré-armazenamento), está associada com a redução da frequência das RFNHs e da intensidade das mesmas, quando não se utiliza profilaticamente medicações antitérmicas em pacientes com antecedente de múltiplas transfusões (AYE et al., 1995; HEDDLE et al., 2002).

A ativação dos leucócitos, principalmente das células mononucleares, está associada com o contato destas com o material plástico das bolsas de armazenamento de CPs. EL KATTAN et al. (1999) desenvolveram um modelo *in vitro* que demonstra a adesão diferenciada das células mononucleares ao substrato plástico das bolsas de armazenamento de CPs e um significativo acúmulo de citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF), que predomina com a utilização de bolsas produzidas com polímeros de poliolefin (polipropileno) quando comparados com as que contêm cloridrato de polivinil com TEHTM como plastificante. Este achado pode representar uma variável adicional que interfere no acúmulo de citocinas nos CPs durante o armazenamento. WOOD et al. (2000) demonstraram que a adesão de monócitos e a produção de IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-6 e IL-8 podem ser reduzidas com a utilização de algumas soluções de conservação de plaquetas com o Thrombo-Sol™, principalmente por seu conteúdo de amilorida. Esta substância, utilizada na prática clínica como diurético, tem um efeito inibidor do canal de Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> na membrana celular, mantendo assim o pH interno plaquetário e reduzindo o metabolismo do cálcio, participando da melhoria das

condições de conservação dos CPs proporcionada por esta solução conservadora. No presente estudo, todas as bolsas utilizadas foram produzidas com um mesmo material (polímeros de cloridrato de polivinil com TEHTM (tri(2-etil-hexil)trimelitato) como plastificante) e CPDA (citrato, tampão fosfato, dextrose e adenina) como anticoagulante e conservante.

Foram descritos outros fatores associados ao acúmulo de citocinas pró-inflamatórias, mas o mais importante é a contaminação de leucócitos, principalmente células mononucleares, associado ao tempo de armazenamento (HEDDLE et al., 1996; WADHWA et al., 2000).

O presente trabalho mostra que os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF estavam correlacionados diretamente com o tempo de armazenamento dos CPs, porém não foi observada correlação com a contaminação leucocitária, provavelmente porque nossas amostras foram muito homogêneas no que se refere à contaminação por leucócitos ou por diferenças nos métodos de avaliação da contaminação leucocitária utilizados em outros trabalhos; em nosso trabalho utilizamos o conteúdo total de leucócitos por bolsa de CP e não a concentração, como a maioria dos estudos.

Nos CP-PRP, também foi demonstrada correlação direta entre os níveis acumulados de IL-1 $\beta$  e os dias de armazenamento (dias 3, 5 ou 7), mostrando evidente elevação progressiva dos níveis de citocinas. Quando analisamos o acúmulo de TNF, esta correlação só estava presente entre os dias 3 e 5 e sem diferenças significativas entre os dias 5 e 7. Este achado pode estar associado à existência de um platô na capacidade de liberação e/ou produção de TNF pelos leucócitos contaminantes.

Observamos também correlação inversa entre os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF acumulados e o conteúdo de plaquetas nas bolsas. Este achado nunca havia sido descrito, mas podemos especular que altas concentrações de plaquetas produzem um ambiente mais adequado para os leucócitos e/ou previnem a adesão das células mononucleares na superfície plástica, minimizando o estímulo imune, e conseqüentemente, a produção de mediadores imunes biologicamente ativos, principalmente as citocinas. Outra possibilidade seria a remoção da IL-1 $\beta$  e do TNF do plasma dos CPs, pelas plaquetas. Estas hipóteses devem ser objeto de outros estudos a fim de comprovar e elucidar este achado.

Neste estudo não foi observado acúmulo de IL-1 $\alpha$  e IL-1RA durante o armazenamento dos CPs, provavelmente porque existe uma baixa liberação ou produção destas citocinas nos CPs. Por outro lado, MUYLLE et al. (1993) encontraram um pequeno acúmulo de IL-1 $\alpha$  em seu experimento; essa diferença de resultados provavelmente está associada a níveis diferentes de contaminação leucocitária dos CPs utilizados nos estudos ou a reagentes e/ou métodos distintos para dosagens da citocinas. Porém, em nosso estudo e no de MUYLLE et al (1993), detectamos um evidente aumento de IL-1 $\beta$  e TNF. Até onde temos conhecimento, este é o primeiro estudo que monitora os níveis de IL-1RA em CPs durante o armazenamento.

Nas unidades de CPs obtidas por aférese (CP-AF) não detectamos acúmulo de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA e TNF. Este resultado deve estar relacionado aos baixos níveis de contaminação leucocitária, sempre inferiores a 10<sup>7</sup> por bolsa em todas as unidades de CP-AF, ou à baixa sensibilidade do método utilizado (enzima imuno-ensaio – EIA). AYE et al. (1995) demonstraram que o acúmulo das citocinas como: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF é prevenido pelo leucorredução utilizando filtros de terceira geração e que o limite de contaminação leucocitária para obter este efeito está próximo de 10<sup>7</sup> por unidade, limite este atingido por todas as unidades de CP-AF de nosso estudo.

Os dois polimorfismos do gene *IL1B*: -511C/T e +3953C/T localizados na região promotora e no exon 5, respectivamente, são provavelmente responsáveis por variações na expressão do gene e na produção da proteína. Os alelos menos comuns (-511T e +3953T) estão relacionados com fenótipos de alta capacidade secretora (DANIS et al, 1995; HURME et al., 1998; SANTILLA et al. 1998). Na região do intron 2 do gene *IL1RN* existe um número variável de repetições de um segmento de 89bp; o segundo padrão mais freqüente com 2 repetições (*IL1RN*\*2) é associado à ocorrência e gravidade de várias doenças e existem evidências que sugerem que o aumento da produção de IL-1 $\beta$  e/ou sIL-1RA (forma secretora) e a diminuição da produção de icIL-1RA (forma intracelular) estariam associados com este polimorfismos (AREND, 2002). Em nosso estudo, detectamos associação entre o alelo *IL1B*-511T e níveis mais elevados de IL-1 $\beta$  acumulados nos CP-PRP durante o armazenamento, principalmente no dia 7, sendo este acúmulo mais importante nos CPs de doadores homocigotos (*IL1B*-511TT). Este achado demonstra que o polimorfismo do gene *IL1B* é um fator

associado a acúmulo de IL-1 $\beta$  nos CPs durante o armazenamento. Esta conclusão é corroborada por outros estudos, realizados por diferentes autores, utilizando modelos *in vitro*, onde a expressão do gene está aumentada frente a estímulos na presença do alelo *IL1B*-511T (DANIS et al., 1995; HURME et al., 1998).

Em conclusão, nós não encontramos nenhuma associação entre os polimorfismos *IL1B*+3953C/T, *IL1RN* intron 2 e *TNF*-308G/A e o acúmulo das respectivas citocinas inflamatórias durante o período de armazenamento dos CPs. Por outro lado, foi encontrado uma associação do alelo *IL1B*-511T (alelo 2) e níveis elevados de IL-1 $\beta$  nos dias 5 e 7 de armazenamento, principalmente nos CPs de doadores homozigotos (*IL1B*-511TT). Estes resultados sugerem que os polimorfismos dos genes podem influenciar nos níveis de mediadores imunes biológicos (citocinas) acumuladas durante o armazenamento de componentes celulares. Deste modo, é interessante o estudo das associações de polimorfismos ou de variações genéticas do controle da expressão gênica de outros mediadores imunes como IL-6, IL-8, RANTES, Fator Plaquetário 4 (PF4),  $\beta$ -Tromboglobulina ( $\beta$ -TG) e TGF- $\beta$ 1, com os níveis de acúmulo durante a produção e armazenamento de hemocomponentes, principalmente porque a liberação e acúmulo de alguns destes medidores não é prevenida pela desleucocitação pré-armazenamento.

### ***Ocorrência de RFNH e polimorfismo gênico***

A ocorrência de reações transfusionais está associada com o tipo e características do hemocomponente transfundido e com características individuais dos pacientes receptores. Mesmo a RFNH sendo uma reação autolimitada e que não coloca em risco a vida dos pacientes, a conduta frente à sua ocorrência desencadeia investigação que resulta em prejuízo para os pacientes e elevação dos gastos institucionais, além de causar mal-estar relevante ao receptor e freqüentemente retardo no início de outras transfusões. A leucorredução universal reduz a ocorrência destas reações, porém em países em desenvolvimento o custo pode suplantiar os benefícios propiciados (IBOJIE *et al*, 2002, YAZER et al., 2004).

Na prática clínica, observamos também que alguns pacientes apresentam RFNH precoce, mesmo com número reduzido de transfusão e sem antecedentes que propiciem

este comportamento como gestações anteriores, sepsis, utilização de medicações que provocam reações, etc. Desta forma, hipotetizamos que características genéticas individuais relacionadas com a expressão de genes de citocinas pró- ou poderiam influenciar a ocorrência de RFNH.

No presente estudo, avaliamos polimorfismos bialélicos de troca de nucleotídeo único (SNPs) nas posições *IL1B*-511C/T e +3953C/T, *IL6*-174G/C, *IL10*-1082G/A e -819C/T, *TNF*-308G/A e *LTA*+252G/A, além do polimorfismo *IL1RN* intron 2 VNTR. Todos estes polimorfismos, como descrito anteriormente, estão localizados próximos a regiões reguladoras ou codificadoras do gene e têm um potencial modulador na produção das respectivas citocinas.

IL-1 é uma importante citocina pró-inflamatória envolvida em grande número de processos fisiológicos e contribui para várias situações inflamatórias patológicas. O balanço entre a IL-1 e seus antagonistas, principalmente o IL-1RA, pode estar relacionado com estas alterações imune que desencadeariam situações patológicas, como as doenças auto-imunes ou respostas graves a infecções sistêmicas (TARLOW et al., 1993; DANIS et al., 1995; HURME & SANTILLA, 1998; SANTILLA et al., 1998). Nossos resultados indicam que o polimorfismo *IL1RN* intron 2 VNTR está associado com susceptibilidade à ocorrência precoce de RFNH em pacientes multitransfundidos. O genótipo *IL1RN*\*2.2 (homozigoto para o alelo 2), associado à alta produção de IL-1RA e à elevada expressão do gene *IL1B*, é mais freqüente no grupo de pacientes multitransfundidos que apresentam RFNH precoce.

Estes achados permitem-nos especular que o *status* pró-inflamatório associado com a ocorrência de RFNH precoce pode ser resultado de um desequilíbrio do controle na interação IL-1 e seu antagonista (IL-1RA) ou um comprometimento nos mecanismos de retroalimentação desencadeado pelo polimorfismo do gene *IL1RN* (*IL1RN*\*2.2), podendo este estar então relacionado com a mais fácil ocorrência de RFNH frente a estímulos comparativamente menores. Outros polimorfismos de genes de citocinas, associadas à resposta inflamatória inata como IL-6, TNF e LTA, não apresentaram relação com a ocorrência da RFNH precoce, porém sabe-se que o principal pirógeno endógeno, relacionado com a ocorrência de febre é a IL-1 (STACK & BERKOWICZ, 1997).



Além disso, os monócitos funcionam como células apresentadoras de antígenos (CAP) e são inibidos pela IL-10 que funciona como uma inibidora dos mecanismos de produção de alo-anticorpos específicos (MOORE et al., 2001). Diante deste efeito fisiológico da IL-10 e da associação de anticorpos específicos contra antígenos leucocitários (sistema HLA e/ou HNA), propusemos a avaliação dos polimorfismos do gene *IL10* (*IL10*-1082G/A e -819C/T) descritos como influentes na expressão do gene e na produção de IL-10. Sabe-se que os alelos *IL10*-1082G/A mostram diferentes efeitos na transcrição do gene em modelos *in vitro*, na ligação do DNA com fatores de transcrição e na regulação da tradução do RNAm (TURNER et al. 1997). Os alelos *IL10*-1082A e -819T estão associados com fenótipos de baixa produção e mais frequentemente relacionados com doenças auto-imunes e respostas aumentadas frente a estímulos desencadeantes de alo-anticorpos. Portanto, a justificativa do estudo destes polimorfismos e sua associação com a ocorrência de RFNH precoce relaciona-se com a possível utilização destes polimorfismos para a identificação de pacientes de risco para a resposta de aloimunização associada a exposição a antígenos leucocitários presentes nos leucócitos contaminantes dos concentrados de hemácias - surgimento de anticorpos anti-HLA e/ou -HNA – e, portanto a ocorrência de RFNH precocemente, desencadeada através do mecanismo clássico proposto. No presente estudo não encontramos tal relação, porém não foi realizada a pesquisa destes anticorpos no soro dos pacientes multitransfundidos, investigação esta importante para uma conclusão definitiva.

Portanto, diante dos achados da relação dos polimorfismos *IL1B*-511C/T com o acúmulo de IL-1 $\beta$  em CPs e do *IL1RN* intron 2 VNTR com a ocorrência precoce de RFNH em pacientes multitransfundidos, podemos ressaltar a relevância do controle genético da expressão de genes codificantes de mediadores biologicamente ativos, como as citocinas, na ocorrência de reações transfusionais. Deste modo, abre-se a perspectiva de uma nova linha de investigação que tentaria esclarecer as diferenças individuais envolvidos na gravidade e ocorrência de efeitos adversos relacionados à transfusão.



## ***CONCLUSÕES***

---



1. A população estudada da região sudeste do estado de São Paulo (região de Campinas), com relação às frequências genótípicas dos polimorfismos *IL1B*-511C/T, *IL1B*+3953C/T, *IL1RN* intron 2 VNTR, *TNF*-308G/A e *LTA*+252G/A, apresenta um comportamento semelhante às populações europeias e diferente das descendentes de asiáticos e africanos;
2. Existe associação do polimorfismo *IL1B*-511C/T com a intensidade de acúmulo de IL-1 $\beta$  nos concentrados de plaquetas obtidos de plasma rico em plaquetas (CP-PRP) durante o armazenamento;
3. Existe correlação inversa entre a quantidade de plaquetas nas bolsas e o acúmulo de IL-1 $\beta$  e TNF durante o armazenamento;
4. Existe correlação entre o polimorfismo *IL1RN* intron 2 e a ocorrência de reação febril não hemolítica precoce (RFNHP) em pacientes multitransfundidos;
5. Finalmente, o estudo de características genéticas dos doadores de sangue e pacientes pode ajudar a esclarecer as variações de ocorrência e gravidade dos efeitos adversos associados à transfusão de sangue e delinea uma nova linha de investigação.



## ***REFERÊNCIAS***

---





1. ABRAHAM, L.J. & KROEGER, K.M. Impact of the –308 TNF promoter polymorphisms on the transcription regulation of the TNF gene: relevance to disease. **J Leukoc Biol**, 66:562-6, 1999.
2. ALBUQUERQUE, R.V.; HAYDEN, C.M.; PALMER, L.J.; LAING, I.A.; RYE, P.J.; GIBSON, N.A. et al. Association of polymorphism within the tumour necrosis factor (TNF) genes and childhood asthma. **Clin Exp Allergy**, 28:578-84, 1998.
3. AREND, W.P. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. **Cytokine Growth Factor Rev**, 13:323-40, 2002.
4. ARNALICH, F.; LÓPEZ-MADERUELO, D.; CODOCEO, R.; LOPEZ, J.; SOLIS-GARRIDO, M.; CAPISCOL, C. et al. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and mortality in patients with severe sepsis. **Clin Exp Immunol**, 127:331-6, 2002.
5. AYE, M.T.; PALMER, D.S.; GIULIVI, A.; HASHEMI, S. Effect of filtration of platelet concentrates on the accumulation of cytokines and platelet release factors during storage. **Transfusion**, 35:117-24, 1995.
6. BENSEN, J.T.; LANGEFELD, C.D.; HAWKINS, G.A.; GREEN, L.E.; MYCHALECKYI, J.C.; BREWER, C.S. et al. Nucleotide variation, haplotypes structure, and association with end-stage renal disease of the human interleukin-1 gene cluster. **Genomics**, 82:194-217, 2003.
7. BIOQUE, G.; CRUISIUS, J.B.A.; KOUTROUBAKIS, I.; BOUMA, G.; KOSTENSE, P.J.; MEUWISSEN, S.G.M. et al. Allelic polymorphism in IL-1 $\beta$  and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) genes in inflammatory bowel disease. **Clin Exp Immunol**, 102:379-83, 1995.
8. BLAKEMORE, A.I.; TARLOW, J.K.; CORK, M.J.; GORDON, C.; EMERY, P.; DUFF, G.W. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism as a disease severity factor in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, 37:1380-5, 1994.
9. BORISH, L. IL-10: Evolving concepts. **J Allergy Clin Immunol**, 101: 293-7, 1998.
10. CAPON, S.M.; GOLDFINGER, D. Acute hemolytic transfusion reaction, a paradigm of the systemic inflammatory response: new insights into pathophysiology and treatment. **Transfusion**, 35:513-20, 1995.

11. CAVET, J.; DICKINSON, A.M.; NORDEN, J.; TAYLOR, P.R.A.; JACKSON, G.H.; MIDDLETON, P.G. Interferon- $\gamma$  and Interleukin-6 gene polymorphisms associate with graft-versus-host disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation. **Blood**, 98:1594-600, 2001.
12. COZEN W.; GILL, P.S.; INGLES, S.A.; MASOOD, R.; MARTINEZ-MAZA, O.; COCKBURN, M.G. et al. IL-6 levels and genotype are associated with risk of young adult Hodgkin lymphoma. **Blood**, 103:3216-21, 2004.
13. CRAWLEY, E.; KAY, R.; SILLIBOURNE, J.; PATEL, P.; HUTCHINSON, I.; WOO, P. Polymorphic haplotypes of the Interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, 42:1101-8, 1999.
14. DAHER, S.; SHULZHENKO, N.; MORGUN, A.; MATTAR, R.; RAMPIN, G.F.; CAMANO, L. et al. Associations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. **J Reprod Immunol**, 58:69-77, 2003.
15. DANIS, V.A.; MILLINGTON, M.; HYLAND, V.J.; GRENNAN, D. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. **Clin Exp Immunol**, 99:303-10, 1995.
16. DAVENPORT, D.R.; BURDICK, M.; MOORE, A.S.; KUNKEL, S.L. Cytokine production in IgG-mediated red cell incompatibility. **Transfusion**, 33:19-24, 1993.
17. DAVENPORT, D.R.; BURDICK, M.; MOORE, A.S.; KUNKEL, S.L. In vitro production of interleukin-1 receptor antagonist in IgG mediated red cell incompatibility. **Transfusion**, 34:297-303, 1994.
18. DAVENPORT, D.R. The role of cytokines in hemolytic transfusion reactions. **Immunol Invest**, 24:319-31; 1995.
19. DEMETER, J.; PORZSOLT, F.; RÄMISCH, S.; SCHIMIDT, D.; SCHMID, M.; MESSER, G. Polymorphism of the tumour necrosis factor-alpha and lymphotoxin-alpha genes in chronic lymphocytic leukaemia. **Brit J Haematol**, 97:107-12, 1997.

20. di GIOVINE, F.S.; TAKHSH, E.; BLAKEMORE, A.I.F.; DUFF, G.W. Single base polymorphisms at -511 in the human interleukin-1 $\beta$  gene (IL-1 $\beta$ ). **Hum Mol Genet**, 1:450, 1992.
21. DINARELLO, C.A. & WOLFF, S.M. The role of Interleukin-1 in disease. **N Engl J Med**, 328:106-13, 1993.
22. DINARELLO, C.A. Biologic basis for Interleukin-1 in disease. **Blood**, 87:2095-147, 1996.
23. DINARELLO, C.A. Interleukin-1. **Cytokine Growth Factor Rev**, 8:253-65, 1997.
24. DINARELLO, C.A. Cytokines as endogenous pyrogens. **J Infec Dis**, 179: S294-304, 1999.
25. EDWARDS-SMITH, C.J.; JONSSON, J.R.; PURDIE, D.M.; BANSAL, A.; SHORTHOUSE, C.; POWELL, E.E. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. **Hepatology**, 30:526-30, 1999.
26. EL-OMAR, E.M.; CARRINGTON, M.; CHOW, W-H.; MCCOLL, K.E.L.; BREM, J.H., YOUNG, H.A. et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increases risk of gastric cancer. **Nature**, 404:398-402, 2000.
27. EL KATTAN, I.; ANDERSON, J.; YUN, J.K.; COLTON, E.; YOMTOVIAN, R. Correlation of cytokine elaboration with mononuclear cell adhesion to platelet storage bag plastic polymers: a pilot study. **Clin Diag Lab Immunol**, 6:509-13, 1999.
28. FISHMAN, D.; FALDS, G.; JEFFERY, R.; MOHAMED-ALI, 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.
29. FITZGIBBON, J.; GRENZELIAS, D.; MATTHEWS, J.; LISTER, T.A.; GUPTA, R.K. Tumour necrosis factor polymorphisms and susceptibility of follicular lymphoma. **Brit J Haematol**, 107:388-391, 1999.
30. FLACH, R.; MAJETSCHAK, M.; HEUKAMP, T.; JENNISSEN, V.; FLOHÉ, S.; BÖRGERMANN, J. et al. Relation of ex vivo stimulated blood cytokine synthesis to post-traumatic sepsis. **Cytokine**, 11:173-8, 1999.

31. FOSTER, B.C.; LEHRNBECHER, T.; SAMUELS, S.; STEIN, S.; MOL, F.; METCALF, J.A. et al. An IL6 promoter polymorphism is associated with a lifetime risk of development of Kaposi sarcoma in men infected with human immunodeficiency virus. **Blood**, 96:2562-7, 2000.
32. GALLAGHER, P.M.; LOWE, G.; FITZGERALD, T.; BELLA, A.; GREENE, C.M.; MCELVANEY, N.G. et al. Association of IL-10 polymorphism with severity of illness in community acquired pneumonia. **Thorax**, 58:154-6, 2003.
33. GARCIA-GONZALEZ, M.A.; LANAS, A.; SANTOLARIA, S.; CRUSIUS, J.B.A.; SERRANO, M.T., PENA, A.S. The polymorphic *IL-1B* and *IL-1RN* genes in the aetiopathogenesis of peptic ulcer. **Clin Exp Immunol**, 125:368-75, 2001.
34. HAANPÄÄ, M.; NURMIKKO, T.; HURME, M. Polymorphism of the IL-10 gene is associated with susceptibility to Herpes Zoster. **Scand J infect Dis**, 34:112-4, 2002.
35. HAJEER, A.H.; HUTCHINSON, I.V. Influence of TNF $\alpha$  gene polymorphisms on TNF $\alpha$  production and disease. **Hum Immunol**, 62:1191-9, 2001.
36. HEDDLE, N.M.; KELTON JG. Febrile nonhemolytic transfusion reactions. In: POPOVSKY, M.A. **Transfusion Reactions**. Bethesda, Maryland: AABB Press, 1996. p. 83-123.
37. HEDDLE, N.M.; BLAJCHMAN, M.A.; MEYER, R.M.; LIPTON, J.H.; WALKER, I.R.; SHER, G.D. et al. A randomized controlled trial comparing the frequency of acute reactions to plasma-removed platelets and prestorage WBC-reduced platelets. **Transfusion**, 42:556-66, 2002.
38. HUANG, D.; ZHENG, C.; GISCOMBE, R.; MATELL, G.; PIRSKANEN, R.; LEFVERT, A.K. Polymorphisms at -174 and 3' flanking region of interleukin-6 (IL-6) gene in patients with myasthenia gravis. **J Neuroimmunol**, 101:197-200, 1999.
39. HURME, M.; SANTTILA, S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are coordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1 $\beta$  genes. **Eur J Immunol**, 28:2598-602, 1998.

40. IACOPETTA, B.; GRIEU, F.; JOSEPH, D. The -174 G/C gene polymorphism in Interleukin-6 is associated with an aggressive breast cancer phenotype. **Br J Cancer**, 90:419-22, 2004.
41. JUSZCZYNSKI, P.; KALINKA, E.; BEINVENU, J.; WOSZCZEK, G.; BOROWIEC, M.; ROBAK, T. et al. Human leukocyte antigens class II and tumor necrosis factor genetic polymorphisms are independent predictors of non-Hodgkin lymphoma outcome. **Blood**, 100:3037-40, 2002.
42. KUBASZEK, A.; PIHLAJAMÄKI, J.; KOMAROVSKI, V.; LINDI, V.; LINDSTRÖM, J.; ERIKSSON, J. et al. Promoter polymorphisms of the TNF- $\alpha$  (G-308A) and IL-6 (C-174G) genes predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes. **Diabetes**, 52:1872-6, 2003.
43. KUBE, D.; PLATZER, C.; VON KNETHEN, A.; STRAUB, H.; BOHLEN, H.; HAFNER, M. et al. Isolation of the human Interleukin 10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines. **Cytokine**, 7:1-7, 1995.
44. LAZARUS, M.; HAJEER, A.H.; TURNER, D.; SINNOTT, P.; WORTHINGTON, J.; OLLIER, W.E.R. et al. Genetic variation in the Interleukin 10 gene promoter and Systemic Lupus Erytematosus. **J Rheumatol**, 24:2314-7, 1997.
45. LECH-MARANDA, E.; BASEGGIO, L.; BIENVENU, J.; CHARLOT, C.; BERGER, F.; RIGAL, D. et al. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms influence the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphoma. **Blood**, 103:3529-34, 2004.
46. LOUIS, E.; FRANCHIMONT, D.; PIRON, A.; GEVAERT, Y.; SCHAAF-LAFONTAINE, N.; ROLAND, S. et al. Tumour necrosis factors (TNF) gene polymorphism influences TNF- $\alpha$  production in lipopolyaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. **Clin Exp Immunol**, 133:401-6, 1998.
47. LUHESHI G.; ROTHWELL N. Cytokines and fever. **Int Arch Allergy Immunol**, 109:301-7, 1996.
48. MA, P.; CHEN, D.; PAN, J.; DU, B. Genomic polymorphism within interleukin-1 family cytokines influences the outcome of septic patients. **Crit Care Med**, 30:1046-50, 2002.

49. MAKHATADZE, N.J. Tumour necrosis factor locus: genetic organization and biological implications. **Hum Immunol**, 59:571-9, 1998.
50. MARSHALL, 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**, 71:469-76, 2001.
51. MEENAGH, A.; WILLIAMS, F.; ROSS, O.A.; PATTERSON, C.; GORODEZKY, C.; HAMMOND, M. et al. Frequency of cytokine polymorphisms in populations from Western Europe, Africa, Asia, the middle East and South America. **Hum Immunol**, 63:1055-61, 2002.
52. MESSER, G.; SPENGLER, U.; JUNG, M.C.; HONOLD, G.; BLÖMER, K.; PAPE, G.R. et al. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: a NcoI polymorphism in the first intron of human TNF- $\beta$  gene correlates with a variant amino acid in position 26 and reduced level of TNF- $\beta$  production. **J Exp Med**, 173:209-19, 1991.
53. MEYER, C.G.; MAY, J.; LUTY, A.J.; LELL, B.; KREMSNER, P.G. TNF $\alpha$  -308A associated with shorter intervals of *Plasmodium falciparum* reinfections. **Tissue Antigens**, 59:287-92, 2002.
54. MIYAZOE, S.; HAMASAKI, K.; NAKATA, K.; KAJIYA, Y.; KITAJIMA, K.; NAKAO, K. et al. Influence of Interleukin-10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically infected with hepatitis B virus. **Am J Gastroenterol**, 97:2086-92, 2002.
55. MOORE, K.W.; MALEFYT, R.W.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**, 19:683-765, 2001.
56. MUYLLE, L.; JOOS, M.; WOUTERS, E.; DE BOCK, R.; PEETERMANS, M.E. Increased tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin 1, and Interleukin 6 (IL-6) levels in the plasma of stored platelet concentrates: relationship between TNF- $\alpha$  and IL-6 levels and febrile transfusion reactions. **Transfusion**, 33:195-9, 1993.

57. NIETERS, A.; BREMS, S.; BECKER, N. Cross-sectional study on cytokine polymorphisms, cytokine production after T-cell stimulation and clinical parameters in a random sample of a German population. **Hum Genet**, 108:241-8, 2001.
58. OLOMOLAIYE, O.; WOOD, N.A.P.; BIDWELL, J.L. A novel *N/aiII* polymorphism in the human IL-6 promoter. **Eur J Immunogenet**, 25:267, 1998.
59. OPELZ, G.; VANRENTERGHEM, Y.; KIRSTE, G. GRAY, D.W.; HORSBURGH, T.; LACHANCE, J.G. et al. Prospective evaluation of pretransplant blood transfusion in cadaver kidney recipients. **Transplantation**, 63:964-7, 1997.
60. PANDEY, J.P.; TAKEUCHI, F. TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  gene polymorphisms in systemic sclerosis. **Hum Immunol**, 60:1128-30, 1999.
61. PANDEY, J.P.; FREDERICK, M.; ACCESS RESEARCH GROUP. TNF-alpha, IL1-beta, and immunoglobulin (GM and KM) gene polymorphisms in sarcoidosis. **Hum Immunol**, 63:485-491, 2002.
62. PARKS, C.G.; PANDEY, J.P.; DOOLEY, M.A.; TREADWELL E.L.; ST. CLAIR, E.W.; GILKESON, G.S. et al. Genetic polymorphisms in Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$  and TNF- $\beta$  in a populations-based study of Systemic lupus Erythematosus: associations and interaction with the Interleukin-1 $\alpha$ -889 C/T polymorphism. **Hum Immunol**, 65:622-31, 2004.
63. POCIOT, F.; MOLVIG, J.; WOGENSEN, L.; WORSAAE, H.; NERUP, J. A *TaqI* polymorphism in the human interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) gene correlates with IL-1 $\beta$  secretion *in vitro*. **Eur J Clin Invest**, 22:396-402, 1992.
64. POLI, F.; NOCCO, A.; BERRA, S.; SCALAMOGNA, M.; TAIOLI, E.; LONGHI, E.; SIRCHIA, G. Allele frequencies of polymorphisms of TNFA, IL-6, IL-10 and IFNG in a Italian Caucasian population. **Eur J Immunogenet**, 29:237-40, 2002.
65. REES, L.E.N.; WOOD, N.A.P.; GILLEPIE, K.M.; LAI, K.N.; GASTON, K.; MATHIESON, P.W. The interleukin-10 -1082G/A polymorphism: allele frequency in different populations and functional significance. **Cell Mol Life Sci**, 59: 560-9, 2002.
66. RIDER, L.G.; ARTLETT, C.M.; FOSTER, C.B.; AHMED, A.; NEEMAN, T.; CHANOCK, S.J. et al. Polymorphisms in the IL-1 receptor antagonist gene VNTR are

- possible risk factors for juvenile idiopathic inflammatory myopathies. **Clin Exp Immunol**, 121:47-52, 2000.
67. SANGER, F. Determination of nucleotide sequences in DNA. **Science**, 214:1205-10, 1981.
68. SANTILLA, S.; SAVINAINEN, K.; HURME, M. Presence of the IL1RA allele 2 (IL1RN\*2) is associated with enhanced IL-1 $\beta$  production in vitro. **Scand J Immunol**, 47:195-8, 1998.
69. SCHINDLER, R.; LONNEMANN, G.; SHALDON, S.; KOCH, K.M.; DINARELLO, C.A. Transcription, not synthesis, of Interleukin-1 and tumor necrosis factor by complement. **Kidney Int**, 37:85-93, 1990.
70. SCITZER, U.; SWIDER, C.; STÜBER, F.; SUCHNICKI, K.; LANGE, A.; RICHTER, E. et al. Tumour necrosis factor alpha promoter gene polymorphism in sarcoidosis. **Cytokine**, 9:787-90, 1997.
71. SEMPLE, J.W.; FREEDMAN, J. Recipient antigen-processing pathways of allogeneic platelet antigens: essential mediators of immunity. **Transfusion**, 42:958-61, 2002.
72. SHIZUO, A.; TETSUYA, T.; TADAMITSU, K. Interleukin-6 in biology and medicine. **Adv Immunol**, 54:1-78, 1993.
73. STACK, G.; BERKOWICZ, D. Cytokine production during blood component storage. In: DAVENPORT, R.D e SNYDER, E.I. (Ed.). **Cytokines in transfusion medicine: a iniciador**. Bethesda, Maryland: AABB Press, 1997. p. 21-59.
74. SUÁREZ, A.; CASTRO, P.; ALONSO, R.; MOZO, L.; GUTIÉRREZ, C. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. **Transplantation**, 75:711-7, 2003.
75. SULLIVAN, K.E.; WOOTEN, C.; SCHMECKPEPER, B.J.; GOLDMAN, D.; PETRI, M.A. A promoter polymorphism of tumor necrosis factor  $\alpha$  associated with systemic lupus erythematosus in african-americans. **Arthritis Rheum**, 40:2207-11, 1997.
76. TAGORE, A.; GONSALKORALE, W.M.; PRAVICA, V.; HAJEER, A.H.; MCMAHON, R.; WHORWELL, P.J. et al. Interleukin-10 (IL-10) genotypes in inflammatory bowel disease. **Tissue Antigens**, 54:386-90, 1999.



77. TARLOW, J.K.; BLAKEMORE, A.F.; LENNARD, A.; SOLARI, R.; HUGHES, H.N.; STEINKASSERER, A. et al. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. **Hum Genet**, 91:403-4, 1993.
78. TERRY, C.F.; LOUKACI, V.; GREEN, F.R. Cooperative influence of genetic polymorphisms on Interleukin 6 transcriptional regulation. **J Biol Chem**, 275:18138-44, 2000.
79. TREVILATTO, P.C.; SCAREL-CAMINAGA, R.M.; DE BRITO, R.B.; DE SOUZA, A.P., LINE, S.R.P. Polymorphisms at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. **J Clin Periodontol**, 30:438-42, 2003.
80. TSENG, L.H.; CHEN, P.J.; LIN, M.T.; SHAU, W.Y.; CHAUNG, S.M.; MARTIN, P.J.; HANSEN, J.A. Single nucleotide polymorphisms in Intron 2 of the human Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene: further definition of the IL-1 $\beta$  and IL-1Ra polymorphisms in North American Caucasians and Taiwanese Chinese. **Tissue Antigens**, 57:318-324, 2001.
81. TURNER, D. M.; WILLINANS, D.M.; SANKARAN, D.; LAZARUS, M.; SINNOTT, P.J.; HUTCHINSON, I.V. An investigation of polymorphisms in the interleukin-10 gene promoter. **Eur J Immunogenet**, 24:1-8, 1997.
82. UBOLDI DE CAPEI, M.U.; DAMETTO, E.; FASANO, M.E.; RENDINE, S.; CURTONI, E.S. Genotyping for cytokine polymorphisms: allele frequencies in the Italian population. **Eur J Immunogenet**, 30:5-10, 2003.
83. VANVAKAS, E. C.; PINEDA A. A. Allergic and anaphylatic reactions. In: POPOVSKY M. A. **Transfusion Reactions**. Bethesda, Maryland: AABB Press, 1996. p. 83-123.
84. VAMVAKAS E.G.; BLAJCHMAN M.A. Deleterious clinical effects of transfusion-associated immunomodulation: fact or fiction? **Blood**, 97:1180-95, 2001.
85. VAMVAKAS EC. WBC-containing allogeneic blood transfusion and mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Transfusion**, 43:963-73, 2003.

86. VAMVAKAS EC. White blood cell-containing allogeneic blood transfusion, postoperative infection and mortality: a meta-analysis of observational 'before-and-after' studies. **Vox Sang**, 86:111-9, 2004.
87. VAMVAKOPOULOS, J.E.; TAYLOR, C.J.; MORRIS-STIFF, G.J.; GREEN, C.; METCALFE, S. The interleukin-1 receptor antagonist gene: a single-copy variant of the intron 2 variable number tandem repeat (VNTR) polymorphism. **Eur J Immunogenet**, 29,337-40, 2002.
88. WADHWA, M.; SEGATCHIAN, M.J.; DILGER, P.; SANDS, D.; KRAILADISIRI, P.; CONTRERAS, M. et al. Cytokines in WBC-reduced apheresis PCs during storage: a comparison of two WBC-reduction methods. **Transfusion**, 40:1118-26, 2000.
89. WARZOCHA, K.; RIBEIRO, P.; BIENVENU, J.; ROY, P.; CHARLOT, C.; RIGAL, D.; COIFFIER B, SALLES G. Genetic polymorphism in the tumor necrosis factor locus influence non-Hodgkin's lymphoma outcome. **Blood**, 91, 3574-3581, 1998.
90. WESTENDORP, R.G.J.; LANGERMANS, J.A.M.; HUIZINGA, T.W.J.; ELOUALI, A.H.; VERWEIJ, C.L.; BOOMSMA, D.I. et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. **Lancet**, 349:170-3, 1997.
91. WILSON, A.G.; DI GIOVINE, F.S.; BLAKEMORE, A.I.; DUFF, G.W. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by *NcoI* restriction of PCR product. **Hum Mol Genet**, 1:353, 1992.
92. WILSON, A.G.; SYMONS, J.A.; MCDOWELL, T.L.; MCDEVITT, H.O.; DUFF, G.W. Effects of polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. **Proc Natl Sci U S A**, 94:3195-3199, 1997.
93. WOOD, E.M.; COLTON, E.; YOMTOVIAN, R.A.; CURRIE, L.M.; CONNOR, J.; ANDERSON, J.M. Prevention of monocyte adhesion and inflammatory cytokine production during blood platelet storage: an in vitro model with implications for transfusion practice. **J Biomed Mater Res**, 51:147-54, 2000.
94. YAZER, M.H.; PODLOSKY, L.; CLARKE, G.; NAHIRNIAK, S.M. The effect of prestorage WBC reduction on the rates of febrile nonhemolytic transfusion reactions to platelet concentrates and RBC. **Transfusion**, 44:10-5, 2004.

95. ZHENG, C.; HUANG, D.; BERGENBRANT, S.; SUNDBLAD, A.; ÖSTERBORG, A.; BJÖRKHOLM, M. et al. Interleukin 6, tumour necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 1 $\beta$  and interleukin 1 receptor antagonist promoter or coding gene polymorphisms in multiple myeloma. **Br J Haematol**, 109:39-45, 2000.



***ANEXOS***

---



**Anexo I. Seqüência de iniciadores utilizados no presente estudo.**

<b>GENE</b>	<b>ENZINA MÉTODO</b>	<b>SEQUÊNCIA DOS INICIADORES</b>							
<b><i>IL1B</i> -511 C/T</b>	Aval	5' -TGG	CAT	TGA	TCT	GGT	TCA	TC-3'	
		5' -GTT	TAG	GAA	TCT	TCC	CAC	TT-3'	
<b><i>IL1B</i> +3953C/T</b>	TaqI	5'-GTT	GTC	ATC	AGA	CTT	TGA	CC-3'	
		5'-TTC	AGT	TCA	TAT	GGA	CCA	GA-3'	
<b><i>IL1RN</i> intron 2</b>	VNTR	5'-CTC	AGC	AAC	ACT	CCT	AT-3'		
		5'-TCC	TGG	TCT	GCA	GGT	AA-3'		
<b><i>IL6</i> -174G/C</b>	NlaIII	5'-ACT	TCG	TGC	ATG	ACT	TCA	G-3'	
		5'-TTC	ATA	GCT	GGG	CTC	CTG-3		
<b><i>TNF</i> -308</b>	NcoI	5'-AGG	CAA	TAG	GTT	TTG	AGG	GCC	AT-3'
		5'-TCC	TCC	CTG	CTC	CGA	TTC	CG-3'	
<b><i>LTA</i> +252</b>	NcoI	5'-TTC	GTG	CTT	TGG	ACT	ACC-3'		
		5'-AGA	GAG	AGA	CAG	TGA	GCG-3'		
<b><i>IL10</i> -1082G/A</b>	Seqüenciamento	5'-GGT	AGA	GCA	ACA	CTC	CTC	G-3'	
		5'-CCT	CCT	ACT	GTA	CAC	CAT	CTC	CAG-3'
<b><i>IL10</i> -819T/C</b>	Seqüenciamento	5'-ACT	TTA	GAC	TCC	AGC	CAC	AG-3'	
		5'-TCA	GGC	ACA	TGT	TTC	CAC-3'		
<b><i>IL1RN</i></b>	RT-PCR	5'-TAA	CAT	CAC	TGA	CCT	GAG	CGA	GA-3'
		5'-CCA	TCG	CTG	TGC	AGA	GGA	A-3'	
<b><i>β-actina</i></b>	RT-PCR	5'-AAG	AGA	TGG	CCA	CGG	CTG	CT-3'	
		5'-TCG	CTC	CAA	CCG	ACT	GCT	GT-3'	

**Anexo II.** Tabela de Doadores – GRUPO CONTROLE: Sexo (M-masculino, F-feminino), Idade (anos), informações raciais (C-caucasiano, N-negro ou mulato) e polimorfismos (*IL1B*-511C/T, *IL1B*+3953C/T, *IL1RN* Intron2, *TNF*-308G/A, *LTA*+252G/A e *IL6*-174 G/C).

	Nº Doador	Iniciais	Sexo	Idade	Raça	<i>IL1B</i> -511C/T	<i>IL1B</i> +3953C/T	<i>IL1RN</i> (Intron2)	<i>TNF</i> -308G/A	<i>LTA</i> +252G/A	<i>IL6</i> -174 G/C
DA 01	277967	TLS	M	22	C	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	NR
DA 02	91222	FPRB	M	29	C	1.1	1.2	1.2	1.1	2.2	NR
DA 03	93850	RAS	M	40	C	1.1	2.2	2.2	1.1	2.2	NR
DA 04	206168	WMF	M	58	C	1.1	1.1	1.1	1.2	1.2	NR
DA 05	238714	JLF	M	29	C	2.2	1.1	2.2	1.2	2.2	NR
DA 06	231183	KMMS	F	29	C	1.1	1.1	1.1	1.1	1.2	NR
DA 07	305042	JDP	M	26	C	1.1	1.2	1.1	1.1	2.2	NR
DA 08	18170	JFS	M	38	C	1.2	1.2	2.2	1.1	2.2	NR
DA 09	291413	JMO	F	35	N	2.2	1.1	1.1	1.1	2.2	NR
DA 10	290010	JAB	M	32	C	1.1	1.1	1.1	1.1	2.2	NR
DA 11	183437	IFO	F	34	C	1.1	1.1	1.1	1.2	2.2	NR
DA 12	57576	ETCF	M	34	C	1.1	1.2	1.1	1.2	1.2	NR
DA 13	127286	MIL	F	46	C	1.2	1.1	1.1	1.1	1.1	NR
DA 14	11743	JIDN	M	38	N	1.2	1.1	1.1	1.1	1.2	NR
DA 15	16006	ERS	M	50	N	1.2	1.2	1.1	1.2	1.2	NR
DA 16	181197	CR	F	53	C	1.1	1.1	1.1	1.1	2.2	NR
DA 17	222490	NJPG	M	34	C	2.2	1.2	1.1	1.2	1.2	NR
DA 18	219462	DBM	F	48	C	1.1	1.2	1.1	1.1	2.2	NR
DA 19	13880	JAFS	M	47	C	2.2	1.2	1.1	1.1	2.2	NR
DA 20	42377	SJF	M	35	N	1.2	1.1	2.2	1.2	2.2	NR



	<b>N° Doador</b>	<b>Iniciais</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Raça</b>	<b>IL1B -511C/T</b>	<b>IL1B +3953C/T</b>	<b>IL1RN (Intron2)</b>	<b>TNF -308G/A</b>	<b>LTA +252G/A</b>	<b>IL6 -174 G/C</b>
<b>DA 21</b>	248654	JMMT	M	25	C	1.1	1.2	1.2	1.2	1.2	<b>NR</b>
<b>DA 22</b>	28346	LRB	M	57	C	1.2	1.1	1.1	1.2	2.2	NR
<b>DA 23</b>	129255	MARC	<b>F</b>	60	C	1.1	1.1	1.1	1.2	1.1	NR
<b>DA 24</b>	216008	MAS	M	29	C	1.1	1.2	1.1	1.2	2.2	NR
<b>DA 25</b>	227090	DSP	<b>F</b>	27	<b>N</b>	1.1	1.1	1.1	1.2	2.2	NR
<b>DA 26</b>	18758	DVBF	M	44	C	1.1	2.2	2.2	1.2	2.2	NR
<b>DA 27</b>	88794	PMPO	M	35	C	1.2	1.1	1.3	1.2	2.2	NR
<b>DA 28</b>	227908	VV	M	43	C	1.2	1.1	1.2	1.1	2.2	NR
<b>DA 29</b>	190502	WSMA	M	26	C	1.2	1.1	1.1	2.2	1.2	NR
<b>DA 30</b>	137203	FDAG	<b>F</b>	41	C	1.2	1.1	1.2	1.1	2.2	NR
<b>DA 31</b>	201977	CCC	M	25	C	1.1	1.1	1.2	1.1	2.2	NR
<b>DA 33</b>	145808	JRD	<b>F</b>	29	C	1.1	1.1	1.5	1.1	2.2	NR
<b>DA 34</b>	303481	NGFJ	M	36	C	1.1	1.1	1.1	1.1	2.2	NR
<b>DA 35</b>	111766	MJVS	<b>F</b>	40	C	2.2	1.1	1.2	1.1	2.2	NR
<b>DA 36</b>	172451	SMP	F	40	C	1.1	1.1	1.2	1.2	1.1	NR
<b>DA 37</b>	99316	DRS	M	34	C	1.1	1.1	1.2	1.1	2.2	<b>NR</b>
<b>DA 38</b>	198800	MRC	M	39	C	2.2	1.1	1.2	1.1	1.2	NR
<b>DA 39</b>	269580	LAF	M	55	C	1.2	1.1	2.4	2.2	1.2	NR
<b>DA 40</b>	151212	NAS	<b>F</b>	36	C	1.1	1.1	1.2	1.1	1.2	NR

	<b>N° Doador</b>	<b>Iniciais</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Raça</b>	<b>IL1B -511C/T</b>	<b>IL1B +3953C/T</b>	<b>IL1RN (Intron2)</b>	<b>TNF -308G/A</b>	<b>LTA +252G/A</b>	<b>IL6 -174 G/C</b>
<b>DA 41</b>	<b>53636</b>	ACS	M	50	C	1.1	1.2	1.0	1.1	1.1	NR
<b>DA 42</b>	<b>92677</b>	DOAM	M	48	C	2.2	1.1	1.1	1.1	2.2	NR
<b>DA 43</b>	<b>213364</b>	MLMP	F	56	C	1.1	1.2	1.1	1.1	1.2	NR
<b>DA 44</b>	<b>147252</b>	JMFF	M	37	C	1.2	1.2	2.2	1.1	2.2	NR
<b>DA 45</b>	<b>121618</b>	ERR	M	34	C	1.1	1.1	1.1	1.1	1.2	NR
<b>DA 46</b>	<b>168225</b>	MFS	F	34	C	1.2	1.1	1.2	1.2	1.2	NR
<b>DA 47</b>	<b>295958</b>	MABM	F	57	C	1.2	1.2	1.2	2.2	1.2	NR
<b>DA 48</b>	<b>269009</b>	SAS	M	34	C	1.2	1.2	1.1	1.1	1.2	NR
<b>DA 49</b>	<b>6513</b>	FRM	M	40	N	1.1	1.2	1.1	1.1	1.2	NR
<b>DA 50</b>	<b>304987</b>	WFSJ	M	32	C	2.2	2.2	1.1	1.1	2.2	NR
<b>DA 51</b>	<b>109260</b>	MDG	M	34	C	1.1	1.1	2.2	1.1	2.2	NR
<b>DN 01</b>	<b>337799</b>	EMSM	F	45	N	1.2	1.1	1.1	1.1	1.2	1.1
<b>DN 02</b>	<b>81389</b>	PST	M	45	C	1.2	1.1	1.1	1.2	1.2	1.1
<b>DN 03</b>	<b>265782</b>	MNO	F	35	C	1.1	1.1	1.2	1.1	1.2	1.2
<b>DN 04</b>	<b>164840</b>	SAF	F	26	C	1.2	1.2	1.1	1.1	2.2	1.1
<b>DN 05</b>	<b>202916</b>	AVN	M	43	C	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	2.2
<b>DN 06</b>	<b>294345</b>	ACZ	M	45	C	1.2	1.2	1.1	1.1	1.2	1.2
<b>DN 07</b>	<b>257855</b>	CMRP	F	35	C	1.1	1.1	1.3	1.2	1.2	1.1
<b>DN 08</b>	<b>347363</b>	SOP	F	19	N	1.1	1.2	1.1	1.1	2.2	1.1
<b>DN 09</b>	<b>191385</b>	AA	M	26	C	1.2	1.1	1.2	1.1	2.2	1.1
<b>DN 10</b>	<b>210655</b>	APG	F	25	C	1.1	1.1	1.1	1.2	1.2	1.1

	<b>N° Doador</b>	<b>Iniciais</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Raça</b>	<b>IL1B -511C/T</b>	<b>IL1B +3953C/T</b>	<b>IL1RN (Intron2)</b>	<b>TNF -308G/A</b>	<b>LTA +252G/A</b>	<b>IL6 -174 G/C</b>
<b>DN 11</b>	<b>251479</b>	BO	M	42	C	2.2	1.1	1.2	2.2	NR	1.2
<b>DN 12</b>	<b>316636</b>	PRRC	M	34	C	1.2	1.1	1.2	1.1	NR	1.1
<b>DN 13</b>	<b>316681</b>	LCP	F	23	C	1.1	1.1	1.3	1.1	NR	1.2
<b>DN 14</b>	<b>Externo</b>	MJR	F	37	C	1.1	1.2	1.1	1.1	NR	1.1
<b>DN 15</b>	<b>307701</b>	FR	F	31	C	2.2	2.2	1.1	1.1	NR	1.2
<b>DN 16</b>	<b>290503</b>	AVNN	F	38	C	1.1	1.2	1.1	1.1	NR	1.1
<b>DN 17</b>	<b>312888</b>	MCA	F	29	C	1.1	1.1	1.1	1.1	NR	1.1
<b>DN 18</b>	<b>124370</b>	FRK	M	28	C	1.2	1.1	1.1	2.2	NR	1.1
<b>DN 19</b>	<b>88369</b>	ERG	M	32	C	1.2	1.1	1.2	1.1	NR	1.1
<b>DN 20</b>	<b>188723</b>	HHMDC	F	30	C	1.2	1.1	1.1	1.1	NR	1.1
<b>DN 21</b>	<b>269728</b>	SBP	F	28	C	1.2	1.1	1.2	1.2	NR	1.2
<b>DN 22</b>	<b>334207</b>	HPJ	M	30	C	1.2	1.1	1.2	1.1	NR	1.1
<b>DN 23</b>	<b>299748</b>	RPS	M	20	N	2.2	1.1	1.1	1.2	NR	1.1
<b>DN 24</b>	<b>350930</b>	MPRF	M	21	N	1.1	1.2	1.1	1.2	NR	1.1
<b>DN 25</b>	<b>297594</b>	TSA	F	24	C	2.2	1.2	1.1	1.1	NR	1.1
<b>DN 26</b>	<b>301988</b>	LACC	M	38	C	1.1	2.2	1.2	1.1	NR	1.1
<b>DN 27</b>	<b>299731</b>	AUS	M	50	C	1.1	1.1	1.1	1.1	NR	1.1
<b>DN 28</b>	<b>283914</b>	JFLJ	M	24	C	1.2	1.1	1.1	1.1	NR	1.1
<b>DN 29</b>	<b>364700</b>	MM	M	36	C	1.1	1.1	1.1	1.1	NR	1.1
<b>DN 30</b>	<b>364702</b>	EBS	M	43	C	2.2	1.1	1.2	1.1	NR	1.1

	<b>N° Doador</b>	<b>Iniciais</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Raça</b>	<b>IL1B -511C/T</b>	<b>IL1B +3953C/T</b>	<b>IL1RN (Intron2)</b>	<b>TNF -308G/A</b>	<b>LTA +252G/A</b>	<b>IL-6 -174 G/C</b>
DN 31	134474	SAR	M	34	C	1.2	1.2	1.1	1.1	NR	1.2
DN 32	364688	DDS	M	36	C	1.2	1.2	1.1	1.1	NR	1.1
DN 33	205973	ALR	M	37	C	1.2	2.2	1.2	1.1	NR	1.1
DN 34	365200	CRB	M	23	C	2.2	1.1	1.2	1.1	NR	1.2
DN 35	365202	CMB	M	28	N	2.2	1.1	1.2	1.2	NR	1.1
DN 36	212445	ALL	M	27	C	1.1	1.2	1.1	1.1	NR	1.1
DN 37	171306	MRF	M	27	C	1.2	1.1	1.1	1.1	NR	1.2
DN 38	365206	NSC	M	28	C	1.2	1.1	2.2	2.2	NR	1.2
DN 39	265728	WFV	M	23	C	1.1	1.2	1.2	2.2	NR	1.2
DN 40	313816	JMV	M	35	C	1.1	1.1	1.1	1.1	NR	2.2
DN 41	365771	FSP	F	19	C	2.2	1.1	1.2	1.1	NR	1.1
DN 42	296015	VT	M	38	C	1.2	1.1	1.3	1.1	NR	1.2
DN 43	357049	RAP	F	21	C	1.2	1.2	1.2	1.2	NR	1.1
DN 44	347373	RJO	M	20	C	2.2	1.1	1.1	1.1	NR	1.2
DN 45	345382	RER	M	30	C	2.2	1.2	1.1	1.1	NR	1.2
DN 46	367337	VSC	M	30	C	1.1	1.1	1.1	1.2	NR	2.2
DN 47	367354	MAB	F	27	N	2.2	2.2	1.1	1.1	NR	1.1
DN 48	360203	CS	F	27	C	1.2	1.1	1.1	1.1	NR	1.2
DN49	79205	CS	F	40	C	1.2	1.1	1.2	1.1	NR	1.2
DN50	289792	DABI	F	51	C	1.1	1.1	1.1	1.1	NR	1.1

**Anexo III. Tabela de Pacientes:** Sexo (M-masculino, F-feminino), diagnóstico (ver legenda no final) e polimorfismos (*IL1B*-511C/T, *IL1B*+3953C/T, *IL1RN* Intron2, *TNF*-308G/A, *LTA*+252G/A, *IL6*-174G/C, *IL10*-1082G/A e *IL10*-819C/T).  
NR – não realizado.

	Registro	Iniciais	Sexo	Diagnóstico	<i>IL1B</i> -511C/T	<i>IL1B</i> +3953C/T	<i>IL1RN</i> (Intron2)	<i>TNF</i> -308G/A	<i>LTA</i> +252G/A	<i>IL6</i> +174 G/C	<i>IL10</i> -1082G/A	<i>IL10</i> -819C/T
P 01	5323542	ARL	F	LNH - Imunocitoma	1.2	1.2	2.3	1.1	2.2	1.2	1.2	1.1
P 02	5797515	AGR	M	LMC – CB + TMO	2.2	1.1	1.2	1.1	1.2	1.2	1.2	1.2
P 03	0960268	MLR	M	Talassemia	1.2	1.1	1.2	1.1	2.2	1.2	2.2	1.2
P 04	7198975	Rjc	M	LNH - AG	1.2	1.2	1.1	1.1	2.2	1.2	1.1	1.1
P 05	7414842	ES	M	Ca de Reto	1.2	1.1	1.2	1.2	2.2	1.1	1.2	1.2
P 06	7502596	HC	F	Abscesso hepático	1.1	1.1	1.2	1.1	1.1	1.2	2.2	1.2
P 07	7505821	MLM	F	SMD - AR	2.2	1.2	1.2	1.1	1.2	1.2	2.2	1.1
P 08	6775095	AR	M	Ca de bexiga	1.2	1.2	1.1	1.1	2.2	1.2	1.2	1.1
P 09	5548338	WB	M	Cirrose hepática	1.2	1.2	1.2	1.1	1.2	1.1	2.2	2.2
P 10	7232670	CACP	F	LMA	1.1	1.2	1.3	1.1	2.2	2.2	1.2	1.1
P 11	6857714	RLMM	M	LNH - AG	1.2	1.2	1.1	1.2	1.1	1.1	2.2	1.2
P 12	6920450	MPA	M	LNH + TMO	1.2	1.2	1.2	1.1	1.2	1.1	1.2	1.2
P 13	1651753	JJS	M	Ca gástrico	1.1	2.2	1.1	1.1	1.2	1.1	2.2	1.1
P 14	7534585	VEF	M	LMA	1.2	2.2	1.2	1.1	1.2	1.2	1.2	1.2
P 15	1939024	BAB	M	IRC	1.1	1.2	1.2	1.1	1.2	1.2	2.2	1.1
P 16	7536682	GTB	M	LMA	1.2	1.1	2.2	1.1	2.2	1.1	1.2	1.2
P 17	5473759	LARS	F	Ca de reto	1.2	2.2	1.2	1.1	2.2	1.1	1.2	1.2
P 18	S/Registro	TRFI	F	IRC	1.1	2.2	1.1	1.2	1.2	1.1	1.2	1.1
P 19	2108654	JAS	M	AVC hemorrágico	1.2	2.2	1.1	1.2	1.2	1.1	1.2	1.2
P 20	6758203	JSBF	M	IRC	2.2	2.2	1.2	1.1	1.1	1.1	2.2	1.2

	Registro	Iniciais	Sexo	Diagnóstico	IL-1B -511C/T	IL-1B +3953C/T	IL-1RN (Intron2)	TNF -308G/A	LTA +252G/A	IL-6 +174 G/C	IL-10 -1082G/A	IL-10 -819C/T
P 21	2792140	CRD	M	Anemia falciforme	2.2	2.2	1.2	1.1	1.2	1.1	2.2	1.2
P 22	6182737	JAS	M	AA grave + TMO	1.2	1.1	1.2	1.2	1.1	1.1	1.2	1.1
P 23	6530205	CYF	F	AA grave	1.2	1.1	2.2	1.2	1.2	2.2	1.1	1.1
P 24	2337219	IGF	F	Aplasia pura série vermelha	2.2	1.2	1.1	1.1	1.2	1.1	2.2	2.2
P 25	7606320	LDFB	F	LLA	1.2	1.1	1.2	1.2	1.1	1.1	1.1	1.2
P 26	6644236	OBFG	F	SMD – AR	1.2	1.2	1.2	1.1	1.2	1.2	2.2	2.2
P 27	7472333	NRM	F	LNH – AG	1.2	1.2	1.1	2.2	1.1	1.1	2.2	1.2
P 29	7064263	JFS	F	LNH – AG	1.2	1.2	1.1	1.2	1.2	1.1	1.2	1.2
P 30	7584053	MAM	M	LMA	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	2.2	1.1	1.1
P 31	6635580	CDP	C	Talassemia	1.2	1.2	1.2	2.2	1.2	NR	1.2	1.1
P 32	721045-6	LR	F	LMC + TMO	1.2	1.1	1.2	1.2	1.2	NR	1.2	1.1
P 33	754646-1	MAS	M	AA grave	2.2	1.1	1.2	1.1	2.2	NR	2.2	2.2
P 34	653962-7	NBR	F	Cirrose hepática	1.2	1.1	1.2	1.1	2.2	NR	1.2	1.1
P 36	7694385	ACR	M	AA grave	1.2	1.1	1.1	1.1	2.2	NR	1.2	1.1
P 37	6558239	JAO	M	LNH – AG	2.2	1.1	1.1	1.1	1.2	NR	2.2	1.1
P 38	7457375	TGSF	F	LMA	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	NR	2.2	2.2
P 40	498215-1	GS	M	CH	1.1	1.2	2.2	1.2	1.2	NR	1.1	1.1
P 41	7614589	LB	F	IRC	1.1	1.1	1.1	1.2	1.2	NR	2.2	1.2
P 42	7438440	RAR	M	LMA + TMO	1.2	1.2	2.3	1.1	2.2	NR	2.2	1.2
P 43	6057174	WN	M	LNH - AG + TMO	1.2	1.1	1.1	1.1	2.2	NR	1.1	1.1

Tabela de Pacientes separadamente – SEM RFNH e COM RFNH precoce.

<b>Pacientes SEM RFNH</b>												
	<b>Registro</b>	<b>Iniciais</b>	<b>Sexo</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>IL1B -511C/T</b>	<b>IL1B +3953C/T</b>	<b>IL1RN (Intron2)</b>	<b>TNF -308G/A</b>	<b>LTA +252G/A</b>	<b>IL-6 +174G/C</b>	<b>IL10 -1082G/A</b>	<b>IL10 -819C/T</b>
<b>P 01</b>	<b>5323542</b>	ARL	F	LNH - Imunocitoma	1.2	1.2	2.3	1.1	2.2	1.2	1.2	1.1
<b>P 02</b>	<b>5797515</b>	AGR	M	LMC – CB + TMO	2.2	1.1	1.2	1.1	1.2	1.2	1.2	1.2
<b>P 03</b>	<b>0960268</b>	MLR	M	Talassemia	1.2	1.1	1.2	1.1	2.2	1.2	2.2	1.2
<b>P 04</b>	<b>7198975</b>	RIC	M	LNH - AG	1.2	1.2	1.1	1.1	2.2	1.2	1.1	1.1
<b>P 06</b>	<b>7502596</b>	HC	F	Abscesso hepático	1.1	1.1	1.2	1.1	1.2	1.2	2.2	1.2
<b>P 08</b>	<b>6775095</b>	AR	M	Ca de bexiga	1.2	1.2	1.1	1.1	2.2	1.2	1.2	1.1
<b>P 09</b>	<b>5548338</b>	WB	M	Cirrose hepática	1.2	1.2	1.2	1.1	1.2	1.1	2.2	2.2
<b>P 10</b>	<b>7232670</b>	CACP	F	LMA	1.1	1.2	1.3	1.1	2.2	2.2	1.2	1.1
<b>P 13</b>	<b>1651753</b>	JJS	M	Ca gástrico	1.1	2.2	1.1	1.1	1.2	1.1	2.2	1.1
<b>P 14</b>	<b>7534585</b>	VEF	M	LMA	1.2	2.2	1.2	1.1	1.2	1.2	1.2	1.2
<b>P 15</b>	<b>1939024</b>	BAB	M	IRC	1.1	1.2	1.2	1.1	1.2	1.2	2.2	1.1
<b>P 19</b>	<b>2108654</b>	JAS	M	AVC hemorrágico	1.2	2.2	1.1	1.2	1.2	1.1	1.2	1.2
<b>P 21</b>	<b>2792140</b>	CRD	M	Anemia falciforme	2.2	2.2	1.2	1.1	1.2	1.1	2.2	1.2
<b>P 24</b>	<b>2337219</b>	IGF	F	Aplasia pura série vermelha	2.2	1.2	1.1	1.1	1.2	1.1	2.2	2.2
<b>P 25</b>	<b>7606320</b>	LDFB	F	LLA	1.2	1.1	1.2	1.2	2.2	1.1	1.1	1.2
<b>P 27</b>	<b>7472333</b>	NRM	F	LNH - AG	1.2	1.2	1.1	2.2	2.2	1.1	2.2	1.2
<b>P 29</b>	<b>7064263</b>	JFS	F	LNH – AG	1.2	1.2	1.1	1.2	1.2	1.1	1.1	1.2
<b>P 30</b>	<b>7584053</b>	MAM	M	LMA	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	2.2	2.2	1.1

<b>Pacientes SEM RFNH (continuação).</b>												
	<b>Registro</b>	<b>Iniciais</b>	<b>Sexo</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>IL1B -511C/T</b>	<b>IL1B +3953C/T</b>	<b>IL1RN (Intron2)</b>	<b>TNF -308G/A</b>	<b>LTA +252G/A</b>	<b>IL6 +174G/C</b>	<b>IL10 -1082G/A</b>	<b>IL10 -819C/T</b>
<b>P 31</b>	<b>6635580</b>	CDP	M	Talassemia	1.2	1.2	1.2	2.2	1.2	NR	1.2	1.1
<b>P 32</b>	<b>7210456</b>	LR	F	LMC + TMO	1.2	1.1	1.2	1.2	1.2	NR	1.2	1.1
<b>P 33</b>	<b>7546461</b>	MAS	M	AA grave	2.2	1.1	1.2	1.1	1.2	NR	2.2	2.2
<b>P 34</b>	<b>6539627</b>	NBR	F	Cirrose hepática	1.2	1.1	1.2	1.1	2.2	NR	1.2	1.1
<b>P 36</b>	<b>7694385</b>	ACR	M	AA grave	1.2	1.1	1.1	1.1	1.2	NR	1.2	1.1
<b>P 37</b>	<b>6558239</b>	JAO	M	LNH – AG	2.2	1.1	1.1	1.1	1.2	NR	2.2	1.1
<b>P 38</b>	<b>7457375</b>	TGSF	F	LMA	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	NR	2.2	2.2
<b>P 41</b>	<b>7614589</b>	LB	F	IRC	1.1	1.1	1.1	1.2	1.2	NR	2.2	1.2
<b>P 42</b>	<b>7438440</b>	RAR	M	LMA + TMO	1.2	1.2	2.3	1.1	1.1	NR	2.2	1.2
<b>P 43</b>	<b>6057174</b>	WN	M	LNH – AG + TMO	1.2	1.1	1.1	1.1	1.1	NR	1.1	1.1



<b>Pacientes COM RFNH precoce.</b>												
	<b>Registro</b>	<b>Iniciais</b>	<b>Sexo</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>IL1B -511C/T</b>	<b>IL1B +3953C/T</b>	<b>IL1RN (Intron2)</b>	<b>TNF -308G/A</b>	<b>LTA +252G/A</b>	<b>IL6 +174G/C</b>	<b>IL10 -1082G/A</b>	<b>IL10 -819C/T</b>
<b>P 05</b>	<b>7414842</b>	ES	M	Ca de reto	1.2	1.1	1.2	1.2	2.2	1.1	1.2	1.2
<b>P 07</b>	<b>7505821</b>	MLM	F	SMD – AR	2.2	1.2	1.2	1.1	1.2	1.2	2.2	1.1
<b>P 11</b>	<b>6857714</b>	RLMM	M	LNH - AG	1.2	1.2	1.1	1.2	1.1	1.1	2.2	1.2
<b>P 12</b>	<b>6920450</b>	MPA	M	LNH + TMO	1.2	1.2	1.2	1.1	1.2	1.1	1.2	1.2
<b>P 16</b>	<b>7536682</b>	GTB	M	LMA	1.2	1.1	2.2	1.1	2.2	1.1	1.2	1.2
<b>P 17</b>	<b>5473759</b>	LARS	F	Ca de reto	1.2	2.2	1.2	1.1	2.2	1.1	1.2	1.2
<b>P 18</b>	<b>Externo</b>	TRFI	F	IRC	1.1	2.2	1.1	1.2	1.2	1.1	1.2	1.1
<b>P 20</b>	<b>675820-3</b>	JSBF	M	IRC	2.2	2.2	1.2	1.1	2.2	1.1	2.2	1.2
<b>P 22</b>	<b>6182737</b>	JAS	M	AA grave + TMO	1.2	1.1	1.2	1.2	1.1	1.1	1.2	1.1
<b>P 23</b>	<b>6530205</b>	CYF	F	AA grave	1.2	1.1	2.2	1.2	1.2	2.2	1.1	1.1
<b>P 26</b>	<b>6644236</b>	OBFG	F	SMD - AR	1.2	1.2	1.2	1.1	1.2	1.2	2.2	2.2
<b>P 40</b>	<b>498215-1</b>	GS	M	CH	1.1	1.2	2.2	1.2	1.2	1.1	1.1	1.1

**Legenda de Diagnósticos:**

**LNH – Linfoma não Hodgkin**

**Ca – Carcinoma**

**LMA – Leucemia Mielóide Aguda**

**LLA – Leucemia Linfóide Aguda**

**LMC – Leucemia Mielóide Crônica**

**TMO – Transplante de Medula Óssea**

**SMD – AR – Síndrome Mielodisplásica – Anemia Refratária**

**IRC – Insuficiência Renal Crônica**

**AVC – Acidente Vascular Cerebral**

**AA grave – Anemia Aplástica Grave**

**Anexo IV – Tabelas de Contagem de Leucócitos e Plaquetas, dosagem de IL-1 beta e genotipagem complexo IL1 (*IL1B*-511C/T, *IL1B* +3953C/T e *IL1RN*) nos concentrados de plaquetas.**

Doador	No. Amostra	Leucócitos		Plaquetas		Dosagens IL-1 beta (pg/ml)			Genotipagem complexo <i>IL1</i>		
		X 10e9 /L	X 10e 9 /U	X 10e11/L	X 10e10/U	D3	D5	D7	<i>IL1B</i> -511C/T	<i>IL1B</i> +3953C/T	<i>IL1RN</i>
DN 11	0101278-034	1,20	0,70	1,60	9,0				2,2	1,1	1,2
DN 17	0101278-036	2,60	1,43	1,30	7,1			17,94	1,1	1,1	1,1
DN 22	0101278-041	1,60	1,04	0,92	6,0	29,16	148,29	371,12	1,2	1,1	1,2
DN 20	0101278-043	2,30	1,29	1,20	6,8			10,64	1,2	1,1	1,1
DN 21	0101278-044	0,90	0,50	1,40	7,9			4,19	1,2	1,1	1,2
DN 23	0101284-010	2,30	1,29	1,80	10,1			1,94	1,2	1,1	1,2
DN 24	0101284-021	0,70	0,42	1,80	11,1		8,12	46,42	1,1	1,2	1,1
DN 25	0101284-022	1,00	0,55	0,92	4,3	79,68	364,38	420,94	2,2	1,2	1,1
DN 26	0101284-025	0,70	0,39	1,50	8,1				1,1	1,2	1,2
DN 27	0101284-027	0,80	0,49	1,20	7,1				1,1	1,1	1,1
DN 28	0101284-034	0,90	0,51	0,94	5,4				1,2	1,1	1,1
DN 31	0902102-013	3,30	2,00	1,30	7,8		1,66	5,08	1,2	1,2	1,1
DN 32	0202102-010	7,10	4,10	1,50	8,4		1,96	4,94	1,2	1,2	1,1
DN 30	0902102-010	0,60	0,40	1,20	6,8		17,59	46,33	2,2	1,1	1,2
DN 29	0902102-009	1,20	7,00	1,30	7,6				1,1	1,1	1,1
DN 33	0302102-012	1,30	0,80	1,70	10,0		1,21	18,93	1,2	1,1	1,2
DN 34	0302109-003	2,10	1,40	1,40	9,1		2,11	543,98	2,2	1,1	1,2
DN 35	0302109-004	3,10	1,90	1,30	7,9		2,26	140,89	2,2	1,1	1,2
DN 36	0302109-006	3,10	1,80	1,30	7,6			10,29	1,1	1,2	1,1
DN 37	0302109-007	3,10	1,80	1,60	9,8				1,2	1,1	1,1
DN 38	0302109-008	2,90	1,60	1,60	8,6	5,83	16,11	407,73	1,2	1,1	2,2
DN 39	0202116-004	1,80	1,10	1,80	10,8	2,55	82,37	94,43	1,1	1,2	1,2
DN 40	0902116-006	2,00	1,20	1,20	7,2	3,74	107,68	207,89	1,1	1,1	1,1
DN 41	0902116-008	4,40	2,50	1,40	8,0	0,02	173,65	294,26	2,2	1,1	1,2
DN 42	0202116-013	1,40	0,80	0,92	5,6				1,2	1,1	1,4
DN 43	0202116-024	0,90	0,50	1,10	6,7		2,70	6,76	1,2	1,2	1,2
DN 44	0102137-062	3,10	2,10	1,40	9,6	7,76	62,26	210,13	2,2	1,1	1,1
DN 45	0102137-063	2,20	1,40	1,40	9,1		36,21	140,59	2,2	1,2	1,1
DN 46	0102137-064	2,70	1,70	1,60	10,2		0,76	0,91	1,1	1,1	1,1
DN 48	0102137-084	18,80	11,80	1,20	7,6	3,59	7,76	10,29	1,2	1,1	1,1
<b>Média</b>		2,67	1,82	1,36	8,0	15,31	19,06	80,19			
<b>Desvio Padrão</b>		3,34	2,30	0,26	1,64	30,40	37,80	158,60			
<b>Mediana</b>		2,05	1,29	1,35	7,90	0,00	0,00	0,00			

**IL1B-511CC (n=9)**

Doador	No. Amostra	Leucócitos		Plaquetas		Dosagens IL-1 beta (pg/ml)		
		X 10e9 /L	X 10e 9 /U	X 10e11/L	X 10e10/U	D3	D5	D7
DN 17	0101278-036	2,60	1,43	1,30	7,1			17,94
DN 24	0101284-021	0,70	0,42	1,85	11,1		8,12	46,42
DN 26	0101284-025	0,70	0,39	1,47	8,1			
DN 27	0101284-027	0,80	0,49	1,16	7,1			
DN 29	0902102-009	1,20	7,00	1,31	7,6			
DN 36	0302109-006	3,10	1,80	1,32	7,6			10,29
DN 39	0202116-004	1,80	1,10	1,80	10,8	2,55	82,80	94,43
DN 40	0902116-006	2,00	1,20	1,16	7,2	3,74	107,00	207,89
DN 46	0102137-064	2,70	1,70	1,60	10,2		0,00	0,91
<b>Média</b>		<b>1,73</b>	<b>1,73</b>	<b>1,44</b>	<b>8,53</b>	<b>0,69</b>	<b>22,10</b>	<b>41,98</b>
<b>Desvio Padrão</b>		<b>0,93</b>	<b>2,05</b>	<b>0,26</b>	<b>1,67</b>	<b>1,42</b>	<b>41,90</b>	<b>69,68</b>
<b>Mediana</b>		<b>1,80</b>	<b>1,20</b>	<b>1,32</b>	<b>7,60</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>10,29</b>

**IL1B-511CT (n=13)**

Doador	No. Amostra	Leucócitos		Plaquetas		Dosagens IL-1 beta (pg/ml)		
		X 10e9 /L	X 10e 9 /U	X 10e11/L	X 10e10/U	D3	D5	D7
DN 22	0101278-041	1,60	1,04	0,92	6,0	29,16	148,29	371,12
DN 20	0101278-043	2,30	1,29	1,20	6,8			10,64
DN 21	0101278-044	0,90	0,50	1,40	7,9			4,19
DN 23	0101284-010	2,30	1,29	1,80	10,1			1,94
DN 28	0101284-034	0,90	0,51	0,94	5,4			0,00
DN 31	0902102-013	3,30	2,00	1,30	7,8		1,66	5,08
DN 32	0202102-010	7,10	4,10	1,50	8,4		1,96	4,94
DN 33	0302102-012	1,30	0,80	1,70	10,0		1,21	18,93
DN 37	0302109-007	3,10	1,80	1,60	9,8			
DN 38	0302109-008	2,90	1,60	1,60	8,6	5,83	16,11	407,73
DN 42	0202116-013	1,40	0,80	0,92	5,6			
DN 43	0202116-024	0,90	0,50	1,10	6,7		2,70	6,76
DN 48	0102137-084	18,80	11,80	1,20	7,6	3,59	7,76	10,29
<b>Média</b>		<b>3,60</b>	<b>2,16</b>	<b>1,32</b>	<b>7,75</b>	<b>2,99</b>	<b>13,82</b>	<b>64,74</b>
<b>Desvio Padrão</b>		<b>4,86</b>	<b>3,05</b>	<b>0,30</b>	<b>1,61</b>	<b>8,07</b>	<b>40,66</b>	<b>144,39</b>
<b>Mediana</b>		<b>2,30</b>	<b>1,29</b>	<b>1,30</b>	<b>7,80</b>	<b>0,00</b>	<b>1,21</b>	<b>5,08</b>

**IL1B-511TT (n=8)**

Doador	No. Amostra	Leucócitos		Plaquetas		Dosagens IL-1 beta (pg/ml)		
		X 10e9 /L	X 10e 9 /U	X 10e11/L	X 10e10/U	D3	D5	D7
DN 11	0101278-034	1,20	0,70	1,55	9,0			
DN 25	0101284-022	1,00	0,55	0,78	4,3	79,68	364,38	420,94
DN 30	0902102-010	0,60	0,40	1,12	6,8		17,59	46,33
DN 34	0302109-003	2,10	1,40	1,40	9,1		2,11	543,98
DN 35	0302109-004	3,10	1,90	1,30	7,9		2,26	140,89
DN 41	0902116-008	4,40	2,50	1,38	8,0		173,65	294,26
DN 44	0102137-062	3,10	2,10	1,45	9,6	7,76	62,26	210,13
DN 45	0102137-063	2,20	1,40	1,41	9,1		36,21	140,59
<b>Média</b>		<b>2,21</b>	<b>1,37</b>	<b>1,30</b>	<b>7,98</b>	<b>10,93</b>	<b>82,31</b>	<b>224,64</b>
<b>Desvio Padrão</b>		<b>1,28</b>	<b>0,77</b>	<b>0,24</b>	<b>1,74</b>	<b>27,91</b>	<b>127,75</b>	<b>185,90</b>
<b>Mediana</b>		<b>2,15</b>	<b>1,40</b>	<b>1,39</b>	<b>8,50</b>	<b>0,00</b>	<b>26,90</b>	<b>175,51</b>

### IL1B+3953CC (n=21)

Doador	No. Amostra	Leucócitos		Plaquetas		Dosagens IL-1 beta (pg/ml)		
		X 10e9 /L	X 10e 9 /U	X 10e11/L	X 10e10/U	D3	D5	D7
DN 11	0101278-034	1,20	0,70	1,60	9,0			
DN 17	0101278-036	2,60	1,43	1,30	7,1			17,94
DN 22	0101278-041	1,60	1,04	0,92	6,0	29,16	148,29	371,12
DN 20	0101278-043	2,30	1,29	1,20	6,8			10,64
DN 21	0101278-044	0,90	0,50	1,40	7,9			4,19
DN 23	0101284-010	2,30	1,29	1,80	10,1			1,94
DN 27	0101284-027	0,80	0,49	1,20	7,1			
DN 28	0101284-034	0,90	0,51	0,94	5,4			
DN 30	0902102-010	0,60	0,40	1,10	6,8		17,59	46,33
DN 29	0902102-009	1,20	7,00	1,30	7,6			
DN 33	0302102-012	1,30	0,80	1,68	10,0		1,21	18,93
DN 34	0302109-003	2,10	1,40	1,36	9,1		2,11	543,98
DN 35	0302109-004	3,10	1,90	1,30	7,9		2,26	140,89
DN 37	0302109-007	3,10	1,80	1,60	9,8			
DN 38	0302109-008	2,90	1,60	1,60	8,6	5,83	16,11	407,73
DN 40	0902116-006	2,00	1,20	1,20	7,2	3,74	107,68	207,89
DN 41	0902116-008	4,40	2,50	1,40	8,0		173,65	294,26
DN 42	0202116-013	1,40	0,80	0,92	5,6			
DN 44	0102137-062	3,10	2,10	1,40	9,6	7,76	62,20	210,13
DN 46	0102137-064	2,70	1,70	1,60	10,2			
DN 48	0102137-084	18,20	11,80	1,20	7,6	3,59	7,70	10,29
<b>Média</b>		<b>2,82</b>	<b>2,01</b>	<b>1,33</b>	<b>7,97</b>	<b>2,40</b>	<b>25,69</b>	<b>108,91</b>
<b>Desvio Padrão</b>		<b>3,66</b>	<b>2,63</b>	<b>0,25</b>	<b>1,48</b>	<b>6,52</b>	<b>52,14</b>	<b>165,48</b>
<b>Mediana</b>		<b>2,10</b>	<b>1,29</b>	<b>1,32</b>	<b>7,90</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>10,64</b>

**IL1B+3953CT (n=9)**

Doador	No. Amostra	Leucócitos		Plaquetas		Dosagens IL-1 beta (pg/ml)		
		X 10e9 /L	X 10e 9 /U	X 10e11/L	X 10e10/U	D3	D5	D7
DN 24	0101284-021	0,85	0,42	1,85	11,1		8,12	46,42
DN 25	0101284-022	2,00	0,55	0,78	4,3	79,68	364,38	420,94
DN 26	0101284-025	0,70	0,39	1,37	8,1			
DN 31	0902102-013	3,30	2,00	1,30	7,8		1,66	5,08
DN 32	0202102-010	7,10	4,10	1,50	8,4		1,96	4,94
DN 36	0302109-006	3,50	1,80	1,30	7,6			10,29
DN 39	0202116-004	1,90	1,10	1,80	10,8	2,55	82,37	94,43
DN 43	0202116-024	0,90	0,50	1,10	6,7		2,70	6,76
DN 45	0102137-063	2,30	1,40	1,40	9,1		36,21	140,59
<b>Média</b>		<b>2,51</b>	<b>1,36</b>	<b>1,38</b>	<b>8,21</b>	<b>10,28</b>	<b>62,17</b>	<b>91,18</b>
<b>Desvio Padrão</b>		<b>2,00</b>	<b>1,19</b>	<b>0,33</b>	<b>2,06</b>	<b>28,05</b>	<b>125,37</b>	<b>142,28</b>
<b>Mediana</b>		<b>2,00</b>	<b>1,10</b>	<b>1,37</b>	<b>8,10</b>	<b>0,00</b>	<b>5,41</b>	<b>28,35</b>

**IL1RN intron 2, VNTR (1.1 + 1.4) (n=17)**

Doador	No. Amostra	Leucócitos		Plaquetas		Dosagens IL-1 beta (pg/ml)		
		X 10e9 /L	X 10e 9 /U	X 10e11/L	X 10e10/U	D3	D5	D7
DN 17	0101278-036	2,60	1,43	1,30	7,1			17,94
DN 20	0101278-043	2,30	1,29	1,20	6,8			10,64
DN 24	0101284-021	0,70	0,42	1,80	11,1		8,12	46,42
DN 25	0101284-022	1,00	0,55	0,78	4,3	79,68	364,38	420,94
DN 27	0101284-027	0,80	0,49	1,20	7,1			
DN 28	0101284-034	0,90	0,51	0,94	5,4			
DN 31	0902102-013	3,30	2,00	1,32	7,8		1,66	5,08
DN 32	0202102-010	7,10	4,10	1,55	8,4		1,96	4,94
DN 29	0902102-009	1,20	7,00	1,30	7,6			
DN 36	0302109-006	3,10	1,80	1,30	7,6			10,29
DN 37	0302109-007	3,10	1,80	1,60	9,8			
DN 40	0902116-006	2,00	1,20	1,20	7,2	3,74	107,68	207,89
DN 42	0202116-013	1,40	0,80	0,92	5,6			
DN 44	0102137-062	3,10	2,10	1,40	9,6	7,76	62,26	210,13
DN 45	0102137-063	2,20	1,40	1,40	9,1		36,21	140,59
DN 46	0102137-064	2,70	1,70	1,60	10,2			
DN 48	0102137-084	18,80	11,80	1,20	7,6	3,59	7,76	10,29
<b>Média</b>		<b>3,31</b>	<b>2,38</b>	<b>1,29</b>	<b>7,8</b>	<b>5,57</b>	<b>34,75</b>	<b>63,89</b>
<b>Desvio Padrão</b>		<b>4,27</b>	<b>2,91</b>	<b>0,26</b>	<b>1,79</b>	<b>19,22</b>	<b>89,85</b>	<b>116,67</b>
<b>Mediana</b>		<b>2,30</b>	<b>1,43</b>	<b>1,30</b>	<b>7,60</b>	<b>0,00</b>	<b>0,76</b>	<b>10,29</b>



**IL1RN intron 2, VNTR (1.2 + 1.2) (n=13)**

Doador	No. Amostra	Leucócitos		Plaquetas		Dosagens IL-1 beta (pg/ml)		
		X 10e9 /L	X 10e 9 /U	X 10e11/L	X 10e10/U	D3	D5	D7
DN 11	0101278-034	1,20	0,70	1,60	9,0			
DN 22	0101278-041	1,60	1,04	0,92	6,0	29,16	148,29	371,12
DN 21	0101278-044	0,90	0,50	1,40	7,9			4,19
DN 23	0101284-010	2,30	1,29	1,80	10,1			1,94
DN 26	0101284-025	0,70	0,39	1,50	8,1			
DN 30	0902102-010	0,60	0,40	1,20	6,8		17,59	46,33
DN 33	0302102-012	1,30	0,80	1,68	10,0		1,21	18,93
DN 34	0302109-003	2,10	1,40	1,40	9,1		2,11	543,98
DN 35	0302109-004	3,10	1,90	1,30	7,9		2,26	140,89
DN 38	0302109-008	2,90	1,60	1,58	8,6	5,83	16,11	407,73
DN 39	0202116-004	1,80	1,10	1,78	10,8	2,55	82,37	94,43
DN 41	0902116-008	4,40	2,50	1,40	8,0		173,65	294,26
DN 43	0202116-024	0,90	0,50	1,10	6,7		2,70	6,76
<b>Média</b>		<b>1,83</b>	<b>1,09</b>	<b>1,42</b>	<b>8,4</b>	<b>2,91</b>	<b>34,33</b>	<b>148,50</b>
<b>Desvio Padrão</b>		<b>1,11</b>	<b>0,64</b>	<b>0,26</b>	<b>1,42</b>	<b>8,06</b>	<b>60,68</b>	<b>189,54</b>
<b>Mediana</b>		<b>1,60</b>	<b>1,04</b>	<b>1,42</b>	<b>8,10</b>	<b>0,00</b>	<b>2,26</b>	<b>46,33</b>

**Obs.:** nas tabelas do **anexo IV** os valores em branco de dosagens de IL-1beta e TNF alfa representam valores abaixo do limite de sensibilidade dos testes utilizados e para os cálculos foram considerados como zero.

**Anexo V** – Tabelas de Contagem de Leucócitos e Plaquetas, dosagem de TNF alfa e genotipagem TNF (*TNF-308G/A*) nos concentrados de plaquetas.

Doador	No. Amostra	Leucócitos		Plaquetas		Dosagens TNF alfa (pg/ml)			Genotipagem <i>TNF-308G/A</i>
		X 10e9 /L	X 10e 9 /U	X 10e11/L	X 10e10/U	D3	D5	D7	
DN 11	0101278-034	1,20	0,70	1,60	9,0				1.2
DN 17	0101278-036	2,60	1,43	1,30	7,1				2.2
DN 22	0101278-041	1,60	1,04	0,92	6,0		14,73	41,78	1.1
DN 20	0101278-043	2,30	1,29	1,20	6,8				1.1
DN 21	0101278-044	0,90	0,50	1,40	7,9				1.2
DN 23	0101284-010	2,30	1,29	1,80	10,1				1.2
DN 24	0101284-021	0,70	0,42	1,80	11,1				1.2
DN 25	0101284-022	1,00	0,55	0,92	4,3	164,89	204,08	154,49	1.1
DN 26	0101284-025	0,70	0,39	1,50	8,1				1.1
DN 27	0101284-027	0,80	0,49	1,20	7,1				1.1
DN 28	0101284-034	0,90	0,51	0,94	5,4				1.1
DN 31	0902102-013	3,30	2,00	1,30	7,8				1.1
DN 32	0202102-010	7,10	4,10	1,50	8,4				1.1
DN 30	0902102-010	0,60	0,40	1,20	6,8				1.1
DN 29	0902102-009	1,20	7,00	1,30	7,6				1.1
DN 33	0302102-012	1,30	0,80	1,70	10,0			834,91	1.1
DN 34	0302109-003	2,10	1,40	1,40	9,1			51,15	1.1
DN 35	0302109-004	3,10	1,90	1,30	7,9				1.2
DN 36	0302109-006	3,10	1,80	1,30	7,6				1.1
DN 37	0302109-007	3,10	1,80	1,60	9,8			246,39	1.1
DN 38	0302109-008	2,90	1,60	1,60	8,6				2.2
DN 39	0202116-004	1,80	1,10	1,80	10,8			2,94	2.2
DN 40	0902116-006	2,00	1,20	1,20	7,2		31,38	49,41	1.1
DN 41	0902116-008	4,40	2,50	1,40	8,0				1.1
DN 42	0202116-013	1,40	0,80	0,92	5,6			30,34	1.1
DN 43	0202116-024	0,90	0,50	1,10	6,7			5,02	1.2
DN 44	0102137-062	3,10	2,10	1,40	9,6				1.1
DN 45	0102137-063	2,20	1,40	1,40	9,1				1.2
DN 46	0102137-064	2,70	1,70	1,60	10,2	5,69	8,63	48,84	1.2
DN 48	0102137-084	18,80	11,80	1,20	7,6	30,62	38,12	160,38	1.1
<b>Média</b>		2,67	1,82	1,36	8,0	15,31	19,06	80,19	
<b>Desvio Padrão</b>		3,34	2,30	0,26	1,64	30,40	37,80	158,60	
<b>Mediana</b>		2,05	1,29	1,35	7,90	0,00	0,00	0,00	

### TNF-308GG (n=19)

Doador	No. Amostra	Leucócitos		Plaquetas		Dosagens TNF alfa (pg/ml)		
		X 10e9 /L	X 10e 9 /U	X 10e11/L	X 10e10/U	D3	D5	D7
DN 22	0101278-041	1,60	1,04	0,9	6,0		14,73	41,78
DN 20	0101278-043	2,30	1,29	1,2	6,8			
DN 25	0101284-022	1,00	0,55	0,8	4,3	164,89	204,08	154,49
DN 26	0101284-025	0,70	0,39	1,5	8,1			
DN 27	0101284-027	0,80	0,49	1,2	7,1			
DN 28	0101284-034	0,90	0,51	0,9	5,4			
DN 31	0902102-013	3,30	2,00	1,3	7,8			
DN 32	0202102-010	7,10	4,10	1,5	8,4			
DN 30	0902102-010	0,60	0,40	1,1	6,8			
DN 29	0902102-009	1,20	7,00	1,3	7,6			
DN 33	0302102-012	1,30	0,80	11,7	10,0			834,91
DN 34	0302109-003	2,10	1,40	1,4	9,1			51,15
DN 36	0302109-006	3,10	1,80	1,3	7,6			
DN 37	0302109-007	3,10	1,80	1,6	9,8			246,39
DN 40	0902116-006	2,00	1,20	1,2	7,2		31,38	49,41
DN 41	0902116-008	4,40	2,50	1,4	8,0			
DN 42	0202116-013	1,40	0,80	0,9	5,6			30,34
DN 44	0102137-062	3,10	2,10	1,4	9,6			
DN 48	0102137-084	18,80	11,80	1,2	7,6	30,62	38,12	160,38
<b>Média</b>		3,09	2,21	1,25	7,5	10,29	15,17	82,57
<b>Desvio Padrão</b>		4,12	2,81	0,23	1,52	38,08	47,09	195,16
<b>Mediana</b>		2,00	1,29	1,28	7,60	0,00	0,00	0,00

**TNF-308GA (n=8)**

Doador	No. Amostra	Leucócitos		Plaquetas		Dosagens TNF alfa (pg/ml)		
		X 10e9 /L	X 10e 9 /U	X 10e11/L	X 10e10/U	D3	D5	D7
DN 11	0101278-034	1,20	0,70	1,60	9,0			
DN 21	0101278-044	0,90	0,50	1,40	7,9			
DN 23	0101284-010	2,30	1,29	1,80	10,1			
DN 24	0101284-021	0,70	0,42	1,80	11,1			
DN 35	0302109-004	3,10	1,90	1,30	7,9			
DN 43	0202116-024	0,90	0,50	1,10	6,7			5,02
DN 45	0102137-063	2,20	1,40	1,40	9,1			
DN 46	0102137-064	2,70	1,70	1,60	10,2	5,69	8,63	48,84
<b>Média</b>		1,86	1,14	1,51	9,06	0,71	1,07	6,73
<b>Desvio Padrão</b>		3,34	0,69	0,25	1,46	2,01	3,05	17,10
<b>Mediana</b>		1,75	0,99	1,50	9,3	0,00	0,00	0,00

**TNF-308AA (n=3)**

Doador	No. Amostra	Leucócitos		Plaquetas		Dosagens TNF alfa (pg/ml)		
		X 10e9 /L	X 10e 9 /U	X 10e11/L	X 10e10/U	D3	D5	D7
DN 17	0101278-036	2,60	1,43	1,30	7,1			
DN 38	0302109-008	2,90	1,60	1,60	8,6			
DN 39	0202116-004	1,80	1,10	1,80	10,8			2,94
<b>Média</b>		2,43	1,38	1,55	8,8	0,0	0,0	0,98
<b>Desvio Padrão</b>		0,57	0,25	0,26	1,86	0,0	0,0	1,69
<b>Mediana</b>		2,60	1,43	1,56	8,6	0,0	0,0	0,0

### TNF-308GA e AA (n=11)

Doador	No. Amostra	Leucócitos		Plaquetas		Dosagens TNF alfa (pg/ml)		
		X 10e9 /L	X 10e 9 /U	X 10e11/L	X 10e10/U	D3	D5	D7
DN 11	0101278-034	1,20	0,70	1,60	9,0			
DN 17	0101278-036	2,60	1,43	1,30	7,1			
DN 21	0101278-044	0,90	0,50	1,40	7,9			
DN 23	0101284-010	2,30	1,29	1,80	10,1			
DN 24	0101284-021	0,70	0,42	1,80	11,1			
DN 35	0302109-004	3,10	1,90	1,30	7,9			
DN 38	0302109-008	2,90	1,60	1,60	8,6			
DN 39	0202116-004	1,80	1,10	1,80	10,8			2,94
DN 43	0202116-024	0,90	0,50	1,10	6,7			5,02
DN 45	0102137-063	2,20	1,40	1,40	9,1			
DN 46	0102137-064	2,70	1,70	1,60	10,2	5,69	8,63	48,84
<b>Média</b>		1,91	1,11	1,53	8,9	0,57	0,86	5,68
<b>Desvio Padrão</b>		0,92	0,55	0,25	1,55	1,79	2,73	15,26
<b>Mediana</b>		2,05	1,20	1,60	8,80	0,3	0,0	0,0

**Obs.:** nas tabelas do **anexo V** os valores em branco de dosagens de IL-1beta e TNF alfa representam valores abaixo do limite de sensibilidade dos testes utilizados e para os cálculos foram considerados como zero.

## DEFINIÇÃO DOS ALELOS:

### **IL1B-511C/T:**

**Enzima de Restrição: Aval**

**C** – Alelo 1 (190+114 bp)

**T** – Alelo 2 (304 bp)

### **IL1B +3.953C/T:**

**Enzima de Restrição: TaqI**

**C** - Alelo 1 (135+114 bp)

**T** – Alelo 2 (249 bp)

### **IL1RN intron 2, VNTR**

Alelo 0 – **154 bp**

Alelo 1 - **410 bp**

Alelo 2 - **240 bp**

Alelo 3 - **500 bp**

Alelo 4 - **325 bp**

Alelo 5 - **595 bp**

### **IL6-174G/C**

**Enzima de Restrição: NlaIII**

**G** - Alelo 1 (208 bp)

**C** - Alelo 2 (85 + 123 bp)

### **TNF-308 G/A**

**Enzima de Restrição NcoI**

**G** – Alelo 1 (87+20 bp)

**A** – Alelo 2 (107 bp)

### **LTA +252G/A**

**Enzima de Restrição NcoI**

**G** – Alelo 1 (182+190 bp)

**A** – Alelo 2 (372 bp)

*LTA +252 \*1(G) – aa posição 26 (AAC) – asparagina*

*LTA +252 \*2 (A) – aa posição 26 (ACC) - treonina*

### **IL10-1082G/A**

Seqüenciamento

**G** - Alelo 1

**A** - Alelo 2

### **IL10-819T/C**

Seqüenciamento

**C** - Alelo 1

**T** - Alelo 2

### **Fenótipos**

**Alto** – GC/GC

**Intermediário** – GC/AT ou GC/AC

**Baixo** – AC/AC