

Michele Gassen Kellermann

**Influência dos Polimorfismos dos Genes *IL1B*-  
*511C/T*, *IL1B+3953C/T*, *IL1RN VNTR*, *TNF-308G/A* e  
*IL6-174G/C* na Mucosite Oral após Transplante de  
Células-Tronco Hematopoéticas**

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Estomatopatologia na área de Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Jacks Jorge Junior  
Co-orientador: Profa. Dra. Maria Elvira Pizzigatti Correa

Piracicaba  
2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

K286i Kellermann, Michele Gassen.  
Influência dos polimorfismos dos genes *IL1B-511C/T*,  
*IL1B+3953C/T*, *IL1RN VNTR*, *TNF-308G/A* e *IL6-174G/C* na  
mucosite oral após transplante de células-tronco hematopoéticas.  
/ Michele Gassen Kellermann. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.

Orientadores: Jacks Jorge Júnior, Maria Elvira Pizzigatti  
Correa.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas,  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Sobrevida. 2. Citocinas. 3. Genética. I. Jorge Júnior, Jacks.  
II. Correa, Maria Elvira Pizzigatti. III. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Influence of polymorphisms of genes *IL1B-511C/T*,  
*IL1B+3953C/T*, *IL1RN VNTR*, *TNF-308G/A* e *IL6-174G/C* in oral mucositis after  
hematopoietic stem cells transplantation

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Survivorship. 2. Cytokines. 3. Genetic

Área de Concentração: Patologia

Titulação: Doutor em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Jacks Jorge Júnior, Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel,  
Danyel Elias Da Cruz Perez, Afonso Celso Vigorito, Marcelo Addas Carvalho

Data da Defesa: 11-02-2010

Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia



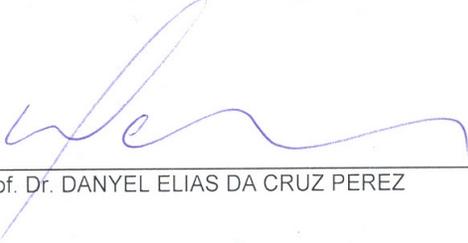
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

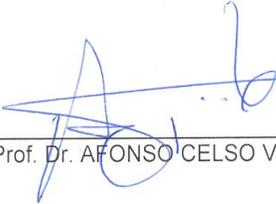


A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 11 de Fevereiro de 2010, considerou a candidata MICHELE GASSEN KELLERMANN aprovada.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. JACKS JORGE JÚNIOR

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. ANA LÚCIA CARRINHO AYROZA RANGEL

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. AFONSO CELSO VIGORITO

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. MARCELO ADDAS CARVALHO

## DEDICO ESTE TRABALHO

Aos meus queridos pais **Nerci** e **Francisco** por tudo o que sempre fizeram por mim, por todo amor, cuidado e incentivo.

Aos meus irmãos **Francisco** e **Ramon** pelo apoio, amizade e carinho nesta etapa de minha vida.

Ao meu namorado, **Ricardo**, dedico este trabalho com todo o meu carinho. Obrigada pelo incentivo constante, por ser sempre prestativo, compreensivo, paciente e carinhoso, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus avós **Armindo** (*in memoriam*), **Julieta** (*in memoriam*), **Leonardo** e **Julita** que sempre torceram por mim.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

Aos **Profs. Drs. Edgard Graner, Márcio Ajudarte Lopes, Pablo Agustin Vargas e Oslei Paes de Almeida**, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

Ao **Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**, meu orientador, por todos esses anos de convivência, em que aprendi muito não só sobre Ciência, mas como deve ser um profissional de caráter e competência.

À minha co-orientadora **Dra. Maria Elvira Pizzigatti Correa**, pela paciência, confiança e oportunidade de compartilhar seus conhecimentos.

Ao **Prof. Dr. Léo Kraether Neto**, da Universidade de Santa Cruz do Sul, por ter despertado meu interesse pela estomatologia e pela patologia, e pela imensa contribuição em minha formação.

À **Profa. Dra. Joyce Maria Annicchino-Bizzachi** e à **Maria Lúcia (Ucha)** pela grande colaboração neste trabalho.

À colega **Josie** pela ajuda nos experimentos realizados no laboratório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP.

À **Eliana Miranda**, pela valiosa contribuição na coleta de dados e pela realização das análises estatísticas deste trabalho.

Aos colegas do Orocetro, **Ângela, Camila, Cida, Bruno, Débora, Douglas, Valéria, Victor e Renato** pela amizade e companheirismo.

À minha grande amiga **Sandrine** pelo carinho, atenção e por sempre estar disposta a me ajudar. Mesmo longe nunca vou esquecer da nossa grande amizade e momentos tão descontraídos que passamos juntas.

Aos amigos da pós-graduação **Ana, Adrielle, Alan, Andréia, Bruno, Camila, Carol, Daniel, Débora, Fabiana, Fernanda, Jorge, Lays, Lília, Lívia, Manuela, Marco, Mario, Michelle, Rose, Patrícia e Victor** pelos momentos de estudo e diversão compartilhados.

Por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram e compartilharam desta caminhada, que será para sempre um marco em minha vida pessoal e profissional.

"A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais retornará ao seu tamanho original".

Albert Einstein

## RESUMO

A mucosite oral é uma complicação comum do transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) e está associada à citotoxicidade das drogas utilizadas durante o regime de condicionamento. Os efeitos debilitantes da mucosite podem causar aumento da morbidade, aumento do risco de infecções sistêmicas e queda de qualidade de vida dos pacientes durante o período imediato pós-condicionamento. Os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da mucosite oral são complexos e ainda não foram completamente elucidados. É conhecido o papel da IL-1, IL-6 e do TNF na etiopatogenia da mucosite, como parte do grupo de agentes desencadeadores do processo inflamatório, iniciado pela liberação de radicais livres originados a partir da citotoxicidade das drogas quimioterápicas utilizadas nos esquemas de condicionamento. Variações genotípicas, como polimorfismos, podem contribuir na suscetibilidade individual aos efeitos secundários do tratamento antineoplásico. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar retrospectivamente a influência dos polimorfismos *IL1B*-511C/T, *IL1B*+3953C/T, *IL1RN* VNTR íntron 2, *TNF*-308G/A e *IL6*-174G/C na mucosite oral, situação final e sobrevida pós-TCTH. A análise dos polimorfismos foi realizada através de reações de PCR utilizando DNA genômico obtido de amostras de sangue periférico de 55 pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico e autólogo. Os resultados demonstraram correlação entre o polimorfismo no gene *IL1B*+3953C/T e a gravidade da mucosite oral. Os pacientes que expressaram os genótipos *IL1B*+3953TT e *IL1B*+3953CT, desenvolveram mucosite oral grave. Ao avaliar apenas os pacientes submetidos ao TCTH alogênico, essa relação foi mantida, contudo, não foi estatisticamente significativa. Os resultados também revelaram que pacientes com mucosite oral grave apresentavam menor sobrevida pós-transplante e maior mortalidade em relação aos pacientes com mucosite leve a moderada. Adicionalmente, os resultados deste estudo demonstraram que a presença dos genótipos *IL1B*+3953TT e *IL1B*+3953CT, associados com mucosite oral grave também estavam relacionados com maior mortalidade e menor sobrevida global pós-

TCTH. Concluindo, os resultados deste trabalho demonstraram a correlação do polimorfismo no gene *IL1B+3953C/T* com a gravidade da mucosite oral, situação final e sobrevida pós-TCTH.

**Palavras chave:** Mucosite oral, Transplante de células-tronco hematopoéticas, Interleucinas, Polimorfismos.

## ABSTRACT

Mucositis is a frequent complication of high-dose chemoradiotherapy regimens commonly used as conditioning therapy before hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). The debilitating effects of mucositis can result in impair quality of life and increase the risk of sepsis in patients submitted to HSCT. The mechanisms involved in the pathobiology of oral mucositis are complex and has not been fully elucidated. Its well known the role of IL-1, IL-6 and TNF in pathogenesis of mucositis, as part of the group of agents triggering the inflammatory process, initiated by free radicals arising from the toxicity of chemotherapy drugs used in conditioning regimens. Genotypic variations, such as polymorphisms, can contribute to individual susceptibility to side effects of anticancer treatment. Thus, the goal of this study was to evaluate retrospectively the influence of polymorphisms *IL1B*-511C/T, *IL1B*+3953C/T, *IL1RN* VNTR, *TNF*-308G/A e *IL6*-174G/C in oral mucositis and survival post-HSCT. The analysis of polymorphisms was performed by PCR reactions using genomic DNA extracted from peripheral blood samples from 55 patients undergoing autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. The results showed a significant correlation between *IL1B*+3953C/T polymorphism and severity of oral mucositis. Patients who expressed the genotypes *IL1B*+3953TT and *IL1B*+3853CT, developed severe oral mucositis. When only the patients undergoing allogeneic HSCT were evaluated, this relationship was maintained, although not statistically significant. The results also revealed that patients with severe oral mucositis had a lower overall survival after transplantation and increased mortality compared to patients with mild to moderate mucositis. This study showed an association between *IL1B*+3953TT and *IL1B*+3953CT genotypes and higher mortality and lower overall survival after HSCT. In conclusion, our results demonstrated the correlation of *IL1B*+3953C/T polymorphism with oral mucositis severity and survival after HSCT.

**Key words:** Oral mucositis, Hematopoietic stem cell transplantation, interleukins, polymorphisms.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	3
2.1. Mucosite Oral .....	3
2.1.1. Apresentação clínica e classificação .....	3
2.1.2. Consequências da mucosite oral .....	4
2.1.3. Fisiopatologia da mucosite oral .....	5
2.1.4. Epidemiologia e fatores de risco .....	8
2.2. Citocinas e polimorfismos gênicos .....	10
2.2.1. Interleucina 1 (IL-1) .....	12
2.2.2. Interleucina 6 (IL-6) .....	14
2.2.3. Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) .....	15
2.3. Transplante de células-tronco hematopoéticas .....	17
2.3.1. O TCTH pode ser classificado: .....	17
2.3.2. Regime de condicionamento .....	19
2.3.3. Complicações do TCTH .....	19
<b>3. PROPOSIÇÃO</b> .....	21
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
4.1. Pacientes e Amostras .....	22
4.1.1. Critérios de inclusão e exclusão .....	23
4.1.2. Obtenção das amostras de DNA .....	24
4.2. Análise dos polimorfismos gênicos .....	24
4.3. Análise estatística .....	27
<b>5. RESULTADOS</b> .....	29
5.1. Análise populacional .....	29
5.2. Frequência alélica e genotípica .....	31
5.2.1 Polimorfismos do complexo do gene IL1B .....	31
5.2.2. Polimorfismos do gene IL6 .....	32

5.2.3. Polimorfismos do gene TNF .....	32
5.3. Incidência e gravidade da mucosite oral nos pacientes submetidos ao TCTH.	37
5.4. Relação entre a gravidade da mucosite oral e as características clínicas.	37
5.5. Correlação dos polimorfismos nos genes <i>IL1B</i> , <i>IL1RN</i> , <i>IL6</i> e <i>TNFA</i> com a gravidade da mucosite oral em pacientes submetidos ao TCTH.	40
5.6. Relação dos polimorfismos nos genes <i>IL1B</i> , <i>IL1RN</i> , <i>IL6</i> e <i>TNFA</i> com a sobrevida e a situação final pós-TCTH.	43
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>72</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) é uma modalidade terapêutica utilizada no tratamento de diversas doenças onco-hematológicas (Pasquini, 2001). Pacientes submetidos ao TCTH geralmente desenvolvem complicações bucais resultantes da citotoxicidade das drogas utilizadas durante o regime de condicionamento. Dentre essas, a mucosite oral é a mais frequente e está associada ao aumento da morbidade, aumento dos riscos de infecções sistêmicas, e também está relacionada ao maior tempo de internação dos pacientes, com conseqüente aumento do custo do tratamento (Bellm *et al.*, 2002). Além disso, a literatura mostra que a ocorrência de mucosite ulcerativa grave está associada com a redução da sobrevida em 100 dias dos pacientes submetidos ao TCTH (Sonis *et al.*, 2001).

A fisiopatologia da mucosite é complexa, e envolve a ativação de citocinas pró-inflamatórias e fatores de transcrição, em particular o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Esse fator de transcrição é ativado em resposta às drogas utilizadas durante o regime de condicionamento, e leva à produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a interleucina 1 (IL1), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF). A superprodução destas interleucinas resulta em danos ao epitélio e tecido conjuntivo, levando à perda da integridade tecidual, culminando com o quadro clínico denominado mucosite (Sonis *et al.*, 2002).

São vários os fatores que podem influenciar no desenvolvimento e na gravidade da mucosite oral. Fatores genéticos, como os polimorfismos gênicos, foram descritos como adjuvantes na etiopatogenia da mucosite. Alguns trabalhos na literatura relacionaram o polimorfismo na enzima 5,10 metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) com mucosite oral grave, em pacientes submetidos ao TCTH (Ulrich *et al.*, 2001; Gemmati *et al.*, 2007; Tantawy *et al.*, 2010). O único estudo que analisou a relação de polimorfismos em genes de citocinas com a mucosite oral demonstrou que apenas o polimorfismo no gene *TNF* estava associado com esta complicação (Sakamoto *et al.*, 2006). Contudo, esse trabalho foi realizado em pacientes com tumores sólidos e, conseqüentemente, com esquemas terapêuticos

distintos daqueles utilizados no TCTH. Os polimorfismos nos genes de citocinas também têm sido associados com outras complicações pós-TCTH, como a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), recidiva da doença de base e aumento na mortalidade (Ishikawa *et al.*, 2002; MacMillan *et al.*, 2003; Visentainer *et al.*, 2008).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos polimorfismos nos genes *IL1B*+3953C/T, *IL1B*-511C/T, *IL1RN* VNTR, *TNF*-308G/A e *IL6*-174G/C na mucosite oral pós-TCTH. Adicionalmente, foi analisada a relação destes polimorfismos com a situação final e sobrevida pós-transplante de células-tronco hematopoéticas.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. MUCOSITE ORAL**

A mucosite é uma complicação frequente, associada com os regimes de quimioterapia e radioterapia em pacientes com câncer ou que vão ser submetidos ao transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) (Scully *et al.*, 2006).

Os pacientes que se submetem ao TCTH geralmente desenvolvem esta complicação em consequência da citotoxicidade das drogas utilizadas durante o regime de condicionamento (Montserrat *et al.*, 2007).

A mucosite pode ocorrer em todo trato alimentar (Keefe, 2006; Peterson *et al.*, 2006), e ser a causa de variado espectro de sinais e sintomas clínicos, que pode incluir, ulcerações orais doloridas, dor abdominal, vômito e diarreia (Pico *et al.*, 1998; Keefe *et al.*, 2006). A literatura tem demonstrado também que outras superfícies mucosas podem apresentar essa complicação, como a mucosa gênito-urinária e a respiratória (Keefe *et al.*, 2007).

#### **2.1.1. Apresentação clínica e classificação**

Os sinais e sintomas iniciais da mucosite oral incluem, eritema, edema, sensação de queimação e aumento da sensibilidade a alimentos quentes e condimentados (McGuire *et al.*, 1993; Eisen *et al.*, 1997). Nas áreas eritematosas podem surgir placas esbranquiçadas descamativas que frequentemente progridem para ulcerações sangrantes e dolorosas (Sonis, 1998; Sonis *et al.*, 2001).

A fase de eritema se desenvolve tipicamente três dias após o transplante e persiste por aproximadamente três semanas (Eisen *et al.*, 1997). Embora o eritema seja observado com maior frequência no palato mole, também acomete a língua, a mucosa jugal e o assoalho (Peterson, 1984; Eisen *et al.*, 1997).

As ulcerações desenvolvem em mais de 75% dos pacientes e são tipicamente recobertas por membrana fibrino-purulenta. O surgimento das ulcerações ocorre em torno de sete a dez dias após o regime de condicionamento, aumentando o risco de sangramento, dor e comprometimento das funções orais

(Eisen *et al.*, 1997). As ulcerações afetam principalmente o assoalho da boca, a mucosa jugal, os lábios e a língua (Peterson, 1984; Eisen *et al.*, 1997). As áreas ulceradas podem ser exacerbadas por infecções secundárias, agravando o quadro de mucosite (Eisen *et al.*, 1997; Köstler *et al.*, 2001). A resolução das úlceras ocorre geralmente em duas a três semanas e coincide com a retomada na contagem de células brancas (Eisen *et al.*, 1997; Epstein *et al.*, 1999; Lalla *et al.*, 2008). As lesões orais comumente desaparecem sem deixar cicatrizes a menos que a mucosite seja complicada por infecções secundárias (Köstler *et al.*, 2001).

A mucosite oral pode ser classificada segundo diferentes critérios, que podem ter influência direta no seu tratamento. As escalas mais utilizadas são as da Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization-WHO*, 1979), *National Cancer Institute Common Toxicity Criteria-NCICTC* (Trotti *et al.*, 2000), *Oral Mucositis Assessment Scale-OMAS* e *Radiation Therapy Oncology Group-RTOG (Acute Radiation Morbidity Scoring Criteria)*. Todas as classificações levam em consideração sinais e sintomas como dor, presença de eritema, ulceração, além da perda de função e capacidade de alimentação.

### **2.1.2. Consequências da mucosite oral**

A mucosite afeta a qualidade de vida dos pacientes, devido à dor, dificuldade de comunicação e alimentação (Ruescher *et al.*, 1998). Além disso, os riscos de febre e infecção sistêmica aumentam em pacientes com essa complicação (Classen *et al.*, 1990; Rapoport *et al.*, 1999; Scully, 2003). No período de mielossupressão, que ocorre durante o TCTH, a mucosite predispõe a septicemia, infecções bacterianas e fúngicas (Classen *et al.*, 1990; Rapoport *et al.*, 1999).

A mucosite oral também está associada com um maior período de internação hospitalar e redução da sobrevida após o transplante de células-tronco hematopoéticas (Sonis *et al.*, 2001). Adicionalmente, a presença de mucosite causa um aumento nos custos do tratamento, sendo que, receptores de TCTH que desenvolvem mucosite, necessitam de mais antibióticos, opióides e nutrição

parenteral quando comparados aos pacientes que não apresentam esta complicação (Scully, 2003).

### **2.1.3. Fisiopatologia da mucosite oral**

Historicamente, o efeito citotóxico direto da quimioterapia ou da radioterapia na camada basal do epitélio era visto como o principal mecanismo envolvido no desenvolvimento da mucosite oral (Spijkervet *et al.*, 1991; Stiff, 2001). Acreditava-se que em função da alta taxa de replicação celular, as células epiteliais eram particularmente vulneráveis aos efeitos danosos do tratamento antineoplásico. Com o desenvolvimento de estudos em modelos animais, a fisiopatologia da mucosite começou a ficar mais clara, demonstrando ser este um processo complexo que envolve todos os componentes da mucosa, incluindo além do epitélio, o tecido conjuntivo (Sonis *et al.*, 1990).

Estudos subsequentes revelaram que as células endoteliais são as primeiras a demonstrarem os danos causados tanto pela quimioterapia como pela radioterapia, antes mesmo de quaisquer sinais detectáveis no epitélio (Menendez *et al.*, 1998; Sonis *et al.*, 2002).

Em 1998, Sonis propôs um modelo de quatro fases para a descrição da fisiopatologia da mucosite (Sonis, 1998):

1. A fase inflamatória ou de reação vascular ocorre após a exposição aos agentes quimioterápicos e/ou a radioterapia. Nesta fase ocorre a liberação de citocinas inflamatórias, como a interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF), com exacerbação da resposta tecidual.

2. A fase epitelial se deve a uma resposta do epitélio as drogas utilizadas durante o tratamento. As células da mucosa em divisão são afetadas, levando a uma redução na renovação celular.

3. A fase ulcerativa é uma consequência da atrofia epitelial e é facilitada pelo atrito à mucosa oral.

4. A fase de cicatrização das lesões está relacionada com a retomada na renovação e diferenciação celular.

Em 2004, a mucosite passou a ser descrita como um complexo processo biológico, que ocorre em cinco fases (Sonis, 2004):

1. Fase da iniciação: essa fase ocorre imediatamente após a exposição às drogas citotóxicas e resulta em danos diretos aos componentes da mucosa pela produção de radicais livres de oxigênio (*reactive oxygen species*-ROS). Essas moléculas altamente reativas são produtos do metabolismo do oxigênio e podem causar danos celulares nos tecidos e vasos sanguíneos.

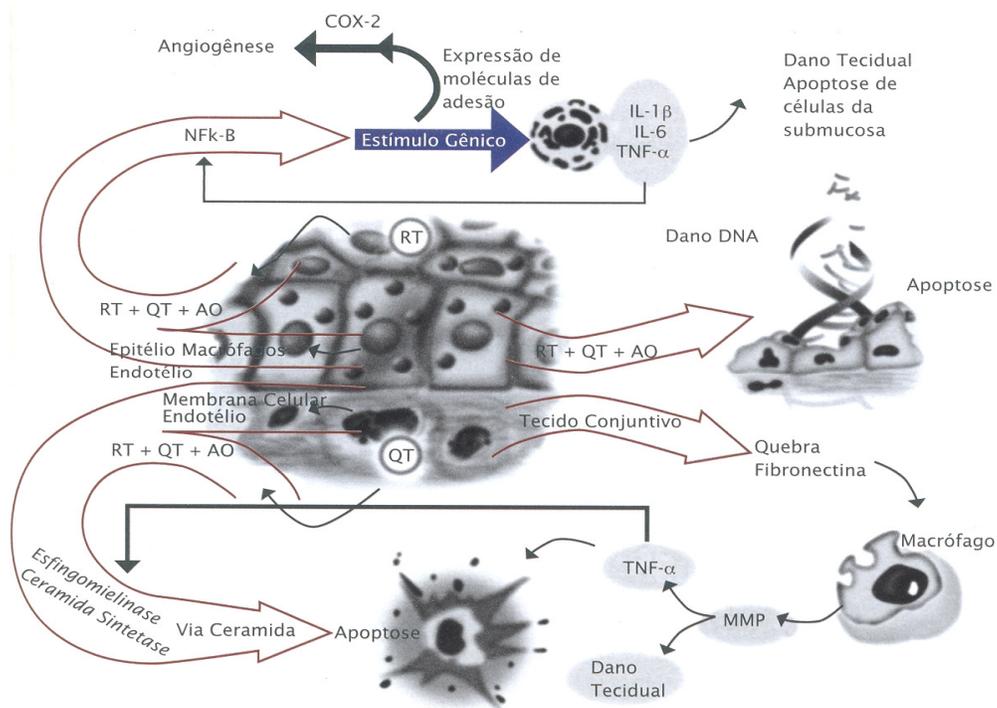
2. Fase da super-regulação via geração de mensageiros: nesta etapa ocorrem múltiplos eventos simultaneamente. Os radicais livres causam destruição do DNA levando a morte celular. Além disso, ocorre a ativação dos fatores de transcrição, em particular do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Esse fator de transcrição é ativado em resposta à quimioterapia e à radioterapia e é responsável pela super-regulação de cerca de 200 genes que possuem efeitos na integridade da mucosa, através da indução da morte celular e danos teciduais não limitados ao epitélio (Sonis *et al.*, 2004). A ativação do NF- $\kappa$ B resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), a interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e a interleucina 6 (IL-6) (Sonis *et al.*, 2002). A presença dessas substâncias foi demonstrada em mucosas e em amostras de sangue periférico de pacientes em tratamento antineoplásico (Hall *et al.*, 1995). Estas citocinas levam a danos no tecido conjuntivo e endotélio, através da sinalização epitélio-mesênquima e redução na oxigenação epitelial (Sonis, 2004). Outras proteínas biologicamente ativas, como a ciclooxigenase 2 (COX-2) são super-reguladas e iniciam uma cascata inflamatória levando à ativação de metaloproteinases de matriz, que potencializam os danos teciduais (Sonis *et al.*, 2002, Yasuda, 2006). As enzimas esfingomielinase e ceramida sintetase, que catalisam a síntese da ceramida são também ativadas. A via da ceramida está associada com apoptose das células da submucosa e da camada basal do epitélio. Além disso, a quebra da fibronectina leva a ativação dos macrófagos e à lesão tecidual subsequente que é mediada por metaloproteinases de matriz e produção adicional de TNF- $\alpha$  (Sonis, 2004).

3. Fase da sinalização e amplificação: nessa terceira fase, em consequência da liberação dos mediadores inflamatórios, ocorre uma série de *feedback* positivos que servem para amplificar e prolongar a destruição tecidual por meio dos seus efeitos nos fatores de transcrição e na via da ceramida. Desta forma ocorre estímulo gênico com aumento na produção de citocinas inflamatórias (Figura 1).

4. Fase ulcerativa: é resultante da ruptura do epitélio acompanhada por colonização bacteriana. Nessa fase, o paciente pode apresentar dor oral e possivelmente sintomas abdominais, aumentando assim, o risco de infecção sistêmica. O papel da colonização bacteriana no agravamento da mucosite se dá pela amplificação da produção de citocinas pró-inflamatórias, aumentando assim, os danos teciduais (Sonis, 1998). Foi demonstrado que a presença de colônias bacterianas na mucosa danificada estimula diretamente a expressão de NF- $\kappa$ B resultando na produção de citocinas (Sonis *et al.*, 2004).

5. Fase da cicatrização: também denominada de fase da restauração é iniciada pela ativação da matriz extracelular no processo de regeneração tecidual. Apesar da aparente cicatrização, estudos ultra-estruturais e histológicos evidenciam que as estruturas da mucosa permanecem alteradas por um longo período de tempo após o término do tratamento antineoplásico (Gibson *et al.*, 2006; Logan *et al.*, 2007).

Com o melhor entendimento da fisiopatologia da mucosite, novos tratamentos preventivos estão sendo desenvolvidos, com o objetivo de reduzir a gravidade e a duração desta complicação (Treister & Sonis, 2007).



**Figura 1.** Esquema da fisiopatologia da mucosite oral. Adaptado de Sonis *et al.*, 2004.

#### 2.1.4. Epidemiologia e fatores de risco

A mucosite oral pode ocorrer em cerca de 80% a 100% dos pacientes submetidos aos tratamentos chamados de “alto-risco” para o desenvolvimento de toxicidade oral, como a radioterapia na região de cabeça e pescoço e regimes de condicionamento pré-transplante de células-tronco hematopoéticas (Pico *et al.*, 1998; Keefe *et al.*, 2000).

A incidência de mucosite varia significativamente entre os diferentes regimes e modalidades de tratamento adotadas. As drogas que possuem maior capacidade de desencadear mucosite são: bleomicina, citarabina, metotrexato (MTX), fluorouracil, floxuridina, hidroxiuréia, vinblastina e vincristina (Burt *et al.*, 1998). Os pacientes em tratamento com fluorouracil e cisplatina desenvolvem mucosite em 90% dos casos (Chi *et al.*, 1995). Em contraste, asparaginase e carmustine estão associadas com uma baixa incidência desta complicação (Symonds, 1998). A radiação associada à quimioterapia aumenta os danos à

mucosa oral (Keefe *et al.*, 2004). Nos regimes de condicionamento que associam a radiação corporal total, as taxas de mucosite graus 3 e 4 são observadas em mais de 60% dos casos, já nos regimes sem radiação, as mesmas taxas são encontradas em 30-50% dos casos (Sonis *et al.*, 2004).

Apesar do regime de condicionamento ser o principal fator de risco relacionado com o desenvolvimento da mucosite, a presença desta complicação parece depender de outros fatores como: idade, gênero, raça, doença de base, fonte de células progenitoras, utilização de fatores de crescimento de medula, entre outros (Wardley *et al.*, 2000; Lalla *et al.*, 2008).

Um estudo descrito previamente demonstrou aumento na prevalência de mucosite em crianças, enquanto outros trabalhos, ao contrário, descreveram uma maior prevalência e gravidade da mucosite em pacientes mais velhos (Sonis *et al.*, 1978; Rocke *et al.*, 1993; Mc Carthy *et al.*, 1998). De forma similar, existem evidências conflitantes em relação ao papel do gênero sobre o risco de desenvolver mucosite, com alguns estudos demonstrando um aumento desta complicação em mulheres e outros uma diminuição ou falta de correlação com este fator (Rocke *et al.*, 1993; Zalcborg *et al.*, 1998; Vokurka *et al.*, 2006; Lalla *et al.*, 2008).

Sonis (1998) observou que pacientes da mesma idade, tendo o mesmo tipo de doença, condição bucal equivalente e recebendo a mesma dose e tipo de quimioterapia não desenvolviam mucosite na mesma frequência. Esse achado demonstrou que a variabilidade genética pode contribuir para diferenças na frequência e na gravidade da mucosite oral.

Tem sido relatado que variações genotípicas podem contribuir para a suscetibilidade individual aos efeitos secundários do tratamento antineoplásico (Coleman, 1999; Trenz *et al.*, 2002). Estima-se que fatores genéticos são responsáveis por 80% da variação entre pacientes submetidos a este tipo de tratamento (Turesson *et al.*, 2001).

Os polimorfismos gênicos estão associados com maior suscetibilidade aos danos causados pela quimioterapia (Gemmati *et al.*, 2007). Certos polimorfismos,

relacionados com variações no metabolismo enzimático de algumas drogas quimioterápicas, podem influenciar no desenvolvimento de toxicidades após o tratamento antineoplásico (Van Kuilenburg *et al.*, 2000; Gemmati *et al.*, 2007). Ulrich e colaboradores (2001) demonstraram que polimorfismo na 5,10 metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), enzima que metaboliza o folato, alvo de medicamentos como metotrexato (MTX), pode aumentar a gravidade da mucosite oral em pacientes tratados com MTX para prevenção de DECH após o TCTH.

Estudos anteriores relataram que os níveis de citocina no soro aumentam durante a quimioterapia e que a produção dessas substâncias é influenciada por polimorfismos gênicos (Ferrà *et al.*, 1998; Higuchi *et al.*, 1998). Sakamoto *et al.*, (2006) avaliaram a relação de polimorfismos em genes de citocinas e a toxicidade após quimioterapia com 5-fluorouracil e cisplatina em 100 pacientes tratados para neoplasia gastrointestinal. Os autores constataram através de uma análise multivariada, que este tipo de variação genética pode ser um importante fator preditivo de toxicidade. Os resultados deste trabalho demonstraram uma significativa correlação entre o genótipo *TNFA*-1031TT e a presença de mucosite oral. Conforme este estudo, polimorfismos em genes de citocinas podem representar um fator de risco adicional para o desenvolvimento desta complicação. Assim, estudos adicionais são importantes para confirmar o papel dos polimorfismos em genes de citocinas na mucosite oral.

## **2.2. CITOCINAS E POLIMORFISMOS GÊNICOS**

As citocinas são proteínas ou glicoproteínas solúveis que controlam ou modulam as atividades das células alvo, através da ligação com receptores específicos (Liles & Van Voorhis, 1995; Vilcek, 2003; Smith & Steve, 2009). Estas substâncias são produzidas principalmente pelos macrófagos e leucócitos, mas muitas citocinas são também sintetizadas por outras células, como as endoteliais e os fibroblastos (Abbas & Pober, 2000).

As citocinas podem ser classificadas segundo suas ações ou propriedades em: pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias (Remick, 2003). As citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) ativam o processo inflamatório, auxiliando na eliminação de patógenos e na resolução da inflamação. Já as citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ ) reduzem a resposta inflamatória por meio da diminuição das citocinas pró-inflamatórias e da supressão da ativação de monócitos (Remick, 2003).

Os níveis de citocinas basais e estimulados variam entre os indivíduos, e tanto fatores genéticos quanto ambientais influenciam esse padrão de secreção. Os polimorfismos em regiões promotoras dos genes das interleucinas podem causar diferenças interindividuais na produção dessas substâncias (Wilson *et al.*, 1997; Pravica *et al.*, 1999; Visentainer *et al.*, 2008). Um grande número de polimorfismos gênicos tem sido identificado nos genes das citocinas, sendo que vários estudos demonstram associação destes polimorfismos com um efeito protetor ou uma maior predisposição ao desenvolvimento de doenças (Tolusso *et al.*, 2006; Sáenz-López *et al.*, 2008; Guerreiro *et al.*, 2009).

Polimorfismo gênico é definido como a presença de múltiplos alelos para um determinado gene, devido a alterações na sequência de nucleotídeos. Os polimorfismos diferem da mutação pela frequência em que aparecem na população, que deve ser maior que 1% (Nelson, 2001; Vandebroek & Goris, 2003).

Os polimorfismos podem ocorrer de três formas principais: polimorfismos de troca de nucleotídeo único, número variável de repetições em tandem ou microssatélites.

Os polimorfismos de troca de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms*-SNP) representam uma variação na sequência de DNA que ocorre quando um único nucleotídeo difere entre os membros de uma mesma espécie. Este tipo de polimorfismo é mais frequente que o VNTR e o microssatélite, e apresenta-se uniformemente distribuído por todo o genoma. Os SNPs podem

afetar a transcrição gênica, a estabilidade do RNA e até mesmo a codificação de proteínas (Takashiba & Naruishi, 2000; Thompson *et al.*, 2002; Nielsen, 2004).

O número variável de repetições em tandem (*variable number of tandem repeats*-VNTR) é uma classe especial de polimorfismos, e resulta da inserção em tandem de múltiplas cópias de uma sequência de DNA com 10 a 100 pares de bases de tamanho.

Os polimorfismos de microssatélites são trechos de DNA que consistem de unidades repetidas de dois, três ou quatro nucleotídeos (Thompson *et al.*, 2002).

A grande maioria dos polimorfismos encontrados em genes de citocinas e seus receptores estão localizados em regiões promotoras, regiões intrônicas ou em regiões 3' do gene, regiões estas não traduzidas, mas que mesmo assim podem influenciar na expressão ou na função de um gene (Jin *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005).

### **2.2.1. Interleucina 1 (IL-1)**

Existem três membros da família da IL-1, a IL-1 $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  e a IL-1RA (antagonista do receptor). Dois tipos de receptores são encontrados em humanos: o tipo I (IL-1RI), que tem a capacidade de tradução do sinal da IL-1, e o tipo II (IL-1RII) que não traduz sinal de ligação, comportando-se como um “depósito” de IL-1 $\beta$  (Dinarello, 1996; Dinarello, 1997).

A IL-1 $\beta$  é codificada por um gene de 7.5 Kb, com 7 éxons, localizado no cromossomo 2q13, próximo aos genes que codificam as IL-1 $\alpha$  e IL-1RA (Shirakawa *et al.*, 1993; Nicklin *et al.*, 1994). Juntamente com o TNF, a IL-1 $\beta$  exerce uma importante função na ativação da via do NF- $\kappa$ B, fator de transcrição associado com a fisiopatologia da mucosite (Dinarello, 2000; Sonis 2004). Além disso, também foi demonstrado que IL-1 $\beta$  exerce um importante papel na fase de cicatrização desta complicação (Blijlevens & Sonis, 2007; Logan *et al.*, 2007).

Vários polimorfismos bialélicos têm sido descritos para o gene *IL1B* (Chen *et al.*, 2006; Smith & Humphries, 2009). Os mais estudados são o *IL1B*-511C/T

localizado na região promotora do gene, e o *IL1B+3953C/T* localizado no quinto éxon, e renomeado posteriormente por Bensen *et al.* (2003) como 4336C/T (di Giovine *et al.*, 1992; Pociot *et al.*, 1992). O alelo polimórfico com T ao invés de C na posição -511 do gene da *ILB* tem sido associado com um aumento na produção de IL-1 $\beta$  (Smith & Humphries, 2009). Com relação ao polimorfismo no gene *IL1B+3953C/T*, foi previamente demonstrado que macrófagos derivados de indivíduos com o genótipo 3953TT tendem a apresentar uma maior produção de IL-1 $\beta$  quando comparados aos de indivíduos com o genótipo 3953CC (Pociot *et al.*, 1992). Adicionalmente, foi demonstrado que os níveis de IL-1 $\beta$  no soro são maiores com o genótipo 3953TT. O polimorfismo no gene *IL1B+3953C/T* tem sido associado com várias doenças imunes e infecciosas (Kornman *et al.*, 1997; Gore *et al.*, 1998; Tolusso *et al.*, 2006).

A IL-1RA é uma citocina anti-inflamatória transcrita pelo gene *IL1RN*. Este gene contém quatro éxons, embora três variantes intracelulares tenham sido previamente identificadas, contendo cinco ou seis éxons (Smith & Humphries, 2009). A IL-1RA está estruturalmente relacionada com a IL-1 $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , e compete com essas moléculas pela ligação aos receptores de superfície da IL-1. Assim, a IL-1RA atua como um inibidor competitivo, modulando os efeitos danosos da interleucina 1 beta. (Tarlow *et al.*, 1993). A expressão da proteína IL-1RA tem sido amplamente investigada em várias doenças humanas, não apenas nas doenças inflamatórias e imuno mediadas, mas também nas neoplasias malignas (Dinarello, 1998; Arend, 2002; Witkin *et al.*, 2002; Sakamoto *et al.*, 2006).

O gene *IL1RN* possui um importante polimorfismo relacionado com o número de repetições de uma sequência de 86 pares de bases (86pb) na região do íntron 2. O número de repetições varia entre as diferentes etnias e populações geográficas (Hu *et al.*, 2006). Seis padrões já foram definidos: alelo 1 (*IL1RN\*1*) com 4 repetições, alelo 2 (*IL1RN\*2*) com 2 repetições, alelo 3 (*IL1RN\*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 de

fragmento de repetição (Tarlow *et al.*, 1993; Vamvakopoulos *et al.*, 2002). O número de repetições apresenta uma importante relevância funcional, uma vez que esta sequência apresenta sítios potenciais de ligação para fatores de transcrição (Tarlow *et al.*, 1993).

Em um estudo realizado previamente, Danis *et al.* (1995) avaliaram o efeito do polimorfismo *ILRN* VNTR sobre a secreção de IL-1RA por monócitos derivados de amostras de 34 indivíduos. Neste estudo o alelo *IL1RN\*2* foi associado com um aumento na secreção de IL-1RA e uma menor produção de IL-1 $\alpha$ . Os autores não encontram associação do genótipo *IL1RN* com os níveis de IL-1 $\beta$ . Entretanto, um estudo utilizando modelo *in vitro*, demonstrou que o alelo *IL1RN\*2* estava relacionado com um aumento na secreção desta interleucina.

### **2.2.2. Interleucina 6 (IL-6)**

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica produzida por uma ampla variedade de células como: linfócitos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e algumas células tumorais (Kishimoto *et al.*, 1995; Naka *et al.*, 2002). Esta citocina é responsável pela diferenciação terminal de células B em plasmócitos e pelo aumento na secreção de imunoglobulinas específicas pelos linfócitos B. Também foi demonstrado que a IL-6 estimula a proliferação de plasmócitos. Assim, esta citocina está diretamente relacionada à produção de anticorpos e a resposta imune humoral (Kishimoto *et al.*, 1995; Barton, 1997).

A produção de IL-6 é induzida por TNF, que de forma oposta, é fortemente inibido por IL-6, formando um “*feedback*” negativo que inibe a ativação da cascata de citocinas pró-inflamatórias (Ferrà *et al.*, 1998). Desta forma, a IL-6 apresenta tanto efeitos pró-inflamatórios como anti-inflamatórios (Moller & Villiger, 2006). Tem sido demonstrado que a IL-6 pode induzir a ativação do NF- $\kappa$ B, sendo através desse fator de transcrição, que esta interleucina exerce seus efeitos biológicos, bem como a indução de doenças inflamatórias (Wang *et al.*, 2003).

A regulação da excreção de IL-6 pode estar associada a estímulos indutores desencadeados pelo TNF e IL-1 ou por controles genéticos como

polimorfismos em sequências gênicas. O gene da interleucina 6 humana (*IL6*) contém quatro éxons e quatro íntrons e está mapeado no braço longo do cromossomo 7 (região 7p21) (Fishman *et al.*, 1998). Um dos polimorfismos mais estudados no gene da IL-6 foi descrito por Olomolaiye *et al.*, 1998. O polimorfismo *IL6-174G/C* localiza-se na região promotora do gene *IL6* e envolve a troca de uma guanina (G) por uma citocina (C) (Fishman *et al.*, 1998). Tem sido demonstrado que o alelo *IL6-174G* está relacionado com maiores níveis de expressão protéica. Tanto indivíduos homozigotos como heterozigotos para alelo *IL6-174G* apresentam maior atividade transcricional do gene *IL6*, bem como, maiores níveis de expressão de IL-6 no plasma, quando comparados com indivíduos homozigotos para o alelo *IL6-174C* (Fishman *et al.*, 1998). Contudo outros estudos relacionam o alelo *IL6-174C* a maiores níveis de expressão de IL-6 (Brull *et al.*, 2001).

O polimorfismo do gene da IL-6 está associado a várias doenças, como, diabetes mellitus tipo II, mieloma múltiplo, carcinoma de mama, entre outras (Mazur *et al.*, 2005; Huth *et al.*, 2006; Slattery *et al.*, 2008). O genótipo *IL6-174GG* foi associado com doença periodontal mais agressiva em uma população brasileira (Trevilatto *et al.*, 2003). Adicionalmente o polimorfismo *IL6-174G/C* tem sido relacionado com DECH (doença do enxerto contra o hospedeiro), sendo que pacientes portadores do alelo G e que receberam transplante de doadores homozigotos para este alelo desenvolveram DECH aguda com maior frequência (Cavet *et al.*, 2001).

### **2.2.3. Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )**

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pleiotrópica que exerce importantes atividades pró-inflamatórias (Carswell *et al.*, 1975). Esta citocina é codificada pelo gene *TNF*, que está localizado junto à região de codificação do complexo de histocompatibilidade maior (MHC-região classe III) (Beutler & Cerami, 1986). O TNF- $\alpha$  é secretado na fase inicial do processo inflamatório e está associado com a ativação de outras interleucinas, como a IL-1, a IL-6, além de outros mediadores (Makhatadze, 1998;

Hoffstedt *et al.*, 2000). O TNF- $\alpha$  é produzido principalmente por monócitos e macrófagos, embora outras células como, linfócito B e T também secretem esta citocina (Vassali, 1992).

Existem dois receptores para o TNF, o TNF-RI que está expresso em todos os tipos celulares, e o TNF-RII expresso somente em células imunes ou endoteliais. A interação do TNF com TNF-RI é responsável por vários eventos celulares incluindo a ativação de caspases que leva a apoptose, bem como, a ativação de NF- $\kappa$ B. A sinalização via TNF-RII é menos caracterizada, mas sabe-se que esse receptor não está associado a apoptose (Mocellin *et al.*, 2005).

Clinicamente, tem sido demonstrado um aumento de TNF no soro de pacientes submetidos ao TCTH, sendo que esse evento precede o desenvolvimento de complicações relacionadas ao transplante (Takahashi *et al.*, 2000; Logan *et al.*, 2007). Adicionalmente, a inibição de TNF utilizando agentes como o pentoxifileno, droga que inibe a síntese de citocinas, reduz a presença de toxicidades não hematológicas relacionadas ao TCTH (Bianco *et al.*, 1991). Com relação à mucosite, vários estudos em modelo animal e humano têm demonstrado uma redução na ocorrência e gravidade da mucosite após o tratamento com inibidores de TNF (Bianco *et al.*, 1991; Ferrà *et al.*, 1997). Além disso, tem sido relatado que isolados de *Streptococcus viridans* são capazes de induzir a produção de TNF por macrófagos em modelo murino. Como essas bactérias são comensais na flora do trato aerodigestivo, a indução de TNF por esses microorganismos parece ser importante na fase de ulceração da mucosite, resultando em maiores danos, em função da produção adicional de citocinas pró-inflamatórias (Orlicek *et al.*, 1997; Lima *et al.*, 2005).

Devido ao importante papel do TNF como citocina pró-inflamatória, múltiplos polimorfismos de troca de nucleotídeo foram estudados no gene *TNF*, incluindo os localizados nas posições: -238, -308, -376, -857, -863, -1031, +252 e +489 (Smith & Humphries, 2009). O polimorfismo mais comumente estudado no gene *TNF* é o -308G/A, também conhecido como TNF1/2. Este SNP está localizado na região promotora do gene na posição -308, e define dois alelos

possíveis. O *TNF-308A1* que apresenta uma guanina (G), forma mais frequente, e o *TNF-308A2* que possui uma adenina (A) forma menos frequente. O genótipo menos frequente (*TNF-308A2*) parece estar associado a uma maior atividade, levando a aumento dos níveis séricos de  $TNF-\alpha$  frente a estímulos (Wilson *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 2000; Smith & Humphries, 2009).

O polimorfismo *TNF-308G/A* tem sido associado com a ocorrência e/ou predisposição a várias enfermidades, como, câncer de pulmão, lúpus eritematoso sistêmico, doença periodontal, entre outras (Zúñiga *et al.*, 2001; Qian *et al.*, 2002; Shih *et al.*, 2006). Sakamoto *et al.* (2006) demonstraram uma significativa correlação entre o polimorfismo no gene *TNF-1031* e a mucosite oral. Contudo, são necessários estudos adicionais para confirmar a relação dos polimorfismos no gene *TNF* com esta complicação.

### **2.3. TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS**

O transplante de células-tronco hematopoéticas é uma modalidade terapêutica que visa enxertar células progenitoras hematopoéticas, com o objetivo de corrigir um defeito quantitativo ou qualitativo da medula óssea (Pasquini, 2001).

O TCTH tem sido utilizado no tratamento de doenças hematológicas malignas e não-malignas, e também no tratamento de tumores sólidos, como demonstra a Tabela 1 (Pasquini, 2001).

#### **2.3.1. O TCTH pode ser classificado:**

Quanto ao tipo de doador em:

- *Alogênico*: entre indivíduos diferentes, aparentados ou não.
- *Singênico*: entre indivíduos geneticamente idênticos (gêmeos univitelinos).
- *Autólogo*: a fonte de obtenção de células-tronco é o próprio paciente (Dulley, 1996; Forester, 1998; Pasquini, 2001).

Quanto ao grau de parentesco em:

- *Aparentando*: entre parentes de primeiro grau.

- *Não aparentado*: não há vínculo familiar de primeiro grau, mas há semelhanças no HLA (antígenos leucocitários humanos) (Pasquini, 2001).

Quanto à fonte de células progenitoras em:

- *Medula óssea*: a coleta é realizada por aspiração na crista ilíaca.
- *Sangue periférico*: mobilização de células progenitoras a partir do sangue periférico através da administração de fatores de crescimento ao doador.
- *Cordão umbilical*: através da coleta de sangue diretamente no cordão umbilical (Pasquini, 2001).

**Tabela 1.** Indicações do TCTH. Adaptado de Pasquini, 2001.

<b>Doenças hematológicas malignas</b>	<b>Doenças hematológicas não-malignas</b>	<b>Tumores sólidos</b>
Leucemia mielóide	Anemia aplástica severa	Tumor de testículo
Leucemia linfocítica	Anemia de Fanconi	Tumor de mama
Síndrome mielodisplásica	Hemoglobinopatias	Tumor de ovário
Linfoma não-Hodgkin	Talassemia tipo maior	Tumor pulmonar de pequenas células
Linfoma de Hodgkin	Aplasia congênita de série vermelha	Neuroblastoma
Mieloma múltiplo	Hemoglobinúria paroxística noturna	Tumor de sistema nervoso central
	Imunodeficiência severa combinada	Outros tumores
	Osteopetrose	
	Síndrome de Wiskott-Aldrich	

### **2.3.2. Regime de condicionamento**

O condicionamento é realizado previamente ao TCTH através de altas doses de quimioterápicos isolados ou em diversas combinações, podendo ser ainda associado à irradiação corporal total (ICT) (Gratwohl, 2008).

Este procedimento tem como objetivo, estabelecer um grau de imunossupressão suficiente para que o enxerto não seja destruído pelas células imunocompetentes do receptor. Além disso, destruir um número máximo de células malignas residuais e células viáveis da medula do receptor, criando espaço onde a nova medula possa proliferar (Ortega & Neves, 1996).

As drogas utilizadas nesse período são semelhantes às utilizadas nos tratamentos para diversas doenças neoplásicas, mas com dosagens diferentes. Outras drogas, como a ciclosporina, metotrexate e prednisona, são utilizadas na prevenção da DECH (Pasquini, 2001).

### **2.3.3. Complicações do TCTH**

O TCTH não está isento de complicações que podem deixar lesões ou apresentar consequências fatais (Pasquini, 2001).

A maioria das complicações ocorre durante os primeiros quatro meses após o transplante devido a alterações em múltiplos órgãos, seja pela toxicidade do condicionamento, por infecções, por distúrbios imunológicos, por alterações no sistema hematopoético ou pelo uso intenso de medicamentos (Dulley, 1996).

Uma importante complicação associada ao TCTH é a doença do enxerto contra o hospedeiro. Esta enfermidade apresenta-se como uma desordem imunológica multi-sistêmica, que ocorre devido a diferenças nos antígenos de histocompatibilidade maior e menor entre as células enxertadas e as células do hospedeiro (Billingham, 1966). Dos pacientes com DECH crônica, cerca de 80% desenvolvem manifestações orais, que se apresentam principalmente como, alterações liquenóides, eritema, áreas de atrofia, hiperqueratose e ulceração (Sánchez-Garcia *et al.*, 2006).

A mucosite oral é considerada a complicação mais debilitante, e tem sido observada em mais de 75% dos pacientes submetidos ao transplante mieloablativo de células-tronco hematopoéticas (Cutler *et al.*, 2005).

Em resumo, os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da mucosite oral são complexos e ainda não foram completamente elucidados. Sabe-se que as citocinas inflamatórias exercem um importante papel na fisiopatologia desta complicação, uma vez que estas substâncias têm sido demonstradas na mucosa e sangue periférico de pacientes durante o tratamento antineoplásico (Sonis, 2004). Além disso, estudos demonstram que indivíduos em condições clínicas similares, não desenvolvem mucosite com a mesma frequência, indicando que esta complicação é também influenciada por fatores genéticos (Sonis, 1998). Os polimorfismos gênicos representam um mecanismo pelo qual os indivíduos podem mostrar alterações interindividuais. Polimorfismos em genes de citocinas têm sido associados com complicações pós-TCTH, como a doença do enxerto contra o hospedeiro e menor sobrevida (MacMillan *et al.*, 2003; Dickinson *et al.*, 2007). Contudo, pouco se sabe sobre a influência dos referidos polimorfismos na gravidade da mucosite oral associada ao TCTH.

### 3. PROPOSIÇÃO

1. Identificar a frequência dos polimorfismos nos genes *IL1B*-511C/T, *IL1B*+3953C/T, *IL1RN* VNTR íntron 2, *TNF*-308G/A e *IL6*-174G/C em um grupo de pacientes submetidos ao TCTH.
2. Determinar a influência dos polimorfismos nos genes *IL1B*, *IL1RN*, *IL6* e *TNFA* na mucosite oral pós-TCTH.
3. Verificar a influência dos polimorfismos nos genes *IL1B*, *IL1RN*, *IL6* e *TNFA* na sobrevida e situação final pós-TCTH.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Pacientes e Amostras

Este foi um estudo retrospectivo, realizado a partir das amostras de DNA, provenientes do Laboratório de Análise Molecular de Polimorfismos do Hemocentro-UNICAMP. Foram utilizadas 55 amostras de DNA de pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoéticas no período de 1998-2008, na Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

Os dados referentes ao nome, sexo, idade, história familiar, história pregressa, diagnóstico da doença de base, fonte de células progenitoras, regimes de condicionamento foram obtidos a partir de prontuários dos pacientes e da Central de Análise de Dados e Estatística (CADE) do Centro de Hematologia e Hemoterapia da UNICAMP-Hemocentro da UNICAMP.

Em relação à mucosite oral, os dados foram resgatados de prontuários dos pacientes ou obtidos no sistema informatizado do Hemocentro da UNICAMP. A avaliação da presença e gravidade da mucosite oral foi realizada durante o período de TCTH. A cavidade oral dos pacientes foi avaliada diariamente por médicos e residentes da Unidade. As avaliações eram realizadas no leito do paciente sob luz artificial e com auxílio de espátulas de madeira. A mucosite oral foi graduada segundo a escala de graduação de mucosite oral da Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization-WHO*), como visto na Tabela 2.

Os pacientes receberam adequação bucal e instruções de higiene oral previamente ao TCTH. Além disso, todos os pacientes receberam antibioticoterapia/profilaxia durante o período de internação para o transplante, que faz parte do protocolo do Serviço de TCTH, visando prevenir disseminação hematogênica de qualquer foco de infecção.

Os experimentos deste estudo foram realizados de acordo com as normas relativas à ética em pesquisa envolvendo seres humanos, deliberação do Comitê

de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP (processo número 682/2008) em Anexo.

**Tabela 2.** Graus de toxicidade da mucosite oral de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1979).

Grau 0	Grau 1 (leve)	Grau 2 (moderado)	Grau 3 (grave)	Grau 4 (muito grave)
Ausente	Dor leve, eritema	Eritema oral, úlceras e intolerância à ingestão de alimentos sólidos	Úlceras, somente ingestão de alimentos líquidos	Alimentação oral impossível

#### 4.1.1. Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo os pacientes submetidos ao TCTH alogênico e autólogo, cujas amostras de sangue puderam ser resgatas do Laboratório de Análise Molecular de Polimorfismos do Hemocentro-UNICAMP. Dentro desse critério foram selecionados aqueles pacientes com sobrevida superior a um mês após o transplante. Nos casos em que os pacientes fizeram mais de um TCTH, foram analisados apenas os dados do primeiro transplante. Foram excluídos os pacientes cujas amostras de DNA eram insuficientes para análise ou estavam degradadas. Também foram excluídas as amostras de pacientes submetidos ao transplante não mieloablativo. Além disso, não foram analisadas as amostras de pacientes cujos prontuários não estavam devidamente preenchidos ou nos quais informações com relação à mucosite oral não puderam ser avaliadas.

#### 4.1.2. Obtenção das amostras de DNA

O DNA genômico foi extraído de amostras de sangue periférico coletadas no período pré-TCTH para futura análise de quimerismo. Das amostras de DNA, extraídas através de reagentes comerciais para purificação de DNA (GFX, Amersham PHarmacia, Biotech EUA), foram obtidas alíquotas de 15µl para o estudo dos polimorfismos nos genes *IL1B*-511C/T, *IL1B*+3953C/T, *IL1RN* VNTR íntron 2, *IL6*-174G/C e *TNF*-308G/A.

#### 4.2. Análise dos polimorfismos gênicos

As regiões gênicas de interesse foram amplificadas a partir de amostras de DNA genômico através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando um termociclador automático (PTC 100 Peltier Thermal Cyclor, MJ Research, Inc MA, EUA). Para a identificação dos polimorfismos de nucleotídeo único foi utilizada a técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP), na qual, os fragmentos amplificados foram digeridos por enzimas de restrição para a identificação dos alelos. Para o polimorfismo do gene *IL1RN* VNTR não foi necessária a digestão por enzima de restrição, pois o produto de PCR permitia a visualização dos alelos, que apresentavam tamanhos diferentes de acordo com o número de repetições do fragmento de 86pb.

As reações de PCR foram realizadas com volume final de 30µl, contendo 0,5µg de DNA genômico, 1mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 3µl de tampão da enzima polimerase (10mM Tris pH 8.5), 1,2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3µM de cada *primer* e 2U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen). As sequências de *primers*, que amplificavam as regiões gênicas de interesse, foram delineadas utilizando o programa “Amplify 1.2<sup>®</sup>” (Universidade de Wiscosin, Madison, EUA). Os *primers* foram checados quanto a sua especificidade, comparando-os com todas as sequências já identificadas presentes no “*Gene Bank*” (NCBI-*National Center for Biotechnology Information*-NIH, EUA-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). As sequências de *primers* e

enzimas de restrição utilizadas para a análise dos polimorfismos estão descritas na Tabela 3.

#### ***Análise do polimorfismo IL1B-511C/T***

Para a amplificação do DNA foram utilizados os seguintes *primers*: **5'-TGGCATTGATCTGGTTCATC-3'** e **5'-GTTTAGGAATCTTCCCACCTT-3'**. O protocolo utilizado foi: 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. Amplificou-se um fragmento de 304 pb da região promotora do gene *IL1B*. Após a reação de PCR o produto final da amplificação foi digerido com 6 unidades (U) da enzima *AvaI* (BioLabs, New England) a 37°C por 12 horas. Os fragmentos foram visualizados em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio (BE) (Bioque *et al.*, 1995; Hurme *et al.*,1998). A digestão produziu dois de fragmentos de 190pb e de 114pb que correspondiam ao alelo 1 (-511C) ou um único fragmento 304pb que correspondia ao alelo 2 (-511T).

#### ***Análise do polimorfismo IL1B+3953C/T***

A região que contém o referido polimorfismo está localizada no éxon 5 do gene *IL1B* na posição +3953C/T. Para a amplificação desta região foram utilizadas as seguintes sequências de *primers*: **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 da PCR foi digerido utilizando-se 10 U de *TaqI* (BioLabs, New England) a 65°C durante 12 horas. Os fragmentos foram visualizados em gel de agarose a 3% com BE. Esta digestão produziu 2 fragmentos de 135pb e 114pb (alelo 1, +3953C) ou único fragmento de 249pb (alelo 2, +3953T) (Bioque *et al.*, 1995; Hurme *et al.*,1998).

### **Análise do polimorfismo IL1RN VNTR (Íntron 2)**

A região no íntron 2 do gene *IL1RN* foi amplificada utilizando os seguintes *primers*: **5'-CTCAGCAACACTCCTAT-3'** e **5'-TCCTGGTCTGCAGGTAA-3'** previamente descritos (Tarlow *et al.*, 1993) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1min, 56°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).

### **Análise do polimorfismo IL6-174G/C**

Um par de *primers* foi utilizado para amplificação de um fragmento da região promotora do gene *IL6-174G/C*: **5'-ATGCCAAAGTGCTGAGTCAC-3'** e **5'-TCTTTGTTGGAGGGTGAGGG-3'**. A amplificação foi realizada com o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 94°C por 5min, seguida de 35 ciclos constituídos por desnaturação (94°C por 60s), anelamento (55°C por 60s) e extensão (72°C por 50s) além de uma extensão final a 72°C por 7min. O produto da PCR foi digerido utilizando a enzima de restrição *NlaIII* (BioLabs, New England) (4 UI) a 37°C por 12 horas. A digestão foi evidenciada em gel de agarose a 3% com BE. A presença do alelo 1 (-174G) produziu um fragmento de 208bp e do alelo 2 (-174C) dois fragmentos de 123 e 85bp cada.

### **Análise do polimorfismo TNFA-308G/A**

Foram utilizados dois *primers* para amplificação do 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, 55°C por

1min e 72°C por 30s, finalizando com extensão a 72°C por 7min. Após digestão com 5 UI de *NcoI* (BioLabs, New England) a 37°C durante 12 horas, o produto da digestão foi identificado em gel de agarose a 4% com BE. O alelo 1 (*TNF-308G*) produziu dois fragmentos de 87bp e 20bp e o alelo 2 (*TNF-308A*) um fragmento único de 107bp.

**Tabela 3.** Sequências de *primers* e enzimas de restrição utilizadas para as análises dos polimorfismos.

Genes	<i>Primers</i>	Enzima de restrição
<i>IL1B</i> -511 (C/T) <sup>1</sup> rs 16944	5'-TGGCATTGATCTGGTTCATC-3' 5'-GTTTAGGAATCTTCCCACTT- 3'	<i>Ava I</i> 37°C/12h
<i>IL1B</i> +3953 (C/T) rs 1143634	5' -GTTGTCATCAGACTTTGACC-3' 5' -TTCAGTTCATATGGACCAGA- 3'	<i>Taq I</i> 65°C/12h
IL1RN (intron 2) rs 419598	5'-CTCAGCAACACTCCTAT-3' 5' -TCCTGGTCTGCAGGTAA- 3'	-
<i>IL6</i> -174 (G/C) rs 1800795	5' -ATGCCAAAGTGCTGAGTCAC-3' 5' -TCTTTGTTGGAGGGTGAGGG- 3'	<i>NlaIII</i> 37°C/12h
<i>TNFA</i> -308 (G/A) rs 1800629	5' -AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' 5' -TCCTCCCTGCTCCGATTCCG- 3'	<i>NcoI</i> 37°C/12h

<sup>1</sup> Referência do gene no National Center for Biotechnology Information-NCBI.

### 4.3. Análise estatística

No primeiro momento foi realizada a análise descritiva dos dados com suas respectivas frequências, médias e/ou medianas, suas variabilidades e desvios. Por conseguinte, foram feitas as análises bivariadas, buscando correlações entre as variáveis através dos testes  $\chi^2$  ou Fisher (para variáveis categóricas), Pearson/Spearman, além do teste t, considerando o valor de p significativo quando < 0,05.

O cálculo para sobrevida global (SG) foi feito a partir da data da realização do transplante até a data da última consulta ou data de óbito. O método utilizado

para a análise foi o Kaplan-Meier e, quando estratificado em grupos, optou-se em usar o teste log-rank para cotejá-los.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software SSPS (Statistical Package for Social Sciences) versão: 15.0.

A frequência alélica e genotípica 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 de Chi-quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizado para determinar o significado das diferenças entre esses valores. Foram considerados em equilíbrio valores de  $p > 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análise populacional

As características clínicas dos pacientes estão descritas na Tabela 4.

O grupo estudado foi constituído por 55 pacientes. Destes pacientes 34 eram do sexo masculino e 21 do feminino, com idade média de 39 anos. As doenças de base foram principalmente malignidades hematológicas (51 casos; 92,7%), incluindo leucemia mielóide aguda (LMA, n=15; 27,3%), leucemia linfóide aguda (LLA, n=13; 23,6%), leucemia mielóide crônica (LMC, n=12; 21,8%), mieloma múltiplo (MM, n=7; 12,7%), linfoma de Hodgkin (LH, n=2; 3,6%), linfoma não-Hodgkin (LNH, n=1; 1,8%) e mielofibrose (n=1; 1,8%). Foram observados apenas 4 casos (7,3%) de doenças hematológicas não malignas, como, a anemia aplástica (AA, n=3; 5,4%) e a hemoglobinúria paroxística noturna (HPN, n=1; 1,8%). A maioria dos pacientes (45 casos) foi submetida ao TCTH alogênico e 10 fizeram o transplante autólogo. Com relação ao tipo de enxerto, 35 pacientes (63,6%) receberam enxerto de células-tronco hematopoéticas do sangue periférico e 20 (36,4%) da medula óssea.

Os regimes de condicionamento utilizados nos pacientes deste estudo estão listados na Tabela 5. Os regimes adotados nos 45 casos de transplantes alogênicos foram bussulfano + ciclofosfamida (n=19; 42,2%), bussulfano + fludarabine (n=9; 20%), irradiação corporal total + ciclofosfamida + etoposide (n=7; 15,5%), bussulfano + etoposide + ciclofosfamida (n=4; 8,9%), irradiação corporal total + ciclofosfamida + globulina antitimocitária (n=3; 6,7%), ciclofosfamida + irradiação corporal total (n=2; 4,4%) e ciclofosfamida + fludarabine + globulina antitimocitária (n=1; 2,2%). Nos 10 casos de transplante autólogo os regimes utilizados foram, melfalano (n=7; 70%), carmustina + etoposide + aracetin + melfalano (n=2; 20%) e melfalano + mitoxantrone (n=1; 10%).

Os 45 pacientes submetidos ao TCTH alogênico receberam profilaxia para DECH, constituída por metotrexato + ciclosporina.

**Tabela 4.** Características clínicas dos pacientes avaliados neste estudo, (n=55).

<b>Variáveis</b>	<b>Número de Pacientes (%)</b>
<b>Idade</b>	
Variação	5 – 63 anos
Média	39 anos
<b>Gênero</b>	
Masculino	34 (61,8)
Feminino	21 (38,2)
<b>Diagnóstico</b>	
Leucemia mieloide aguda	15 (27,3)
Leucemia linfóide aguda	13 (23,6)
Leucemia mieloide crônica	12 (21,8)
Mieloma múltiplo	7 (12,7)
Linfoma de Hodgkin	2 (3,6)
Linfoma não-Hodgkin	1 (1,8)
Mielofibrose	1 (1,8)
Anemia aplástica	3 (5,4)
Hemoglobinúria paroxística noturna	1 (1,8)
<b>Tipos de transplante</b>	
Alogênico	45 (81,8)
Autólogo	10 (18,2)
<b>Fontes das células-tronco hematopoéticas</b>	
Medula óssea	20 (36,4)
Sangue periférico	35 (63,6)
<b>Situação final</b>	
Vivo	23 (41,8)
Morto	32 (58,2)

**Tabela 5.** Regimes de condicionamento pré-TCTH e profilaxia para a DECH adotados nos 55 pacientes do estudo.

<b>Regime de condicionamento</b>	<b>Número de pacientes %</b>
<b>Transplante alogênico</b>	
BU + CY	19 (42,2)
BU + fludarabine	9 (20)
ICT + CY+ VP	7 (15,5)
BU + VP + CY	4 (8,9)
ICT + CY + ATG	3 (6,7)
CY + ICT	2 (4,4)
CY + fludarabine + ATG	1 (2,2)
<b>Transplante autólogo</b>	
MEL	7 (70)
BEAM	2 (20)
MEL + mitoxantrone	1 (10)
<b>Profilaxia para DECH</b>	
MTX+CSA	45 (81,8)

MEL: melfalano; BU: bussulfano; CY: ciclofosfamida; VP: etoposide; BEAM: carmustina + etoposide + aracetin + melfalano; ICT (irradiação corporal total); ATG: globulina antitimocitária; DECH: doença do enxerto contra o hospedeiro; MTX: metotrexato; CSA: ciclosporina.

## **5.2. Frequência alélica e genotípica**

### **5.2.1. Polimorfismos do complexo do gene *IL1B***

A distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos do gene *IL1B* nos 55 pacientes estudados está apresentada na Tabela 6. Foi encontrada uma frequência dos genótipos CC, CT e TT de 29,1%, 50,9% e 20% para o polimorfismo *IL1B*-511 e de 65,5%, 32,7% e 1,8% para o polimorfismo *IL1B*+3953, respectivamente. As frequências dos alelos -511C, -511T, +3953C e +3953T encontradas foram 0,546, 0,454, 0,818 e 0,182, respectivamente. A frequência dos

genótipos para o polimorfismo do gene *IL1RN* foi 1.1 em 54,6% dos pacientes, 1.2 em 32,7% dos pacientes, 2.2 em 9,1% dos pacientes e 1.3 em 3,6% dos pacientes. O alelo 1 foi o mais observado, com uma frequência de 0,727, seguido pelo alelo 2 com frequência de 0,254. Os diferentes alelos dos 3 polimorfismos do gene *IL1B* podem ser visualizados nas Figuras 2 e 3.

Não foram observadas diferenças na distribuição entre os genótipos observados e os genótipos esperados para os 3 diferentes polimorfismos do gene *IL1B*, demonstrando que estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), como visto na Tabela 6. Esse resultado indicou que o grupo estudado é representativo da população permitindo de forma confiável a avaliação das frequências gênicas.

### **5.2.2. Polimorfismos do gene *IL6***

A frequência dos genótipos para o polimorfismo do gene *IL6* foi GG em 56,4% dos pacientes, GC em 38,2% dos pacientes e CC em 5,4% dos pacientes. A frequência do alelo -174G foi 0,755 e do alelo -174C foi 0,246 (Tabela 6). Os três diferentes genótipos do polimorfismo do gene *IL-174G/C* podem ser observados na Figura 4. A distribuição alélica e genotípica estava em equilíbrio de Hardy-Weinber (EHW).

### **5.2.3. Polimorfismos do gene *TNF***

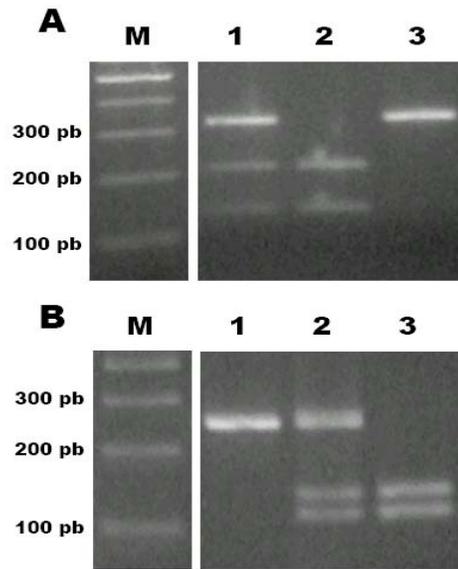
A frequência dos alelos e dos genótipos do gene *TNF* na posição -308 pode ser visualizada na tabela 6. O grupo estudado apresentou uma frequência dos genótipos GG, GA e AA para o polimorfismo do gene *TNF-308* de 85,5%, 12,7% e 1,8% respectivamente, e as frequências dos alelos -308G e -308A encontradas foram 0,918 e 0,082. Os diferentes alelos do polimorfismo do gene *TNF* podem ser visualizados na Figura 5. As frequências alélicas e genotípicas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinber (EHW).

**Tabela 6.** Frequência genotípica dos polimorfismos gênicos *IL1B*-511C/T, *IL1B*+3953C/T, *IL1RN* íntron 2 VNTR, *IL6*-174G/C, *TNF*-308G/A na população estudada (n=55). Análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg da frequência gênica usando teste Chi-quadrado: se  $p < 0,05$  não esta em EHW.

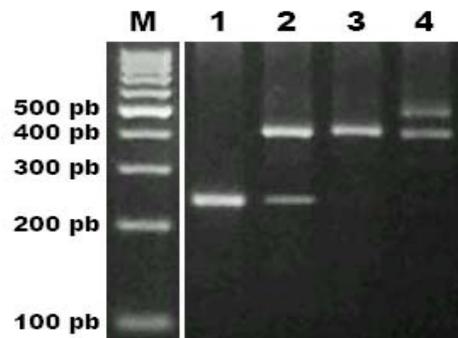
<b>Polimorfismos</b>	<b>Número observado (%)</b>	<b>Número esperado</b>
<b>Polimorfismo <i>IL1B</i>-511C/T</b>		
1.1 (CC)	16 (29,1)	16,4
1.2 (CT)	28 (50,9)	27,3
2.2 (TT)	11(20)	11,3
Alelo 1 (C)	0,546	$\chi^2 = 0.038$
Alelo 2 (T)	0,454	DF= 2, p= 0,981
<b>Polimorfismo <i>IL1B</i>+3953C/T</b>		
1.1 (CC)	36 (65,5)	36,8
1.2 (CT)	18 (32,7)	16,4
2.2 (TT)	1 (1,8)	1,8
Alelo 1 (C)	0,818	$\chi^2 = 0,541$
Alelo 2 (T)	0,182	DF= 2, p= 0,763
<b>Polimorfismo <i>IL1RN</i> íntron 2</b>		
1.1	30 (54,6)	29,1
1.2	18 (32,7)	20,4
2.2	5 (9,1)	3,6
1.3	2 (3,6)	1,4
Alelo 1	0,727	$\chi^2 = 1,613520$
Alelo 2	0,254	DF= 5, p >0,05
Outros alelos	0,018	

Continuação

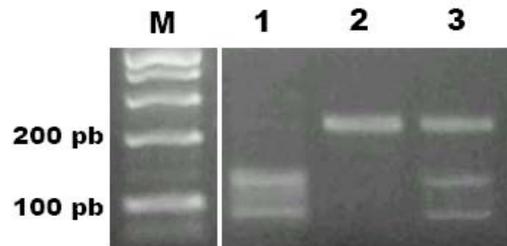
Polimorfismo <i>IL6-174G/C</i>		
1.1 (GG)	31 (56,4)	31,3
1.2 (GC)	21 (38,2)	20,4
2.2 (CC)	3 (5,4)	3,3
Alelo 1 (G)	0,755	$\chi^2 = 0,059$
Alelo 2 (C)	0,246	DF= 2, p= 0,971
Polimorfismo <i>TNF-308G/A</i>		
1.1 (GG)	47 (85,5)	46,4
1.2 (GA)	7 (12,7)	8,3
2.2 (AA)	1 (1,8)	0,4
Alelo 1 (G)	0,918	$\chi^2 = 1,196$
Alelo 2 (A)	0,082	DF= 2, p= 0,55



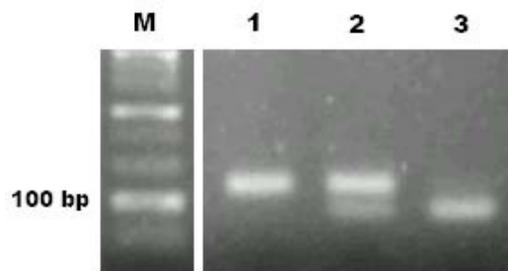
**Figura 2.** Em A gel de agarose a 3% evidenciando os genótipos do polimorfismo *IL1B*-511C/T. Genótipo 1.2, CT (1). Genótipo 1.1, CC (2). Genótipo 2.2, TT (3). Em B visualizamos os genótipos do polimorfismo *IL1B*+3953C/T. Genótipo 2.2, TT (1), 1.2, CT (2) e 1.1, CC (3). M: marcador de DNA.



**Figura 3.** Gel de agarose a 3% evidenciando os produtos da PCR do polimorfismo do gene *IL1RN* (intron 2), encontrados em nosso trabalho: Genótipo 2.2 com um fragmento de 240 pb (1). Genótipo 1.2 com dois fragmentos, um de 410 pb e o outro de 240 pb (2). Genótipo 1.1 com apenas um fragmento de 410 pb (3). Genótipo 1.3 com um fragmento de 500 pb e outro de 410 pb (4). M: marcador de DNA.



**Figura 4.** Gel de agarose a 3% demonstrando os genótipos do gene *IL6-174G/C*. Genótipo 2.2 (CC) com dois fragmentos de 123 e 85 pb cada (1). Genótipo 1.1 (GG) com um fragmento de 208 pb (2). Genótipo heterozigoto 1.2 (GC) com três fragmentos de 208, 123 e 85 pb. M: marcador de DNA.



**Figura 5.** Gel de agarose a 3% evidenciando os diferentes genótipos do polimorfismo *TNF-308G/A*. Genótipo 2.2 (AA) produz um fragmento de 107 pB (1). Genótipo 1.2 (GA) produz 3 fragmentos de 107, 87 e 20 pb (2). Genótipo 1.1 (GG) produz dois fragmentos de 87 e 20 pb (3). O fragmento de 20pb não é visualizado no gel. M: marcador de DNA.

### 5.3. Incidência e gravidade da mucosite oral nos pacientes submetidos ao TCTH.

Com relação à mucosite oral foi observado que 50 pacientes apresentaram algum grau de mucosite, e somente 5 pacientes não demonstraram sinais ou sintomas desta complicação (Tabela 7). A maioria dos pacientes desenvolveu mucosite grau IV, o restante desenvolveu mucosite menos intensa, variando entre graus I e III. Mucosite grau I foi encontrada em 6 pacientes (10,9%), grau II em 8 pacientes (14,6), grau III em 2 pacientes (3,6) e grau IV em 34 pacientes (61,8).

**Tabela 7.** Graus de mucosite observados nos pacientes estudados (n=55).

<b>Grau de mucosite</b>	<b>Número de pacientes (%)</b>
0	5 (9,1)
I	6 (10,9)
II	8 (14,6)
III	2 (3,6)
IV	34 (61,8)

Classificação de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1979).

### 5.4. Relação entre a gravidade da mucosite oral e as características clínicas.

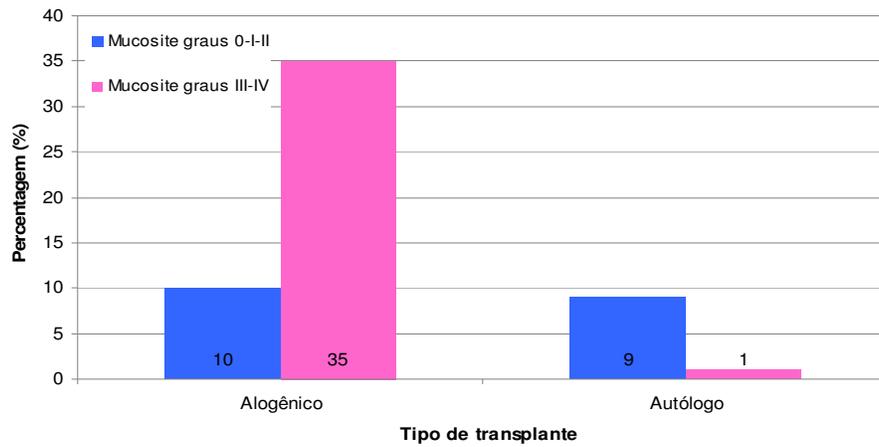
Para uma análise mais equilibrada dos dados, os casos de mucosite oral foram agrupados da seguinte forma: graus 0-I-II (ausência de mucosite ou presença de mucosite leve a moderada) e graus III-IV (presença de mucosite grave).

Foi encontrada uma significativa correlação entre o tipo de transplante (autólogo ou alogênico) e a gravidade da mucosite oral (Figura 6). Sendo que entre os 10 pacientes submetidos ao transplante autólogo, a maioria apresentou mucosite leve ou moderada, ou não desenvolveu mucosite (n=9; 90%) e apenas 1 paciente (10%) desenvolveu mucosite grave. Já entre os 45 pacientes submetidos ao transplante alogênico houve um predomínio de mucosite grave (n=35; 77,8%) e 10 casos (22,2%) de mucosite leve ou moderada ( $p < 0,0001$ ).

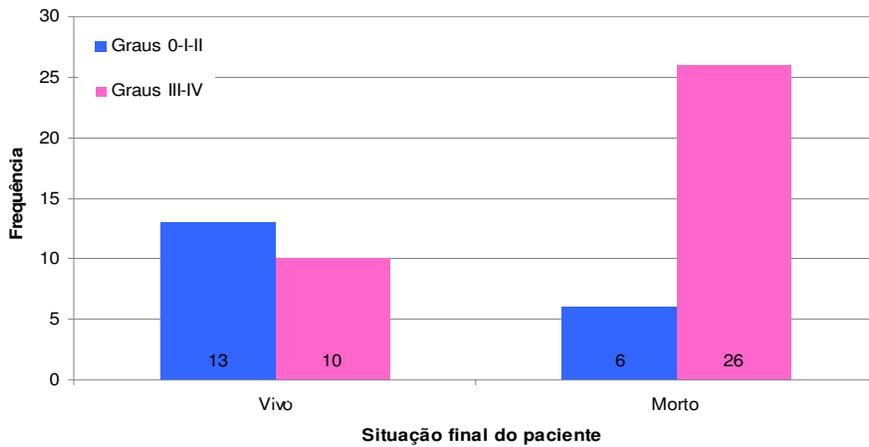
Trinta e dois pacientes faleceram durante o período de observação, sendo as causas de morte: infecção (n=14; 43,8%), persistência ou recorrência da doença primária (n=6; 18,8%), pneumonia intersticial (n=5; 15,6%), falência de órgãos (n=5; 15,6%), DECH crônica (n=1; 3,1%) e hemorragia intracraniana (n=1; 3,1%). Nossos resultados demonstraram uma correlação significativa entre a gravidade da mucosite oral e a situação final do paciente após o TCTH. A situação final pode ser entendida como o número de pacientes que estavam vivos ou mortos durante o período avaliado. Os dados podem ser visualizados na Figura 7, que demonstra maior prevalência de mucosite graus III e IV no grupo de pacientes que vieram ao óbito, em comparação com o grupo de pacientes vivos, que apresentaram maior prevalência de mucosite graus 0-I-II ( $p= 0,005$ ).

Além disso, foi observada uma significativa correlação entre a mucosite oral e o período de sobrevida global em meses, de forma que pacientes sem mucosite ou com mucosite leve a moderada apresentaram período de sobrevida global maior que os pacientes com mucosite grave ( $p=0,001$ ), como visto na Figura 8.

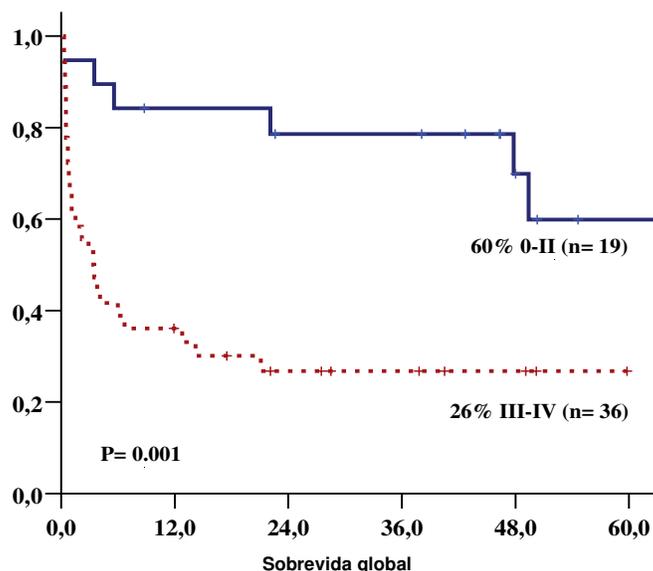
Não houve correlação significativa entre mucosite oral e o tipo de enxerto ( $p=0,96$ ), presença de DECH aguda ( $p=0,31$ ) e crônica ( $p=0,38$ ), idade ( $p=0,82$ ) e sexo do paciente ( $p=0,66$ ).



**Figura 6.** Correlação entre o tipo de transplante e a gravidade de mucosite oral, (n=55),  $p < 0,0001$ .



**Figura 7.** Correlação entre a gravidade de mucosite oral e a situação final (vivo/morto) do paciente (n=55),  $p = 0,005$ .



**Figura 8.** Curva de Kaplan-Meier demonstrando a relação dos diferentes graus de mucosite oral e o tempo de sobrevida pós-TCTH. Mediana 12 meses; Média 23 meses (1-100).

### 5.5. Correlação dos polimorfismos nos genes *IL1B*, *IL1RN*, *IL6* e *TNFA* com a gravidade da mucosite oral em pacientes submetidos ao TCTH.

Os resultados da correlação entre os diferentes polimorfismos estudados e a gravidade da mucosite oral estão demonstrados na Tabela 8. Os pacientes foram classificados nos fenótipos preditores de baixa e alta produção de interleucinas, de acordo com seus genótipos, com base em dados da literatura (Pociot *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1992; Fishman *et al.*, 1998; Hurme & Santtila, 1998; Smith & Humphries, 2009).

Somente o polimorfismo do gene *IL1B*+3953C/T demonstrou associação significativa com a gravidade da mucosite oral (Pearson 0,003;  $r=29\%$ ;  $p=0,04$ ). Ao analisar os diferentes genótipos separadamente, foi encontrada correlação com o genótipo *ILB*+3953CT. Entre os 18 indivíduos portadores do genótipo *IL1B*+3953CT, a maioria ( $n=15$ ) desenvolveu mucosite grave (graus III e IV), e apenas 3 pacientes apresentaram mucosite leve ou não desenvolveram mucosite.

O genótipo *IL1B*+3953TT associado com alta secreção de IL-1 $\beta$  é muito raro na população da região de Campinas (sudoeste do Brasil) e em nosso grupo de pacientes foi encontrado um único caso expressando esse genótipo. De forma interessante, este caso se encontrava no grupo de pacientes que desenvolveram mucosite grave. Agrupando-se os genótipos *IL1B*+3953TT e *IL1B*+3953 CT, por estarem associados com maior secreção de IL-1 $\beta$ , foi observado uma presença significativa destes dois genótipos no grupo de pacientes que desenvolveu mucosite grave. Ou seja, de 19 pacientes expressando os genótipos *IL1B*+3953TT e *IL1B*+3953CT, a maioria, 16 pacientes, desenvolveu mucosite grave, e apenas 3 pacientes não tiveram mucosite ou apresentaram mucosite leve ou moderada (Pearson 0,003; r=29%; p=0,04).

Como foi observada diferença entre o tipo de transplante e a gravidade da mucosite, optou-se por realizar uma análise excluindo os casos de TCTH autólogo. Assim, na análise dos casos de transplante alogênico, o polimorfismo do gene *IL1B*+3953C/T, deixou de correlacionar de forma significativa com gravidade da mucosite oral. Contudo houve uma tendência de correlação entre os genótipos +3953CT e +3953TT com a gravidade da mucosite, pois entre os 17 pacientes que expressavam o genótipo +3953CT, 15 desenvolveram mucosite grave, e o único caso apresentando o genótipo +3953TT desenvolveu mucosite grave. Porém, dos 27 pacientes com o genótipo +3953CC, apenas 8 apresentaram mucosite graus 0-II ( $p=0,16$ ).

Apesar de não significativa, foi encontrada relação entre mucosite oral e o polimorfismo do gene *IL6*-174G/C. Ao analisar os diferentes genótipos separadamente, de 31 indivíduos portadores do genótipo *IL6*-174GG, associado com a maior secreção de IL-6, 23 desenvolveram mucosite grave ( $p=0,06$ ). Contudo os 3 únicos pacientes que expressaram o raro genótipo *IL6*-174CC, associado com baixa secreção de IL-6, também desenvolveram mucosite oral grave.

Não foi observada relação entre os polimorfismos dos genes *IL1B*-511C/T, *IL1RN* e *TNF*-308G/A e a gravidade da mucosite oral.

**Tabela 8.** Relação entre a frequência genotípica dos polimorfismos estudados e a gravidade da mucosite oral, nos pacientes submetidos ao TCTH.

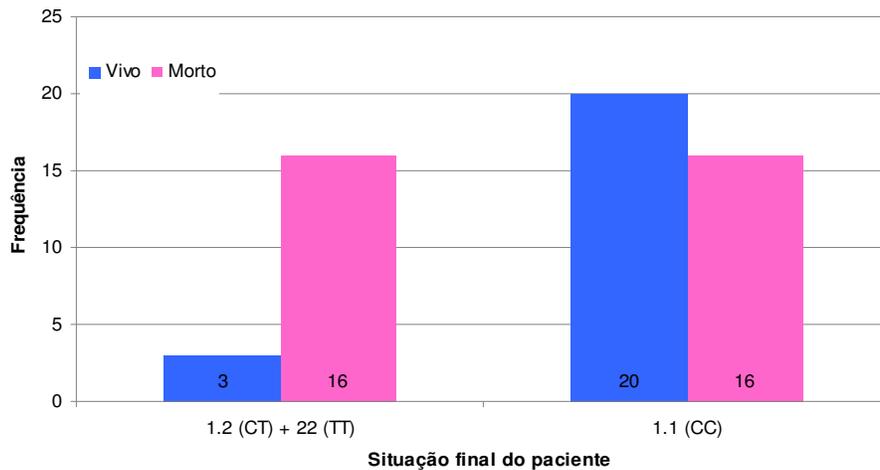
Polimorfismos	Genótipo	Fenótipo provável associado	Mucosite Graus 0-I-II (n=19)	Mucosite Graus III-IV (n=36)	Teste estatístico
<i>IL1B</i> -511C/T	1.1 (CC)		6	10	$\chi^2=0,84$
	1.2 (CT)		10	18	(NS)
	2.2 (TT)		3	8	
	CC	Baixo produtor	6	10	$\chi^2=0,76$
	CT+TT	Alto produtor	13	26	(NS)
<i>IL1B</i> +3953C/T	1.1 (CC)		16	20	$\chi^2=0,09$
	1.2 (CT)		3	15	Pearson=0,03
	2.2 (TT)		0	1	R=29%
	CC	Baixo produtor	16	20	$\chi^2=0,04$
	CT+TT	Alto produtor	3	16	Pearson=0,03 R=29%
<i>IL1RN</i> VNTR <sup>1</sup>	1.1		11	19	$\chi^2=0,75$
	1.2		5	13	(NS)
	2.2		2	3	
	1.1+1.3	Baixo produtor	12	20	$\chi^2=0,77$
	1.2+2.2	Alto produtor	7	16	(NS)
<i>TNF</i> -308G/A	1.1 (GG)		16	31	$\chi^2=0,68$
	1.2 (GA)		3	4	(NS)
	2.2 (AA)		0	1	
	GG	Baixo produtor	16	31	$\chi^2=0,99$
	GA+AA	Alto produtor	3	5	(NS)
<i>IL6</i> -174G/C	1.1 (GG)		8	23	$\chi^2=0,06$
	1.2 (GC)		11	10	(NS)
	2.2 (CC)		0	3	
	CG+CC	Baixo produtor	11	13	$\chi^2=0,15$
	GG	Alto produtor	8	23	(NS)

<sup>1</sup>Durante a análise individual dos diferentes genótipos do gene *IL1RN* VNTR não foram incluídos os dois casos que apresentavam o genótipo 1.3.

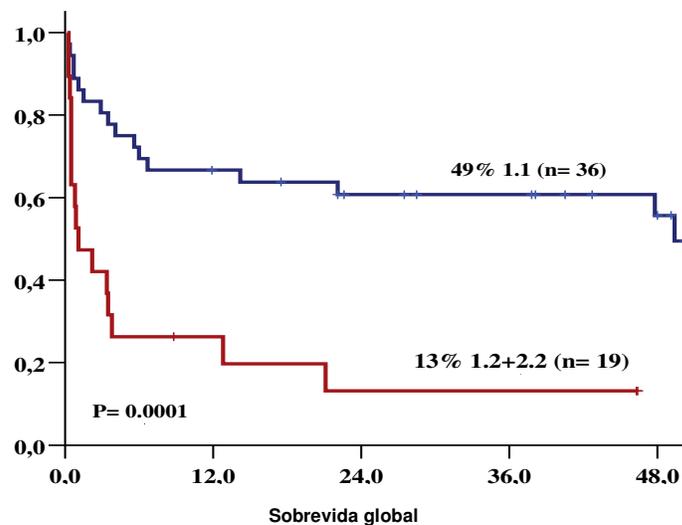
## **5.6. Relação dos polimorfismos nos genes *IL1B*, *IL1RN*, *IL6* e *TNFA* com a sobrevida e a situação final pós-TCTH.**

O polimorfismo no gene *IL1B*+3953C/T demonstrou correlação significativa com a situação final (vivo/morto) do paciente após o TCTH. Ao agrupar os genótipos, *IL1B*+3953CT e *IL1B*+3953TT, associados com maior secreção de IL-1 $\beta$ , foi observado que entre os 19 pacientes portadores dos referidos genótipos, apenas 3 pacientes estavam vivos. Já entre os 36 pacientes portadores do genótipo *IL1B*+3953CC, baixo secretor de IL-1 $\beta$ , 20 estavam vivos e 16 faleceram durante o período avaliado ( $p=0,009$ ). Os dados podem ser visualizados na Figura 9. Não foi observada associação entre os demais polimorfismos estudados e a situação final (vivo/morto) do paciente. Adicionalmente, o polimorfismo no gene *IL1B*+3953C/T correlacionou significativamente com o tempo de sobrevida pós-transplante. De forma que a presença dos genótipos +3953TT e +3953CT estava associada com menor tempo de sobrevida ( $p=0,001$ ), os dados podem ser visualizados na Figura 10. Não foi observada correlação entre o tempo de sobrevida e os demais polimorfismos analisados.

Com a exclusão dos casos de transplante autólogo, as seguintes análises mantiveram-se estatisticamente significantes: mucosite oral e situação final do paciente (vivo/morto)  $p=0,005$ ; mucosite oral e tempo de sobrevida pós-TCTH,  $p=0,01$ ; polimorfismo do gene *IL1B*+3953C/T e situação final do paciente (vivo/morto),  $p=0,01$ ; polimorfismo do gene *IL1B*+3953C/T e tempo de sobrevida pós-TCTH,  $p=0,001$ .



**Figura 9.** Correlação entre os genótipos do polimorfismo no gene *IL1B*+3953C/T e a situação final (vivo/morto) dos 55 pacientes do estudo ( $p=0,009$ ).



**Figura 10.** Curva de Kaplan-Meier demonstrando a correlação dos genótipos *IL1B*+3953TT(2.2) + *IL1B*+3953CT(1.2) e *IL1B*+3953CC(1.1) com o tempo de sobrevida pós-TCTH. Mediana 4,1 meses; Média 16 meses (1-85).

## 6. DISCUSSÃO

A mucosite oral é uma das complicações mais frequentes em pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH). A fisiopatologia da mucosite oral está associada com a super regulação de genes e a produção de citocinas inflamatórias, como IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, que controlam vários eventos biológicos culminando com dano tecidual (Sonis *et al.*, 2002).

O regime de condicionamento tem sido considerado o principal fator de risco relacionado com a mucosite oral em pacientes submetidos ao TCTH (Montserrat *et al.*, 2007). No entanto, outros fatores, como a variabilidade genética, podem contribuir para diferenças na frequência e manifestação clínica desta complicação, em um mesmo grupo de pacientes (Sonis, 1998).

Este estudo objetivou avaliar retrospectivamente a relação dos polimorfismos nos genes *IL1B+3953C/T*, *IL1B-511C/T*, *IL1RN VNTR*, *IL6-174G/C* e *TNF-308G/A* com a gravidade da mucosite oral pós-TCTH. Além disso, também foi avaliada a relação destes polimorfismos com a situação final e sobrevida pós transplante de células-tronco hematopoéticas.

Em nosso estudo, a mucosite oral foi observada em 91% dos pacientes avaliados. Esse resultado está em acordo com relatos da literatura quanto à incidência da mucosite oral, que pode variar entre 75-100% nos pacientes submetidos ao TCTH (Woo *et al.*, 1993; Pico *et al.*, 1998; Keefe *et al.*, 2000; Gabriel *et al.*, 2003). Com relação à gravidade, a mucosite pode se apresentar em diferentes graus, o que dificulta sobremaneira a avaliação comparativa. Neste estudo, observamos que 65% dos pacientes desenvolveram mucosite grau III/IV. De forma similar, Wardley e colaboradores (2000), avaliando um grupo de pacientes submetidos ao regime de condicionamento mieloablativo, observaram incidência de 67% de mucosite oral graus III e IV. No entanto, em estudo realizado com 60 pacientes submetidos ao TCTH para o tratamento de malignidades hematológicas, foi encontrada incidência de mucosite graus III e IV de 97% (Shea *et al.*, 2003).

Semelhante ao trabalho conduzido por Sonis *et al.* (2001), que avaliou a presença de mucosite oral em pacientes submetidos ao transplante autólogo e alogênico, em nosso estudo, foi encontrado mucosite oral mais grave entre os pacientes que receberam transplante alogênico. Esse achado se deve principalmente ao regime de condicionamento, que é mais intenso nessa modalidade terapêutica.

Em relação à influência das características dos pacientes na mucosite oral, em nosso grupo de pacientes a idade não se mostrou importante para uma maior gravidade desta complicação. O que pode ser explicado pelo predomínio de pacientes adultos jovens (média: 40 anos de idade) em nossa amostra. Nessa faixa etária, pode existir pouca influência do “*turn-over*” celular expressivamente encontrado em pacientes jovens, bem como, menor influência das condições encontradas para os pacientes com idade avançada, que incluem as alterações sistêmicas e menor oxigenação dos tecidos (Silva & Bussoloti, 2007; Lalla *et al.*, 2008).

Além disso, em relação à influência do tipo de enxerto, nossos resultados não mostram ser este um fator de risco importante para mucosite oral. Esse achado vem ao encontro com a literatura que não demonstra o verdadeiro papel do tipo de enxerto nesse evento (Rapoport *et al.*, 1999; Wardley *et al.*, 2000).

Estudos anteriores associaram a presença de mucosite oral grave com uma menor sobrevida em pacientes submetidos ao TCTH (Sonis *et al.*, 2001; Fanning *et al.*, 2006). Em nosso trabalho também foi observada significativa correlação entre a presença de mucosite oral grave e menor sobrevida global. Adicionalmente, também observamos relação entre a mucosite oral e a situação final do paciente, ou seja, a presença de mucosite grave estava associada com aumento na mortalidade pós-TCTH. No entanto, esses resultados podem ter sido influenciados por outros fatores como, doença de base, tipo de regime de condicionamento e fonte de células-tronco. Contudo, Fanning *et al.* (2006) demonstraram correlação entre a gravidade da mucosite oral e menor sobrevida global em uma população homogênea, constituída por pacientes com a mesma

doença de base e submetidos ao mesmo regime de condicionamento. Como uma das principais causas de morte neste estudo foi infecção, uma possível justificativa para menor sobrevida encontrada nos pacientes com mucosite grave, poderia estar relacionada à solução de continuidade da mucosa oral, ou mesmo do trato gastrointestinal, facilitando assim, a disseminação hematogênica.

No estudo da influência do processo inflamatório agudo nas complicações pós-TCTH, não foi encontrada neste trabalho, uma relação entre mucosite oral e o desenvolvimento de DECH, diferentemente de Vokurka *et al.* (2009), que analisando os fatores de risco e as características da mucosite em pacientes submetidos ao TCTH, observaram que a presença de mucosite oral grave e prolongada aumentava o risco de desenvolvimento de DECH aguda após o transplante.

Por outro lado, sabe-se que fatores genéticos podem influenciar a frequência e a gravidade da mucosite oral. Alguns estudos demonstraram importante associação entre polimorfismos em genes de citocinas e complicações relacionadas ao TCTH, incluindo a DECH e menor tempo de sobrevida (Sonis, 1998; MacMillan *et al.*, 2003; Dickinson *et al.*, 2007; Visentainer *et al.*, 2008). Contudo, até o presente momento, a literatura é pobre na correlação entre os polimorfismos em genes de citocinas e a mucosite oral pós-TCTH.

Um importante achado deste estudo foi a correlação positiva entre o polimorfismo no gene *IL1B*+3953C/T com a gravidade da mucosite oral. Nossos resultados demonstraram que a maioria dos pacientes portadores do genótipo heterozigoto +3953CT desenvolveu mucosite grave. Foi relatado previamente que a expressão deste genótipo está associada com um aumento de duas vezes na produção de IL-1 $\beta$  (Pociot *et al.*, 1992). Além disso, o único paciente que expressava o raro genótipo +3953TT, associado com alta secreção desta citocina, desenvolveu mucosite grave. Estes dados sugerem que a expressão dos genótipos *IL1B*+3953CT e *IL1B*+3953TT está associada com a presença de mucosite oral mais grave.

Na análise com exclusão do grupo de pacientes submetidos ao TCTH autólogo, foi observada associação entre os genótipos +3953CT e +3953TT e a gravidade da mucosite oral, apesar de não estatisticamente significativa. As razões deste achado podem estar no pequeno número de pacientes avaliados e predomínio do genótipo +3953CC na população analisada. O polimorfismo no gene *ILB+3953* tem sido associado com várias desordens orais, como, síndrome ardência bucal, glossite migratória benigna, abscesso dentário e doença periodontal (Engebretson *et al.*, 1999; Guimarães *et al.*, 2006; Guimarães *et al.*, 2007; de Sá *et al.*, 2007). Porém, não foram encontrados trabalhos na literatura correlacionando este polimorfismo com a mucosite oral pós-TCTH. Guimarães e colaboradores (2006), avaliando a relação do polimorfismo no gene *IL1B+3953C/T* e a incidência de ulceração aftosa recorrente, encontraram significativo aumento na frequência do genótipo +3953CT no grupo de pacientes que apresentavam maior número de lesões aftosas. Apesar das lesões aftosas apresentarem fisiopatologia diferente da mucosite oral, este trabalho, semelhante ao nosso estudo demonstrou a influência do genótipo *IL1B+3953CT* na gravidade de lesões ulceradas orais.

Nossos resultados demonstraram relação entre o genótipo *IL6-174GG* e presença mucosite oral grave, contudo não foi estatisticamente significante. A IL-6 tem sido associada com complicações relacionadas ao TCTH, incluindo a mucosite oral (Ferrà *et al.*, 1998; Karabon *et al.*, 2005; Visentainer *et al.*, 2008). Ferrà *et al.* (1998) avaliando a concentração de citocinas no plasma de pacientes submetidos ao transplante, observaram correlação positiva entre os níveis de IL-6 e a gravidade da mucosite oral. O polimorfismo do gene *IL6* localizado na posição -174 exerce efeito variável na produção de interleucina 6. Estudos anteriores demonstraram que a presença do genótipo -174GG estava associada com maior produção de IL-6, já outros, ao contrário, associavam o genótipo -174CC à maior síntese desta interleucina (Fishman *et al.*, 1998; Brull *et al.*, 2001). Trabalhos da literatura relacionaram este polimorfismo com líquen plano, abscesso dentário e carcinoma espinocelular oral (de Sá *et al.*, 2007; Xavier *et al.*, 2007; Vairaktaris *et*

*al.*, 2008). De forma interessante, Bazrafshani e colaboradores (2002) demonstraram que indivíduos homocigotos para o alelo *IL6-174G* apresentavam um risco oito vezes maior de desenvolver estomatite aftosa recorrente.

O fator de necrose tumoral- $\alpha$  é uma citocina pleiotrópica, secretada no início do processo inflamatório (Makhatadze, 1998). Tem sido demonstrada uma importante associação entre níveis elevados de TNF e toxicidades não hematológicas associadas ao TCTH. Ferrà *et al* (1998) observaram associação positiva entre concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$  e a gravidade da mucosite oral. Além disso, o tratamento com inibidores de TNF tem levado a redução na ocorrência e gravidade desta complicação (Lima *et al.*, 2005).

Em nosso estudo não foi observada correlação entre os diferentes genótipos do polimorfismo *TNF-308G/A* e a gravidade de mucosite oral. Este polimorfismo tem sido relacionado com lesões como, líquen plano oral, doença periodontal, ulceração aftosa recorrente, entre outras (Galbraith *et al.*, 1999; Guimarães *et al.*, 2007; Bai *et al.*, 2009). De forma interessante, Sakamoto e colaboradores (2006) avaliando a relação entre polimorfismos em genes de citocina e toxicidade pós-quimioterapia, observaram que apenas o polimorfismo no gene *TNFA-1031* estava associado com presença de mucosite oral. Este foi o único estudo encontrado na literatura relacionando polimorfismos em genes de citocinas com esta complicação.

A falta de correlação entre o polimorfismo *TNF-308G/A* e a gravidade da mucosite oral em nosso estudo, poderia estar associada à utilização de ciclosporina A no grupo de pacientes submetidos ao TCTH alogênico. Tem sido reportado que o tratamento com ciclosporina A reduz a resposta observada em indivíduos com os genótipos *TNF-308GA* e *TNF-308AA*, possivelmente devido à interrupção na regulação da transcrição do gene *TNF* nas células T e nos macrófagos (Schreiber & Crabtree, 1992; McCaffrey *et al.*, 1994).

Neste trabalho, não foi possível estabelecer a influência dos polimorfismos *IL1B-511C/T* e *IL1RN VNTR* na gravidade da mucosite oral, apesar destes polimorfismos estarem associados com diversas doenças imuno-inflamatórias de

repercussão oral (Bazrafshani *et al.*, 2002; Alayli *et al.*, 2007; Dashash *et al.*, 2007; Nikolopoulos *et al.*, 2008).

O polimorfismo no gene *IL1B+3953C/T* além de correlacionar com a gravidade da mucosite oral, também demonstrou relação com a situação final e sobrevida pós-transplante. Em nossos resultados, os genótipos *IL1B+3953CT* e *IL1B+3953TT* estavam associados com maior mortalidade e menor sobrevida global pós-TCTH. Como relatado previamente, esses genótipos estão relacionados com maior secreção de IL-1 $\beta$  e esta citocina tem sido implicada na fisiopatologia de complicações pós-transplante como DECH e mucosite, que por sua vez poderiam ter influenciado na sobrevida (Sonis *et al.*, 2002; Jaksch & Mattsson, 2005).

Não foi encontrado trabalho na literatura associando o polimorfismo no gene *IL1B+3953CT* com sobrevida pós-transplante. Contudo, estudos anteriores relacionaram polimorfismos nos genes da IL1A, IL-10, IL-18, IL-7 e TNF com mortalidade pós-TCTH (Cavet *et al.*, 1999; MacMillan *et al.*, 2003; Dickinson *et al.*, 2007). MacMillan *et al* (2003) avaliando o polimorfismo no gene *IL1B-511C/T*, encontram que a presença no doador do alelo -511T, associado com maior secreção de interleucina, estava relacionada com maior sobrevida pós-TCTH. Conforme esses autores a presença de genótipo favorável à secreção de IL1- $\beta$  estaria associado ao menor risco de infecção, resultando em aumento na sobrevida. Diferente do trabalho acima, neste estudo foi observado que o genótipo relacionado com a maior produção de IL-1 $\beta$  estava associado à menor sobrevida.

Em resumo, os resultados deste estudo demonstraram a correlação do polimorfismo no gene *IL1B+3953C/T* com a gravidade da mucosite oral, situação final e sobrevida pós-TCTH. Considerando as limitações impostas pela análise de um grupo heterogêneo, com pequeno número de pacientes, os resultados deste trabalho demonstraram que o polimorfismo no gene *IL1B+3953C/T* pode ser útil como preditor dos riscos de complicações relacionadas ao transplante de células-tronco hematopoéticas. Estudos adicionais, de natureza prospectiva, envolvendo

populações maiores e com condições clínicas semelhantes são importantes para confirmar nossos resultados.

## 7. CONCLUSÕES

1. No grupo estudado, constituído por pacientes submetidos ao TCTH autólogo e alogênico, foi encontrado um predomínio dos genótipos *IL1B*-511CT, *IL1B*+3953CC, *IL1RN* VNTR 1.1, *IL6*-174GG e *TNF*-308GG.
2. O polimorfismo no gene *IL1B*+3953C/T correlacionou significativamente com a gravidade da mucosite oral no grupo de pacientes submetidos ao transplante autólogo e alogênico. Os pacientes que expressavam os genótipos *IL1B*+3953TT e *IL1B*+3953CT desenvolveram mucosite oral grave.
3. A presença dos genótipos *IL1B*+3953TT e *IL1B*+3953CT estava associada com aumento na mortalidade e menor sobrevida global pós-TCTH.

## REFERÊNCIAS\*

Abbas KA, Pober JS. Effectors mechanisms of immune responses. In: Abbas KA, Pober JS, editors. Cellular and molecular immunology. 4th ed. Philadelphia: Saunders; 2000. Vol.1, p. 553.

Alayli G, Aydin F, Coban AY, Süllü Y, Cantürk F, Bek Y *et al.* T helper 1 type cytokines polymorphisms: association with susceptibility to Behçet's disease. Clin Rheumatol. 2007; 26(8): 1299-305.

Arend WP. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. Cytokine Growth Factor Rev. 2002; 13(4-5): 323-40.

Bai J, Jiang L, Lin M, Zeng X, Wang Z, Chen Q. Association of polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genes with oral lichen planus: a study in a chinese cohort with Han ethnicity. J Interferon Cytokine Res. 2009; 29(7): 381-8.

Barton BE. IL-6: insights into novel biological activities. Clin Immunol Immunopathol. 1997; 85(1):16-20.

Bazrafshani MR, Hajeer AH, Ollier WE, Thornhill MH. IL-1B and IL-6 gene polymorphisms encode significant risk for the development of recurrent aphthous stomatitis (RAS). Genes Immun. 2002; 3(5): 302-5.

Bellm LA, Cunningham G, Durnell L *et al.* Defining clinically meaningful outcomes in the evaluation of new treatments for oral mucositis: oral mucositis patient provider advisory board. Cancer Invest. 2002; 20: 793-800.

---

\* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors-Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com Medline.

Bensen JT, Langefeld CD, Hawkins GA, Green LE, Mychaleckyj JC, Brewer CS, Kiger DS, Binford SM, Colicigno CJ, Allred DC, Freedman BI, Bowden DW. Nucleotide variation, haplotype structure, and association with end-stage renal disease of the human interleukin-1 gene cluster. *Genomics*. 2003; 82(2): 194-217.

Beutler B, Cerami A. 1986. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature*. 1986; 320-584.

Bianco JA, Appelbaum FR, Nemunaitis J, Almgren J, Andrews F, Kettner P *et al*. Phase I-II trial of pentoxifylline for the prevention of transplant-related toxicities following bone marrow transplantation. *Blood*. 1991; 78(5): 1205-11.

Billingham RE. The biology of graft versus host reactions. *Harvey lectures*. 1966; 62: 71-78.

Blijlevens N, Sonis S. Palifermin (recombinant keratinocyte growth factor-1): a pleiotropic growth factor with multiple biological activities in preventing chemotherapy and radiotherapy-induced mucositis. *Ann Oncol*. 2007; 18(5): 817-26.

Burt R, Deeg J, Lothian ST, Santos G. *Bone Marrow Transplantation*. Seattle: RG Landes Company, 1998. cap.11, p.478-97.

Brull DJ, Montgomery HE, Sanders J, Dhamrait S, Luong L, Rumley A *et al*. Interleukin-6 gene -174g>c and -572g>c promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21(9): 1458-63.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975; 72(9): 3666-70.

Cavet J, Dickinson AM, Norden J, Taylor PR, Jackson GH, Middleton PG. Interferon-gamma and interleukin-6 gene polymorphisms associate with graft-versus-host disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Blood*. 2001; 98(5): 1594-600.

Chen H, Wilkins LM, Aziz N, Cannings C, Wyllie DH, Bingle C, *et al*. Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1B gene affect transcription according to haplotype context. *Hum Mol Genet*. 2006; 15(4): 519-29.

Chen ML, Huang CM, Tsai CH, Tsai FJ. Interleukin-1beta gene polymorphisms in Taiwanese patients with gout. *Rheumatol Int*. 2005; 25(3): 179-82.

Chi KH, Chen CH, Chan WK, Chow KC, Chen SY, Yen SH *et al*. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on oral mucositis in head and neck cancer patients after cisplatin, fluorouracil, and leucovorin chemotherapy. *J Clin Oncol*. 1995; 13(10): 2620-8.

Classen DC, Burke JP, Ford CD, Evershed S, Aloia MR, Wilfahrt JK *et al*. *Streptococcus mitis* sepsis in bone marrow transplant patients receiving oral antimicrobial prophylaxis. *Am J Med*. 1990; 89(4): 441-6.

Coleman CN. Molecular biology in radiation oncology. Radiation oncology perspective of BRCA1 and BRCA2. *Acta Oncol*. 1999; 38 Suppl 13:55-9.

Cutler C, Li S, Kim HT, Laglenne P, Szeto KC, Hoffmeister L *et al*. Mucositis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a cohort study of methotrexate- and non-methotrexate-containing graft-versus-host disease prophylaxis regimens. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005; 11(5): 383-8.

Danis VA, Millington M, Hyland VJ, 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*. 1995; 99(2): 303-10.

Dashash M, Drucker DB, Hutchinson IV, Bazrafshani MR, Blinkhorn AS. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and gingivitis in children. *Oral Dis.* 2007; 13(3): 308-13.

de Sá AR, Moreira PR, Xavier GM, Sampaio I, Kalapothakis E, Dutra WO *et al.* Association of CD14, IL1B, IL6, IL10 and TNFA functional gene polymorphisms with symptomatic dental abscesses. *Int Endod J.* 2007; 40(7): 563-72.

Dickinson AM, Harrold JL, Cullup H. Haematopoietic stem cell transplantation: can our genes predict clinical outcome? *Expert Rev Mol Med.* 2007; 9(29): 1-19.

di Giovine FS, Takhsh E, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism at -511 in the human interleukin-1 beta gene (IL1 beta). *Hum Mol Genet.* 1992; 1(6): 450.

Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest.* 2000; 118(2): 503-8.

Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol.* 1998; 16(5-6): 457-99.

Dinarello CA. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997; 8(4):253-65.

Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 1996; 15; 87(6): 2095-147.

Dulley, FL. Transplante de medula óssea. *Hematol. Hemoter.* 1996; 1(2): 13-19.

Eisen D, Essell J, Broun ER. Oral cavity complications of bone marrow transplantation. *Semin Cutan Med Surg.* 1997; 16(4): 265-72.

Engbretson SP, Lamster IB, Herrera-Abreu M, Celenti RS, Timms JM, Chaudhary AG *et al.* The influence of interleukin gene polymorphism on expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in periodontal tissue and gingival crevicular fluid. *J Periodontol.* 1999; 70(6): 567-73.

Epstein JB. Oral mucositis in myelosuppressive cancer therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999; 88:273.

Fanning SR, Rybicki L, Kalaycio M, Andresen S, Kuczkowski E, Pohlman B. Severe mucositis is associated with reduced survival after autologous stem cell transplantation for lymphoid malignancies. *Br J Haematol.* 2006; 135(3): 374-81.

Foerster J. Transplante de medulla óssea. In: Bithell TC. *et al.* Hematologia clínica. Ver. Saúde Pública. São Paulo: 1991. v.5, n.2. p.75-85.

Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, 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 association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* 1998; 102:1369.

Ferrà C, de Sanjosé S, Gallardo D, Berlanga JJ, Rueda F, Marìn D *et al.* IL-6 and IL-8 levels in plasma during hematopoietic progenitor transplantation. *Haematologica.* 1998; 83(12): 1082-7.

Ferrà C, de Sanjosé S, Lastra CF, Martí F, Mariño EL, Sureda A *et al.* Pentoxifylline, ciprofloxacin and prednisone failed to prevent transplant-related toxicities in bone marrow transplant recipients and were associated with an increased incidence of infectious complications. *Bone Marrow Transplant.* 1997; 20(12): 1075-80.

Gabriel DA, Shea T, Olajida O, Serody JS, Comeau T. The effect of oral mucositis on morbidity and mortality in bone marrow transplant. *Semin Oncol.* 2003; 30(6): 76-83.

Galbraith GM, Hendley TM, Sanders JJ, Palesch Y, Pandey JP. Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1999; 26(11): 705-9.

Gemmati D, Ongaro A, Tognazzo S, Catozzi L, Federici F, Mauro E *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C gene variants in adult non-Hodgkin's lymphoma patients: association with toxicity and survival. *Haematologica*. 2007; 92(4): 478-85.

Gibson RJ, Cummins Ag, Bowen JM *et al.* Apoptosis occurs early in the basal layer of the oral mucosa following cancer chemotherapy. *Asian Pacific J Clin Oncol*. 2006; 2: 39-49.

Gore EA, Sanders JJ, Pandey JP, Palesch Y, Galbraith GM. Interleukin-1beta+3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1998; 25(10): 781-5.

Gratwohl A. Principles of Conditioning. In: Apperley J, Carreras E, Gluckman A, Masszi T. 5. ed. France: The EBMT Handbook; 2008. p.129-145.

Guerreiro CS, Ferreira P, Tavares L, Santos PM, Neves M, Brito M *et al.* Fatty acids, IL6, and TNFalpha polymorphisms: an example of nutrigenetics in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2009; 104(9): 2241-9.

Guimarães AL, Correia-Silva Jde F, Diniz MG, Xavier GM, Horta MC, Gomez RS. Investigation of functional gene polymorphisms: IL-1B, IL-6 and TNFA in benign migratory glossitis in Brazilian individuals. *J Oral Pathol Med*. 2007; 36: 533–7.

Guimarães AL, de Sá AR, Victoria JM, de Fátima Correia-Silva J, Gomez MV, Gomez RS. Interleukin-1beta and serotonin transporter gene polymorphisms in burning mouth syndrome patients. *J Pain*. 2006; 7(9): 654-8.

Guimarães AL, de Sá AR, Victória JM, Correia-Silva JF, Pessoa PS, Diniz MG, Gomez RS. Association of interleukin-1beta polymorphism with recurrent aphthous stomatitis in Brazilian individuals. *Oral Dis*. 2006; 12(6): 580-3.

Hall PD, Benko H, Hogan KR, Stuart RK. The influence of serum tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 concentrations on nonhematologic toxicity and hematologic recovery in patients with acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol.* 1995; 23(12):1256-60.

Higuchi T, Seki N, Kamizono S, Yamada A, Kimura A, Kato H, Itoh K. Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)-alpha gene in Japanese. *Tissue Antigens.* 1998; 51(6): 605-12.

Hoffstedt J, Eriksson P, Hellström L, Rössner S, Rydén M, Arner P. Excessive fat accumulation is associated with the TNF alpha-308 G/A promoter polymorphism in women but not in men. *Diabetologia.* 2000; 43(1): 117-20.

Hu Z, Shao M, Chen Y, Zhou J, Qian J, Xu L *et al.* Allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene (IL1RN\*2) is associated with a decreased risk of primary lung cancer. *Cancer Letters.* 2006; 236: 269-275.

Hurme M, Santtila S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are coordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1beta genes. *Eur J Immunol.* 1998; 28(8): 2598-602.

Huth C, Heid IM, Vollmert C, Gieger C, Grallert H, Wolford JK *et al.* IL6 gene promoter polymorphisms and type 2 diabetes: joint analysis of individual participants' data from 21 studies. *Diabetes.* 2006; 55(10): 2915-21.

Ishikawa Y, Kashiwase K, Akaza T, Morishima Y, Inoko H, Sasazuki T *et al.* Polymorphisms in TNFA and TNFR2 affect outcome of unrelated bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 29(7): 569-75.

Jaksch M, Mattsson J. The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Scand J Immunol.* 2005; 61(5): 398-409.

Jin P, Panelli MC, Marincola FM, Wang E. Cytokine polymorphism and its possible impact on cancer. *Immunol Res.* 2004; 30(2): 181-90.

Karabon L, Wysoczanska B, Bogunia-Kubik K, Suchnicki K, Lange A. IL-6 and IL-10 promoter gene polymorphisms of patients and donors of allogeneic sibling hematopoietic stem cell transplants associate with the risk of acute graft-versus-host disease. *Hum Immunol.* 2005; 66(6): 700-10.

Keefe DMK, Schubert MM, Elting LS, Sonis ST, Epstein JB, Raber-Durlacher JE *et al.* Mucositis Study Section of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer and the International Society for Oral Oncology. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. *Cancer.* 2007; 109(5): 820-31.

Keefe DMK, Peterson DE, Schubert MM. Developing evidence-based guidelines for management of alimentary mucositis: process and pitfalls. *Support Care Cancer.* 2006; 14(6): 492-8.

Keefe DM, Gibson RJ, Hauer-Jensen M. Gastrointestinal mucositis. *Semin Oncol Nurs.* 2004; 20(1): 38-47.

Keefe DMK, Brealey J, Goland GJ, Cummins AG. Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans *Gut.* 2000; 47(5): 632-7.

Keen LJ. The extent and analysis of cytokine and cytokine receptor gene polymorphism. *Transpl Immunol.* 2002; 10(2-3): 143-6.

Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and GP 130. *Blood.* 1995; 86(4):1243-54.

Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW *et al.* The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1997; 24(1): 72-7.

Köstler WJ, Hejna M, Wenzel C, Zielinski CC. Oral mucositis complicating chemotherapy and/or radiotherapy: options for prevention and treatment. *CA Cancer J Clin.* 2001; 51(5): 290-315.

Lalla RV, Sonis ST, Peterson DE. Management of oral mucositis in patients who have cancer. *Dent Clin North Am.* 2008; 52(1): 61-77.

Liles WC, Van Voorhis WC. Nomenclature and biological significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. *J Infect Dis* 1995;172:1573-80.

Lima V, Brito GAC, Cunha FQ *et al.* Effects of the tumour necrosis factor- $\alpha$  inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. *Eur J Oral Sci.* 2005; 113(3): 210-7.

Logan RM, Stringer AM, Bowen JM, Yeoh AS, Gibson RJ, Sonis ST, Keefe DM. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. *Cancer Treat Rev.* 2007; 33(5): 448-60.

Logan RM, Gibson RJ, Sonis ST, Keefe DMK. Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in the oral mucosa following cancer chemotherapy. *Oral Oncol.* 2007; 43(4): 395-401.

Makhatadze NJ. Tumor necrosis factor locus: genetic organization and biological implications. *Hum Immunol.* 1998; 59(57): 1-9.

McCaffrey PG, Goldfeld AE, Rao A. The role of NFATp in cyclosporin A-sensitive tumor necrosis factor-alpha gene transcription. *J Biol Chem.* 1994; 269(48): 30445-50.

McGuire DB, Altomonte V, Peterson DE, Wingard JR, Jones RJ, Grochow LB. Patterns of mucositis and pain in patients receiving preparative chemotherapy and bone marrow transplantation. *Oncol Nurs Forum.* 1993; 20(10): 1493-502.

MacMillan ML, Radloff GA, DeFor TE, Weisdorf DJ, Davies SM. Interleukin-1 genotype and outcome of unrelated donor bone marrow transplantation. *Br J Haematol.* 2003; 121(4): 597-604.

Mazur G, Bogunia-Kubik K, Wróbel T, Karabon L, Polak M, Kuliczowski K *et al.* IL-6 and IL-10 promoter gene polymorphisms do not associate with the susceptibility for multiple myeloma. *Immunol Lett.* 2005; 96(2): 241-6.

Menendez JC, Casanova D, Amado JA *et al.* Effects of radiation on endothelial function. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1998; 41(4): 905-13.

Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005; 16(1): 35-53.

Montserrat VL, Oster G, Ford CM, Lu J, Sonis S. Oral mucositis and outcomes of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in patients with hematologic malignancies. *Support Care Cancer.* 2007; 15: 491-496.

Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res.* 2002; 4 Suppl 3:S233-42.

Nelson DL. SNPs, linkage disequilibrium, human genetic variation and Native American culture. *Trends Genet.* 2001; 17(1): 15-6.

Nicklin MJH, Weith A, Duff GW. A physical map of the region encompassing the human interleukin-alpha beta, and interleukin 1 receptor antagonist genes. *Genomics*. 1994; 19: 382-384.

Nielsen R. Population genetic analysis of ascertained SNP data. *Hum Genomics*. 2004; 1(3): 218-24.

Nikolopoulos GK, Dimou NL, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: a meta-analysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls. *J Clin Periodontol*. 2008; 35(9): 754-67.

Olomolaiye O, Wood NAP, Bidwell JL. A novel *N/A*III polymorphism in the human IL-6 promoter. *Eur J Immunogenet*. 1998; 25:267.

Organização Mundial de Saúde. World Health Organization. WHO handbook for reporting results of cancer treatment. Geneva: World Health Organization, 1979.

Orlicek SL, Branum KC, English BK, McCordic R, Shenep JL, Patrick CC. Viridans streptococcal isolates from patients with septic shock induce tumor necrosis factor-alpha production by murine macrophages. *J Lab Clin Med*. 1997; 130(5): 515-9

Ortega ETT, Neves MI, Einloft L., Zen J, Fuhrmeifter M, Dias VLM. Manual de enfermagem em UTI pediátrica. São Paulo: Ed. Medfi; 1996. p.154-181.

Pasquini R. Fundamentos e Biologia do Transplante de Células Hematopoéticas. In: Zago MA; Falcão RP; Pasquini R. Hematologia: Fundamentos e Prática. Rio de Janeiro: Ed Atheneu; 2001. p. 913-34.

Peterson DE, Keefe DM, Hutchins RD, Schubert MM. Alimentary tract mucositis in cancer patients: impact of terminology and assessment on research and clinical practice. *Support Care Cancer*. 2006; 14(6): 499-504.

Peterson DE. Toxicity of chemotherapy in oral lesions. In: Perry MC, Yarbrow JW, eds, Toxicity of Chemotherapy. Orlando Fla, Grune & Stratton, 1984;155-180.

Pico JL, Avila-Garavito A, Naccache P. Mucositis: Its Occurrence, Consequences, and Treatment in the Oncology Setting. *Oncologist*. 1998; 3(6): 446-451.

Pociot F, Mølviq 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*. 1992; 22(6): 396-402.

Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *Eur. J. Immunogenet*. 1999; 26: 1-3.

Qian W, Zhang J, Zhang Y. The relationship between tumor necrosis factor A-308 gene polymorphism and susceptibility of severe periodontitis in adults. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2002; 37(2): 126-8.

Rapoport AP, Miller Watelet LF, Linder T, Eberly S, Raubertas RF, Lipp J *et al*. Analysis of factors that correlate with mucositis in recipients of autologous and allogeneic stem-cell transplants. *J Clin Oncol*. 1999; 17(8): 2446-53.

Remick DG. Cytokines and cytokine receptors: Principles of action. In: Kronfol Z, editor. *Cytokines and mental health*. Boston: Kluwer Academic; 2003. p. 1-14.

Rocke LK, Loprinzi CL, Lee JK, et al. A randomized clinical trial of two different durations of oral cryotherapy for prevention of 5-fluorouracil-related stomatitis. *Cancer*. 1993; 72(7): 2234-8.

Ruescher TJ, Sodeifi A, Scrivani SJ, Kaban LB, Sonis ST. The impact of mucositis on alpha-hemolytic streptococcal infection in patients undergoing autologous bone marrow transplantation for hematologic malignancies. *Cancer*. 1998; 82(11): 2275-81.

Sáenz-López P, Carretero R, Cózar JM, Romero JM, Canton J, Vilchez JR *et al.* Genetic polymorphisms of RANTES, IL1-A, MCP-1 and TNF-A genes in patients with prostate cancer. *BMC Cancer*. 2008; 19: 8:382.

Sakamoto K, Oka M, Yoshino S, Hazama S, Abe T, Okayama N *et al.* Relation between cytokine promoter gene polymorphism and toxicity of 5-fluorouracil plus cisplatin chemotherapy. *Oncol Rep*. 2006; 16(2): 381-7.

Scully C, Sonis S, Diz PD. Oral mucositis. *Oral Dis*. 2006; 12(3): 229-41.

Scully C, Epstein J, Sonis S. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy: part 1, pathogenesis and prophylaxis of mucositis. *Head Neck*. 2003; 25(12): 1057-70.

Shea TC, Bruner R, Wiley JM, Serody JS, Sailer S, Gabriel DA *et al.* An expanded phase I/II trial of cyclophosphamide, etoposide, and carboplatin plus total body irradiation with autologous marrow or stem cell support for patients with hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2003; 9(7): 443-52.

Shih CM, Lee YL, Chiou HL, Chen W, Chang GC, Chou MC *et al.* Association of TNF-alpha polymorphism with susceptibility to and severity of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2006; 52(1): 15-20.

Shirakawa F, Saito K, Bonagura CA, Galson DL, Fenton MJ, Webb AC, Auron PE. The human prointerleukin 1 beta gene requires DNA sequences both proximal and distal to the transcription start site for tissue-specific induction. *Mol Cell Biol*. 1993; 13(3): 1332-44.

Silva L, Bussoloti I. Avaliação dos fatores de risco para mucosite oral em um grupo de pacientes sob terapia de transplante de medula. *Acta ORL*. 2007; 25(2): 89-72.

Slattery ML, Curtin K, Sweeney C, Wolff RK, Baumgartner RN, Baumgartner KB *et al.* Modifying effects of IL-6 polymorphisms on body size-associated breast cancer risk. *Obesity (Silver Spring)*. 2008; 16(2): 339-47.

Smith AJ, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor*. 2009; 20(1): 43-59.

Smith JP, Steve EH. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphism and their functionality. *Cytokine and Growth Factor*. 2009; 20: 43-59.

Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(4): 277-84.

Sonis ST. The biologic role for nuclear factor-kappaB in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with anti-neoplastic therapy. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002; 13(5): 380-9.

Sonis ST, Oster G, Fuchs H, Bellm L, Bradford BZ, Edelsberg J. Oral mucositis and the clinical and economic outcomes of hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2001; 19(8): 2201-5.

Sonis ST, Peterson RL, Edwards LJ, Lucey CA, Wang L, Mason L *et al.* Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. *Oral Oncol*. 2000; 36(4): 373-81.

Sonis ST. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncol* 1998; 34(1): 39-43.

Sonis ST, Tracey C, Shklar G, Jenson J, Florine D. An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1990; 69(4): 437-43.

Sonis ST, Sonis AL, Lieberman A. Oral complications in patients receiving treatment for malignancies other than of the head and neck. *J Am Dent Assoc*. 1978; 97(3): 468-72.

Spijkervet FK, Van Saene HK, Van Saene JJ *et al.* Effect of selective elimination of the oral flora on mucositis in irradiated head and neck cancer patients. *J Surg Oncol.* 1991; 46(3): 167-73.

Stiff P. Mucositis associated with stem cell transplantation: current status and innovative approaches to management. *Bone Marrow Transplant.* 2001; 27 Suppl 2:S3-S11.

Symonds RP. Treatment-induced mucositis: an old problem with new remedies. *Br J Cancer.* 1998; 77(10): 1689-95.

Takahashi H, Furukawa T, Hashimoto S, Suzuki N, Kuroha T, Yamazaki F *et al.* Contribution of TNF- $\alpha$  and IL-10 gene polymorphisms to graft-versus-host disease following allo-hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation.* 2000; 26: 1317–23.

Takashiba S, Naruishi K. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. *Periodontol.* 2000. 40: 94-106.

Tantawy AA, El-Bostany EA, Adly AA, Abou El Asrar M, El-Ghouroury EA *et al.* Methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphism in Egyptian children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2010; 21(1): 28-34.

Tarlow JK, Blakemore AF, Lennard A, Solari R, Hughes HN, Steinkasserer A. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Hum Genet.* 1993; 91:403-404.

Thompson MW, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson Genética Médica.* 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

Tolusso B, Pietrapertosa D, Morelli A, De Santis M, Gremese E, Farina G *et al.* IL-1B and IL-1RN gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: relationship with

protein plasma levels and response to therapy. *Pharmacogenomics*. 2006; 7(5): 683-95.

Treister N, Sonis S. Mucositis: biology and management. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007; 15(2): 123-9.

Trenz K, Rothfuss A, Schütz P, Speit G. Mutagen sensitivity of peripheral blood from women carrying a BRCA1 or BRCA2 mutation. *Mutat Res*. 2002; 500(1-2): 89-96.

Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB Jr, de Souza AP, Line SR. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *J Clin Periodontol*. 2003; 30(5): 438-42.

Tureson I, Bernefors R, Book M et al. Normal tissue response to low doses of radiotherapy assessed by molecular markers-a study of skin in patients treated for prostate cancer. *Acta Oncol*. 2001; 40(8): 941-51.

Trotti A, Byhardt R, Stetz J, Gwede C, Corn B, Fu K, Gunderson L, McCormick B, Morrisintegral M, Rich T, Shipley W, Curran W. Common toxicity criteria: version 2.0. an improved reference for grading the acute effects of cancer treatment: impact on radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000; 47(1): 13-47.

Ulrich CM, Yasui Y, Storb R, Schubert MM, Wagner JL, Bigler J *et al*. Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood*. 2001; 98(1): 231-4.

Vairaktaris E, Yapijakis C, Serefoglou Z, Avgoustidis D, Critselis E, Spyridonidou S *et al*. Gene expression polymorphisms of interleukins-1 beta, -4, -6, -8, -10, and tumor necrosis factors-alpha, -beta: regression analysis of their effect upon oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008; 134(8): 821-32.

Vamvakopoulos JE, Taylor CJ, Morris-Stiff GJ, 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.* 2002; 29(4): 337-40.

Vandenbroeck K, Goris A. Cytokine gene polymorphisms in multifactorial diseases: gateways to novel targets for immunotherapy? *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24(6): 284-9.

van Kuilenburg AB, Haasjes J, Richel DJ, Zoetekouw L, Van Lenthe H, De Abreu RA *et al.* Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: identification of new mutations in the DPD gene. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(12): 4705-12.

Vilcek J. The cytokines: an overview. In: Thompson MT, editor. *The cytokines handbook.* 4 ed. Amsterdam: Elsevier; 2003. V.1. p. 3.

Visentainer JEL, Sell AM, Franceschi DA, Lieber SR, Souza CA. Importância de polimorfismos de genes reguladores de citocinas em transplantes de células progenitoras hematopoiéticas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2008; 44(4).

Vokurka S, Bystricka E, Koza V, et al. Higher incidence of chemotherapy induced oral mucositis in females: a supplement of multivariate analysis to a randomized multicentrestudy. *Support Care Cancer.* 2006; 14(9): 974-6.

Vokurka S, Steinerova K, Karas M, Koza V. Characteristics and risk factors of oral mucositis after allogeneic stem cell transplantation with FLU/MEL conditioning regimen in context with BU/CY2. *Bone Marrow Transplant.* 2009; 44(9): 601-5.

Wang L, Walia B, Evans J, Gewirtz AT, Merlin D, Sitaraman SV. IL-6 induces NF-kappa B activation in the intestinal epithelia. *J Immunol.* 2003; 171(6): 3194-201.

Wardley AM, Jayson GC, Swindell R, Morgenstern GR, Chang J, Bloor R *et al.* Prospective evaluation of oral mucositis in patients receiving myeloablative conditioning regimens and haemopoietic progenitor rescue. *Br J Haematol.* 2000; 110(2): 292-9.

Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AIF, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNFa) gene detectable by *NcoI* restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 353.

Wilson AG, Symons JA, Mcdowell TL, Mcdevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci.* 1997; 94: 3195-99.

Witkin SS, Gerber S, Ledger WJ. Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. *Clin Infect Dis.* 2002; 34: 204-209.

Woo SB, Sonis ST, Monopoli MM, Sonis AL. A longitudinal study of oral ulcerative mucositis in bone marrow transplant recipients. *Cancer.* 1993; 72(5): 1612-7.

Xavier GM, de Sá AR, Guimarães AL, da Silva TA, Gomez RS. Investigation of functional gene polymorphisms interleukin-1beta, interleukin-6, interleukin-10 and tumor necrosis factor in individuals with oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2007; 36(8): 476-81.

Yasuda T. Cartilage destruction by matrix degradation products. *Mod Rheumatol.* 2006; 16(4): 197-205.

Zalcberg J, Kerr D, Seymour L, Palmer M. Haematological and non-haematological toxicity after 5-fluorouracil and leucovorin in patients with advanced colorectal cancer is significantly associated with gender, increasing age and cycle number. Tomudex International Study Group. *Eur J Cancer.* 1998; 34(12): 1871-5.

Zúñiga J, Vargas-Alarcón G, Hernández-Pacheco G, Portal-Celhay C, Yamamoto-Furusho JK, Granados J. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Genes Immun.* 2001; 2(7): 363-6.

## ANEXO



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fem.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fem.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

2ª VIA

CEP, 15/12/09.  
(Grupo III)

**PARECER CEP:** N° 682/2008 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0546.0.146.000-08

### I - IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO: "POLIMORFISMOS DOS GENES CODIFICADORES DA IL-1, IL-6 E FATOR DE NECROSE TUMORAL NA OCORRÊNCIA E GRAVIDADE DA MUCOSITE ORAL APÓS TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE MEDULA ÓSSEA".**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Michele Gassen Kellerman

**INSTITUIÇÃO:** Hemocentro / UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 03/09/2008

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 30/10/09 (O formulário encontra-se no *site* acima)

### II - OBJETIVOS

Identificar os genótipos dos polimorfismos dos genes codificadores da IL-1, IL-6 e do TNFalfa em pacientes submetidos a transplante de medula óssea-TCTH, (b) avaliar a frequência e intensidade da mucosite em pacientes submetidos ao TCTH e (c) verificar se os polimorfismos dos genes IL1B, IL1RN, IL6 e TNF alfa influenciam na ocorrência e na gravidade da mucosite em pacientes submetidos ao TCTH.-

### III - SUMÁRIO

Projeto de doutorado em Estomatopatologia. Estudo retrospectivo, realizado a partir de amostras de DNA de pacientes submetidos a transplante mieloablativo de células tronco hematopoiéticas no período de 2003 a 2008, na Unidade de Transplante de Medula Óssea do HC Unicamp. As amostras são provenientes do Laboratório de Análise Molecular de Polimorfismos do Hemocentro-Unicamp. Os dados referentes à história médica e manifestações orais clínicas serão obtidas a partir dos prontuários médicos e da Central de Análise de Dados e Estatística (CADE) do Hemocentro-Unicamp. Os sujeitos de pesquisa e/ou responsáveis legais receberão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, as amostras estocadas dos sujeitos serão reavaliadas para pesquisa de polimorfismos gênicos por técnica de PCR. O projeto será realizado no Hemocentro Unicamp, contando com autorização dos responsáveis pela Unidade.

### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

---

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13084-971 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -